

Université Paris VI

Pierre et Marie Curie

THÈSE de DOCTORAT de l'UNIVERSITÉ PARIS VI

Spécialité Physiologie et Physiopathologie

Présentée par

Carine STRUP-PERROT

Pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PARIS VI

**Implication des MMP et des TIMP dans le
remodelage matriciel : effets aigus et tardifs de
l'irradiation du tractus digestif**

Soutenue le 02 décembre 2004

Devant le jury composé de :

Professeur Jean CHAMBAZ,

Madame Michèle MARTIN,

Monsieur William HORNEBECK,

Madame Nadine CERF-BENSUSSAN

Monsieur Pierre-Henry DUEE

Professeur Denis MATHE

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

A mes grands-parents,

Qui m'ont transmis le goût de l'effort, et la fierté du travail bien fait,

A mes parents,

Pour leur confiance sans cesse réaffirmée et leurs encouragements,

A mon époux,

Pour m'avoir aidée à réaliser ce travail et ses encouragements quotidiens,

A mon fils,

Pour la sérénité professionnelle qu'il m'a permise d'acquérir,

A Mme Jocelyne Aigueperse,

Pour s'être personnellement impliquée dans la reprise de mes études, pour sa confiance, les encouragements qu'elle m'a prodigués dans les moments de doute et de découragement. Qu'elle trouve ici l'expression de ma plus profonde gratitude.

A M. le Professeur Denis Mathé,

Pour être à l'origine de ce travail, m'avoir fait bénéficier de sa grande culture scientifique et avoir guidé mes pas. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Madame Marie-Catherine Vozenin-Brotons,

Pour son aide amicale, la qualité de son encadrement, sa grande disponibilité et sa confiance. Qu'elle trouve ici l'expression de mon indéfectible amitié.

A Messieurs Philippe Voisin et Marc Benderitter,

Pour leur bienveillance et leur compréhension, pour m'avoir laissé finir cette thèse en paix. Qu'ils trouvent tous deux ici l'expression de mes sincères remerciements.

A Monsieur Pierre-Henry Duée,

Pour s'être impliqué dans son rôle de parrain tout le long de cette thèse, sa gentillesse et sa disponibilité. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de mon amitié,

A Monsieur Jean Chambaz,

Pour avoir compris le sens profond de ma démarche et m'avoir accompagnée tout le long de cette aventure, m'avoir prouvé que Science et Syndicalisme ne font pas forcément mauvais ménage bien au contraire. Qu'il trouve ici l'expression de mon admiration et de mon estime,

A Madame Michèle Martin,

Pour avoir en quelque sorte initié ma reprise d'étude et suivi mon parcours, accepté d'être rapporteur de ce mémoire. Qu'elle soit ici chaleureusement remerciée,

A Monsieur William Hornebeck,

Pour avoir accepté d'être le rapporteur de ce mémoire, pour sa disponibilité et sa gentillesse. Qu'il trouve ici l'expression de mes plus profonds remerciements,

A Madame Nadine Cerf-Bensussan,

Pour avoir accepté de lire ce travail, malgré un emploi du temps extrêmement chargé. Qu'elle soit ici chaleureusement remerciée.

A Madame Agnès François,

Pour sa disponibilité et son aide. Qu'elle soit ici remerciée.

A Mesdames Christine Linard et Isabelle Dublineau,

Fidèles d'entre les fidèles, pour leurs encouragements, la compassion de leur oreille, leur complicité. Trouvez ici l'expression de mon amitié fidèle.

A monsieur Stéphane Grison,

Pour son aide, son humour, son amitié précieuse et ses encouragements.
Trouve ici mon vieux complice, l'expression de ma considération et de mon affection.

A monsieur Stéphane Fouquet,

Pour son aide informatique, sa disponibilité et son affection.
Qu'il trouve ici l'expression de mon amitié et de ma gratitude.

A Marie Vandamme,

Pour avoir fait mon éducation « moléculaire », sa disponibilité.

Pour avoir contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, pour m'avoir conseillée, soutenue, aidée, accompagnée ou plus simplement pour avoir éclairé mes journées, ma reconnaissance et ma sympathie vont par ordre alphabétique à :

Alhierd Abramtchik,

Aux documentalistes de la BIUM,

Aux collègues du SRBE,

Au personnel de l'animalerie de l'IGR,

Au personnel de l'UPRES EA 2710, de l'IGR,

Cédric Baudelin,

Valérie Durant,

Sylvie Hardy,

Bénédicte Martin,

Michèle Paquet,

...

Table des matières

Liste des abréviations.....	4
Résumé	5
Summary	5
Partie I : Introduction	6
I. L'intestin : rappels sur la structure, les fonctions et les acteurs cellulaires :.....	7
A. Organisation générale du tube digestif :.....	7
B. Matrice extra-cellulaire et lame basale : structure et fonction :	12
1. Constituants matriciels des lames basales :	13
2. Les récepteurs de la matrice extracellulaire, les intégrines :	14
C. Les jonctions cellule épithéliale-cellule épithéliale et cellule épithéliale-matrice :	15
D. Renouvellement cellulaire :	16
1. La prolifération cellulaire intestinale :.....	17
2. L'apoptose dans l'intestin :.....	18
II. Effets de l'irradiation :	20
A. Nature des expositions aux rayonnements ionisants :	20
1. Exposition accidentelle :	20
2. La radiothérapie :	21
B. Effets généraux d'une irradiation :	21
1. Conséquences cellulaires :.....	22
a) l'ADN, cible majeure des dommages radio-induits :	23
b) Apparition des dommages radio-induits :	24
c) Notion d'atteinte en « cascade » :	25
2. Conséquences tissulaires : les syndromes d'atteinte radiologique :.....	26
a) Syndrome hématopoïétique :	27
b) Syndrome gastro-intestinal :	27
c) Syndrome neuro-vasculaire :	29
d) Syndrome cutané :	29
C. Effets des rayonnements ionisants sur l'intestin :	30
1. Effets précoces d'une irradiation ionisante :	30
2. Effet tardif d'une irradiation ionisante, la fibrose :	34
a) La fibrose, une complication tardive des irradiations pelviennes :	34
b) Les modèles d'étude de la fibrose intestinale radio-induite :	36
III. Structure et fonctions des métalloprotéases matricielles ou MMP :	37
A. Structure des MMP :.....	39
B. Substrats conventionnels et non conventionnels des MMP :	41

IV. Les différents modes de régulation de l'activité des MMP :	42
A. Régulation transcriptionnelle :	42
B. Régulation post-transcriptionnelle :	44
C. La régulation de la sécrétion des MMP :	44
D. L'activation des proMMP :	44
E. Les inhibiteurs endogènes des MMP :	46
F. Catabolisme et clairance des MMP :	49
G. Localisation péricellulaire et activité protéolytique :	50
V. Implication des MMP dans la régulation des signaux cellulaires :	51
A. Remodelage de la matrice extracellulaire et devenir cellulaire :	51
B. Protéolyse de la surface cellulaire et signaux cellulaires :	53
C. Régulation des signaux paracrins :	54
D. Génération et inactivation de molécules bioactives :	54
E. Implication des MMP et des TIMP dans les processus de cicatrisation :	55
VI. Pathologies digestives impliquant les MMP et les TIMP	59
A. Affections digestives non tumorales :	60
B. Affections tumorales digestives :	68
C. MMP et réponse à l'infection intestinale :	71
VII. MMP-TIMP et irradiation :	71
VIII. Stratégie expérimentale :	75
Partie II : Travail expérimental	77
Préambule technique :	78
I. Analyse de l'expression génique différentielle iléale après irradiation, par la technique du Macro Array :	79
1. Objectif de l'approche :	79
2. Limite de la technique :	79
3. Méthodologie :	80
4. Résultats	81
5. Conclusion :	82
II. Article I : MMPs and TIMPs expression increased in rat ileum after X-ray irradiation despite disappearance of CD8a T cells.	83
1. But de ce travail :	83
2. Méthodologie :	83
3. Résultats :	84
4. Conclusion	84
III. Etude des effets d'un inhibiteur des métalloprotéases matricielles sur le remodelage post- radique de l'iléon.	110

1.	Objectif de l'étude :	110
2.	Limite de l'étude :	111
3.	Méthodologie :	111
4.	Résultats :	111
5.	Discussion :	113
6.	Conclusion :	114
IV.	Article II : Abdominal X-ray irradiation in rat colon induced the expression of MMP subtypes specialized in basement membrane degradation.	116
1.	But de ce travail :	116
2.	Méthodologie :	116
3.	Résultats :	117
4.	Conclusion :	117
V.	Article III : Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs and TIMPs in late radiation enteritis.	139
1.	But de ce travail :	139
2.	Méthodologie :	139
3.	Résultats :	140
4.	Conclusion :	140
VI.	Analyse de l'expression génique différentielle et de la sécrétion des MMP et des TIMP, par des cellules musculaires lisses intestinales humaines en culture primaire.	152
1.	Objectif de l'étude :	152
2.	Méthodologie :	153
3.	Résultats :	153
4.	Conclusion :	156
	Partie III : Discussion générale.	159
	Partie IV : Perspectives	182
	Partie V : Références bibliographiques	186

Liste des abréviations

Ac	Anticorps
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
apo A I	Apolipoprotéine I
apo A IV	Apolipoprotéine IV
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CD	Celiac Disease
COL	Collagène
DD	Débit de Dose
DSS	Sulphate de Dextran
EGF	Epithelial Growth Factor
FAS	Fatty Acid Synthase
FGF	Fibroblast Growth Factor
Gy	Gray
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HLA	Humal Leukocyte Antigen
IBD	Inflammatory Bowel Disease
ICC	Cellules interstitielles de Cajal
IFABP	Intestinal Fatty Acid Binding Protein
IgA	Immunoglobuline A
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL-1 β	Interleukine 1béta
IL-2	Interleukine 2
IL-6	Interleukine 6
IL-8	Interleukine 8
IL-10	Interleukine 10
kDa	kilo Dalton
KGF	Keratinocyte Growth Factor
LFABP	Liver Fatty Acid Binding Protein
LIE	Lymphocyte Intra-Epithélial
LTB ₄	Leukotriène B4
MCP-3	Monocyte Chemoattractant Protein-3
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales
MMP	Métalloprotéases matricielles
MT-MMP	MMP membranaires
NF- κ B	Nuclear- Factor kappa B
NO	Oxyde Nitrique
PAI-1	Inhibiteur du Plasminogène de type-1
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PNN	PolyNucléaires Neutrophiles
PWM	lectine PokeWeede Mitogen
RT-PCR	Reverse transcriptase-Polymerase Chain reaction
SEM	Ecart standar à la moyenne
SIG	Syndrome Gastro-Intestinal
SP	substance P
SV40	Simian Virus 40
TGF- β 1	Transforming Growth Factor beta
TIMP	Inhibiteur tissulaire des MMP
TNBS	TriNitroBenzeneSulfonic acid
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
t-PA	Activateur Tissulaire du Plasminogène
TSP-2	Thrombospondine-2
UC	Ulcerative Colitis
U-PA	Urokinase
U-PA	activateur du plasminogène de type urokinase
UVB	Ultra Violet de type B
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Résumé

L'irradiation entraîne un profond remodelage de la structure intestinale à court terme et peut conduire tardivement à la genèse de fibroses.

Avec des techniques immuno-histochimiques, biochimiques et moléculaires, nous avons étudié l'expression des MMP et des TIMP et des facteurs de leur contrôle dans l'iléon et le colon de rat, entre 1 et 7 jours après irradiation, et dans l'iléon de patients présentant une entérite radique.

Chez le rat comme chez l'homme, l'irradiation entraîne l'augmentation de l'expression et de l'activité des MMP et des TIMP et la modification de l'équilibre MMP/TIMP existant. Chez le rat, dans les jours qui suivent l'irradiation, cette modification est en faveur de la dégradation de la matrice extra-cellulaire, tandis que chez les patients on observe un déséquilibre global du renouvellement matriciel ou les rapports collagènes/MMP/TIMP sont en faveur de l'accumulation des constituants matriciels.

Mots clés : Irradiation, Intestin, Remodelage, MMP, TIMP, Collagènes.

Summary

Irradiation induces a marked acute remodeling of the gut wall and may lead to late fibrosis. Combining morphological, biochemical and molecular approach, we studied the expression of MMP and TIMP in the ileum and colon of rats one to seven days after irradiation and in ileum of patients with radiation enteritis. In both studies expression and activity of MMP and TIMP were increased, their balance being in favor of extra-cellular matrix degradation in the acute phase while in favor of matrix accumulation in radiation enteritis.

Key words : Irradiation, Intestine, Remodeling, MMP, TIMP, Collagens.

Partie I : Introduction

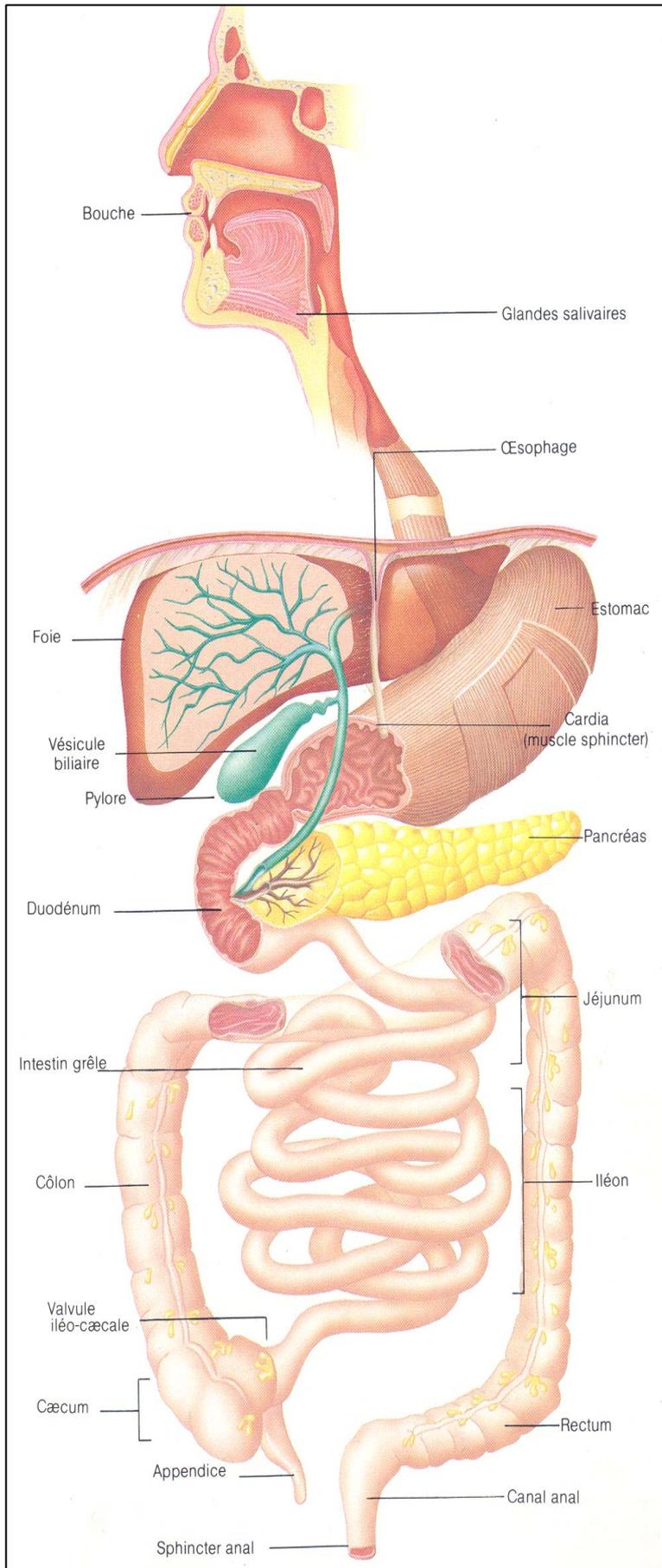


Figure 1 : Schéma du tractus digestif
 tiré de : « Atlas du corps Humain » Marshal Cavendish éditeur, 1986.

I. L'intestin : rappels sur la structure, les fonctions et les acteurs cellulaires :

L'appareil digestif est à la fois une surface d'échanges et une barrière entre l'individu et son environnement, entre les éléments du soi et du non soi, qui intervient à ce titre dans les processus de défense non spécifique et spécifique de l'organisme. L'épithélium de l'intestin grêle est surtout spécialisé dans l'absorption des produits de la digestion, mais est aussi le siège de la défense anti microbienne. Le colon, longtemps considéré comme secondaire par rapport de l'intestin grêle, parce qu'incapable d'absorber les sucres, acides aminés ou petits peptides, réabsorbe cependant approximativement 80% de l'eau et plus de 90% du sodium et du chlore provenant de l'intestin grêle [Wrong *et al.* 1981]. Son énorme capacité absorptive [Debonnie,Phillips 1978], capable de compenser des défauts d'absorption de l'intestin grêle rencontrés dans certaines pathologies [Binder *et al.* 1991], lui permet de jouer un rôle crucial dans la conservation de l'eau au sein de l'organisme et dans le maintien de la constance du milieu intérieur nécessaire à la survie [Bernard 1949] [Wrong *et al.* 1981].

A. Organisation générale du tube digestif :

Sur le plan anatomique, le tube digestif proprement dit comporte successivement l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) puis le gros intestin (cæcum, appendice, côlon ascendant, transverse, descendant et sigmoïde) puis le rectum (figure 1). En fonction des localisations, on constatera des particularités histologiques propres aux deux segments qui ont été plus particulièrement étudiés dans le cadre de notre étude : l'iléon et le colon.

Le tube digestif est constitué de **5 tuniques concentriques** qui sont à partir de la lumière : la muqueuse, la musculaire-muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse puis une tunique conjonctive externe (figure 2).

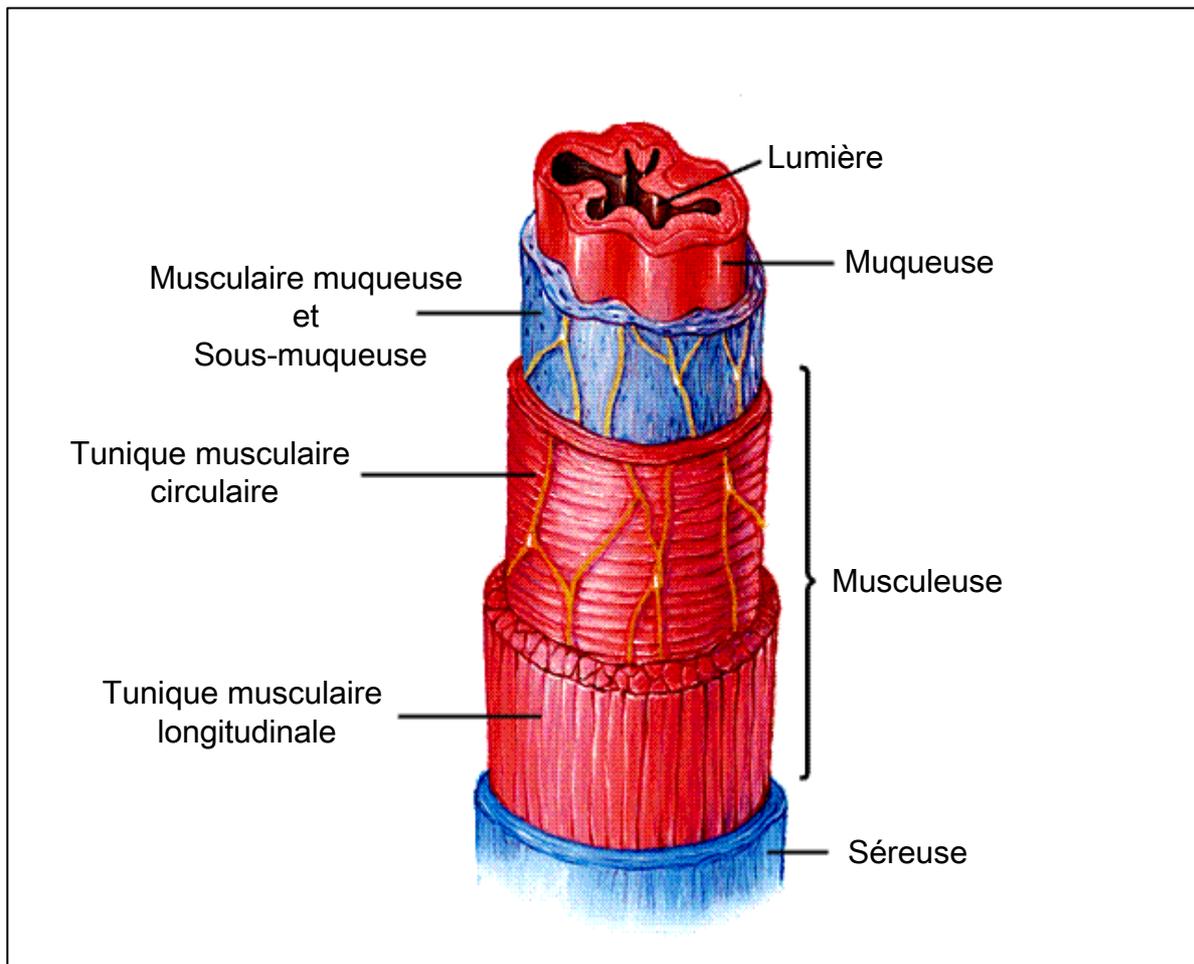


Figure 2 : Le tube digestif est constitué de 5 tuniques concentriques.
(Sylvia S. Mader, Life, 8th edition 1997, Mc Grow-Hill Companies)

La muqueuse comporte un **épithélium** de revêtement en contact direct avec la lumière intestinale, composé d'une couche unique de cellules reposant sur un tissu conjonctif sous-jacent portant le nom de chorion ou de *lamina propria*. Dans le but d'étendre sa surface absorptive, la muqueuse de l'intestin grêle présente, par rapport au colon, une structure repliée composée de cryptes de Lieberkühn, plus nombreuses dans le colon que dans l'iléon, mais aussi de villosités (figure 3 et figure 4). Les cryptes constituent le compartiment prolifératif de l'épithélium. Des cellules souches, localisées dans le tiers inférieur de la crypte, se divisent continuellement pour donner naissance à des progéniteurs à partir desquels se différencient quatre types cellulaires (figure 5) que sont :

■ Les entérocytes, qui représentent le type cellulaire majoritaire et près de 86 % des cellules de la crypte et 95 % de la villosité dans le jéjunum [Cheng, Leblond 1974a; Cheng, Leblond 1974b]. Ce sont des cellules polarisées dont la membrane apicale, en contact avec la lumière intestinale, est constituée de microvillosités. Ces cellules, caractéristiques de l'intestin grêle, sont les principales cellules impliquées dans le processus d'absorption grâce à la présence, à la surface des microvillosités de nombreuses enzymes et transporteurs qui permettent le passage des nutriments. Dans le colon on parle de cellules absorbatives épithéliales ou de cellules principales ou de colonocytes, qui au cours de leur migration vers le sommet des cryptes et la surface de l'épithélium, acquièrent de nombreuses microvillosités au niveau de leur bordure apicale. La présence de ces microvillosités est le reflet morphologique de la polarisation des colonocytes, définissant ainsi les côtés apicaux et basolatéraux. Les bordures apicales et baso-latérales ont des propriétés de transport qui leur sont propres et qui permettent l'établissement de gradients chimiques et électrochimiques nécessaires au transport épithélial. Le rôle prédominant des cellules épithéliales de surface est l'absorption de l'eau et des électrolytes de la lumière vers le compartiment sanguin. Les cellules restant dans la partie haute des cryptes sont cependant capables de mettre en place des processus de sécrétion de chlore et seraient responsables des propriétés sécrétoires des cryptes [Welsh *et al.* 1982]. Les cellules absorbatives épithéliales représentent la majorité des cellules de l'épithélium.

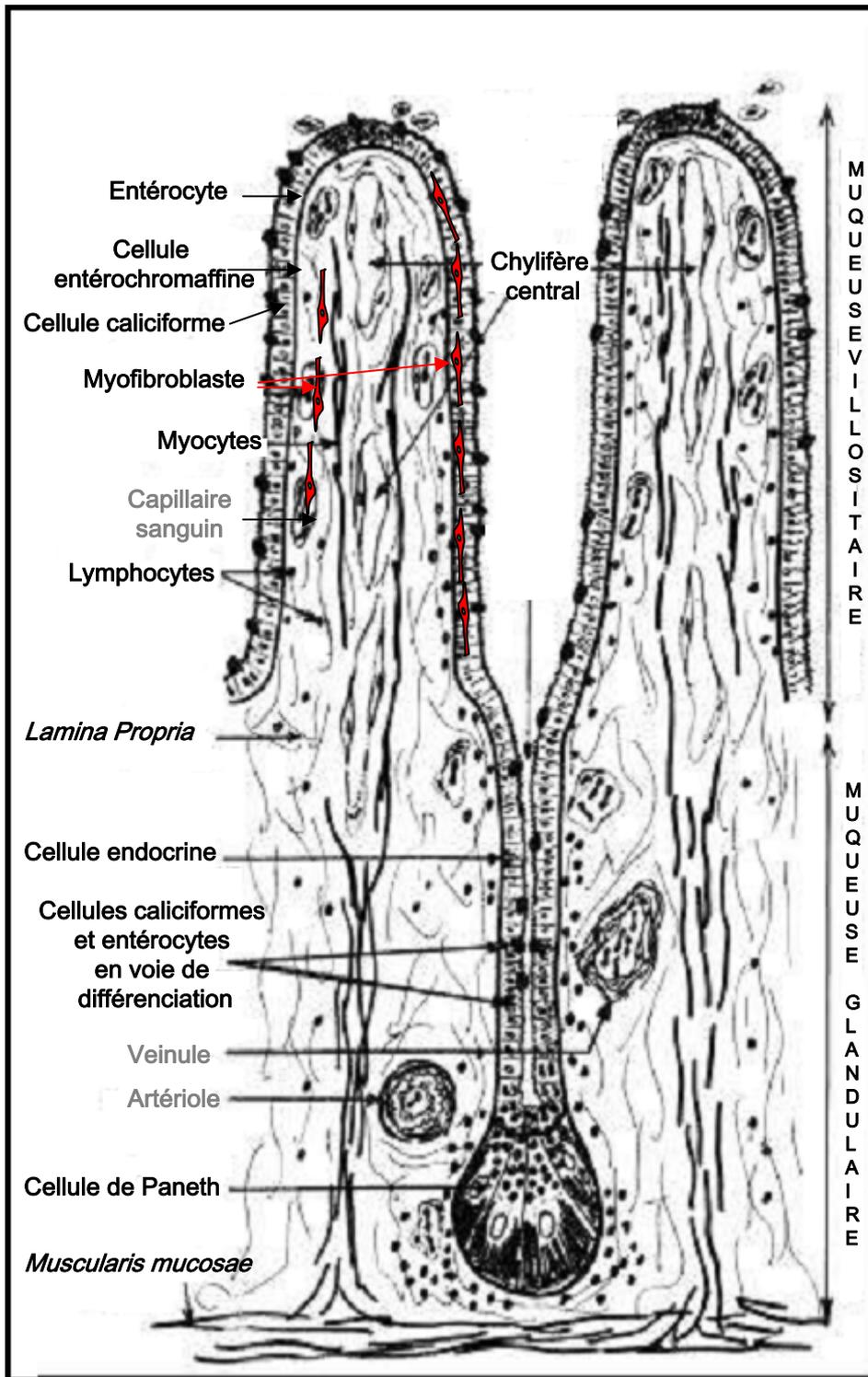


Figure 3 : Structure de l'iléon

■ Les cellules caliciformes (mucosécrétrices) (6 et 4,7 %), sont des cellules sécrétoires bien différenciées, dispersées parmi les entérocytes. Elles contiennent d'importants granules sécrétoires produisant le mucus, substance lubrifiante complexe qui assure à la fois une protection physique et chimique de l'épithélium et une facilitation mécanique du transit des contenus luminaux. La sécrétion de mucus a lieu continuellement par fusion des granules avec la membrane plasmique apicale [Neutra *et al.* 1977], mais peut également être induite directement par exemple en présence de prostaglandines [Plaisancie *et al.* 1997]. Dans le colon, elles sont situées dans la partie haute des cryptes et à la surface de l'épithélium [Specian, Oliver 1991].

■ Les cellules de Paneth (7,5%), observées à la base des cryptes, se distinguent par leurs granules apicaux éosinophiles proéminents. Ces cellules encore mal connues ont une fonction défensive, elles détectent les bactéries et secrètent des peptides anti-microbiens comme les cryptidines [Ayabe *et al.* 2000].

■ Les cellules entéro-endocrines (0,6 et 0,4%), peu nombreuses dans l'intestin grêle, sont nombreuses dans les cryptes coliques et présentent des structures et des fonctions variables. Globalement, elles tendent à avoir un rôle endocrine ou paracrine dans le contrôle du flux sanguin au niveau de la muqueuse, des flux d'électrolytes et de la motricité intestinale, par la libération des différents médiateurs qu'elles contiennent. Il existe deux types principaux de cellules entéroendocrines: les cellules L et les cellules entérochromaffines. Les cellules L sont capables de synthétiser et de stocker le peptide YY et le glucagon [Bottcher *et al.* 1986]. Les fonctions physiologiques de ces cellules restent obscures. Les cellules entérochromaffines ou cellules EC, ont été classifiées ainsi en raison de leur capacité à réduire les sels d'argent, due à la présence de 5-hydroxytryptamine (sérotonine ou 5-HT) dans leurs granules [Erspamer, Asero 1952] [Schofield *et al.* 1967]. Elles représentent ainsi la réserve majeure de sérotonine au niveau du tractus gastro-intestinal. Les cellules entérochromaffines sont capables de synthétiser d'autres amines biogènes telles le peptide YY [Lukinius *et al.* 1986] et la substance P [Alumets *et al.* 1977].

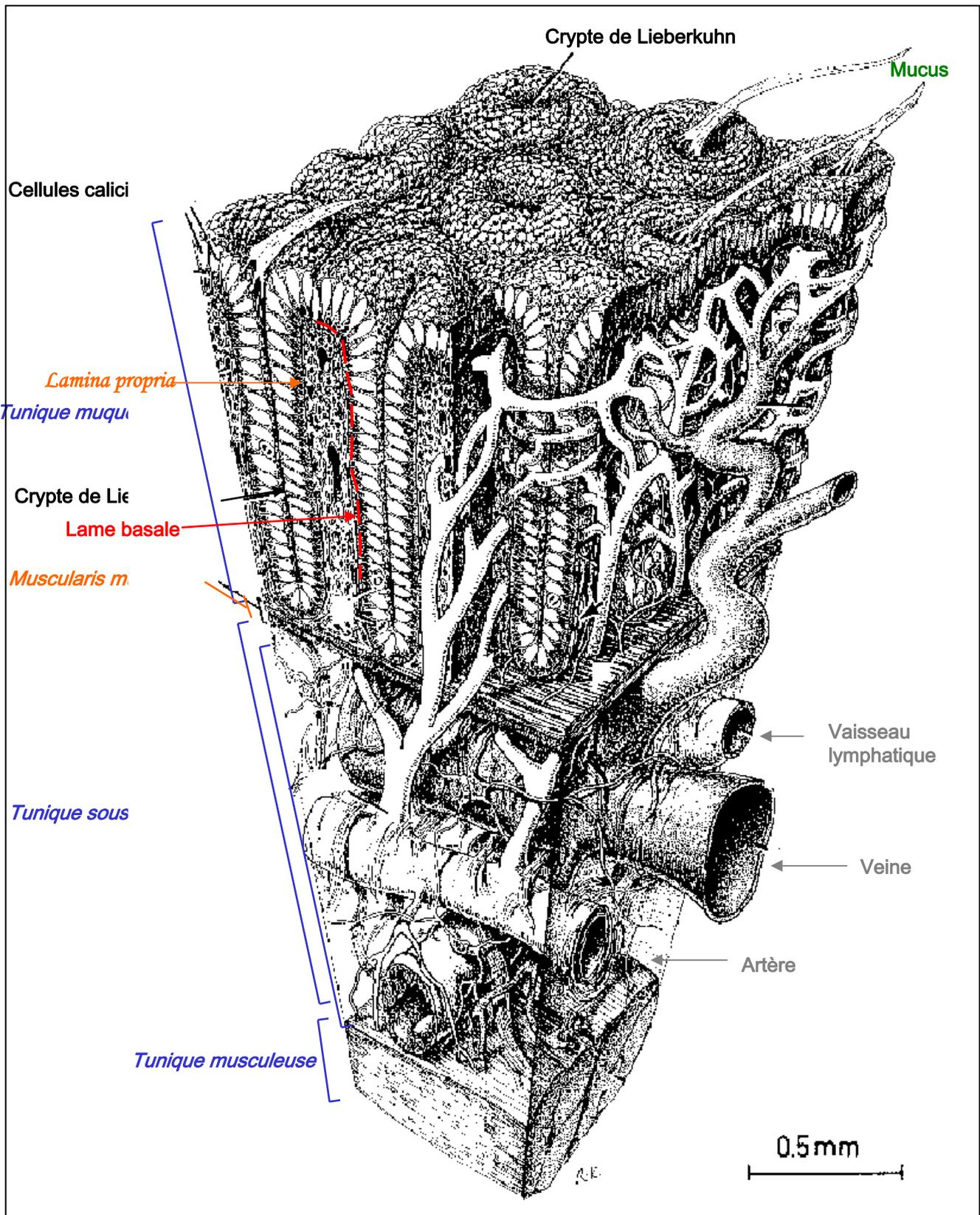


Figure 4 : Structure du colon

En plus de ces quatre grands types cellulaires, il existe d'autres cellules spécialisées, qui seront principalement retrouvées au sein de la *lamina propria*.

La *lamina propria* est une masse cellulaire diffuse, traversée par des vaisseaux sanguins et lymphatiques, nommée chorion et sur laquelle repose l'épithélium de l'intestin grêle comme celui du colon. Elle occupe l'espace entre la membrane basale de l'épithélium et la *muscularis mucosae*. Les populations cellulaires présentes sont nombreuses, dans un état de migration, différenciation et renouvellement permanent. La *lamina propria* peut être considérée comme un organe lymphoïde diffus en raison du grand nombre de cellules de type lymphoïde qu'elle contient [Perey *et al.* 1970], la surveillance immunitaire du tube digestif lui est en grande partie dévolue. Plus de 50% des cellules la constituant sont des cellules plasmiques matures comme les lymphocytes T (à activité cytotoxique classique de défense immunitaire) et B, les macrophages, les plasmocytes à IgA, les éosinophiles, les mastocytes, les cellules dendritiques [Lee *et al.* 1988]. Ces dernières sont observées dans les plaques de Peyer (volumineux agrégats de follicules lymphoïdes primaires et secondaires qui siègent dans le chorion de la muqueuse de la partie terminale de l'iléon) et au sein du chorion villositaire, où elles assurent probablement la présentation des antigènes aux lymphocytes [Mowat 2003] (figure 6). Les lymphocytes, majoritairement des cellules T cytotoxiques, jouent un rôle défensif contre les micro-organismes invasifs; ils sont en moyenne 10 à 20 pour 100 cellules épithéliales villositaires [Hayday *et al.* 2001] et la plupart du temps insérés entre les entérocytes, on parle alors de LIE pour « Intra Epithelial Lymphocyte ».

On notera aussi la présence des cellules M, produites dans les cryptes adjacentes aux plaques de Peyer de l'iléon, mais aussi présentes dans le colon. Elles assurent le transport de nombreux antigènes, de micro-organismes et macromolécules luminales (comme les immunoglobulines), à travers l'épithélium, de la lumière intestinale vers les follicules lymphoïdes sous-jacents. Elles permettent ainsi au système immunitaire de tester en permanence le contenu de l'intestin [Hamzaoui *et al.* 2000].

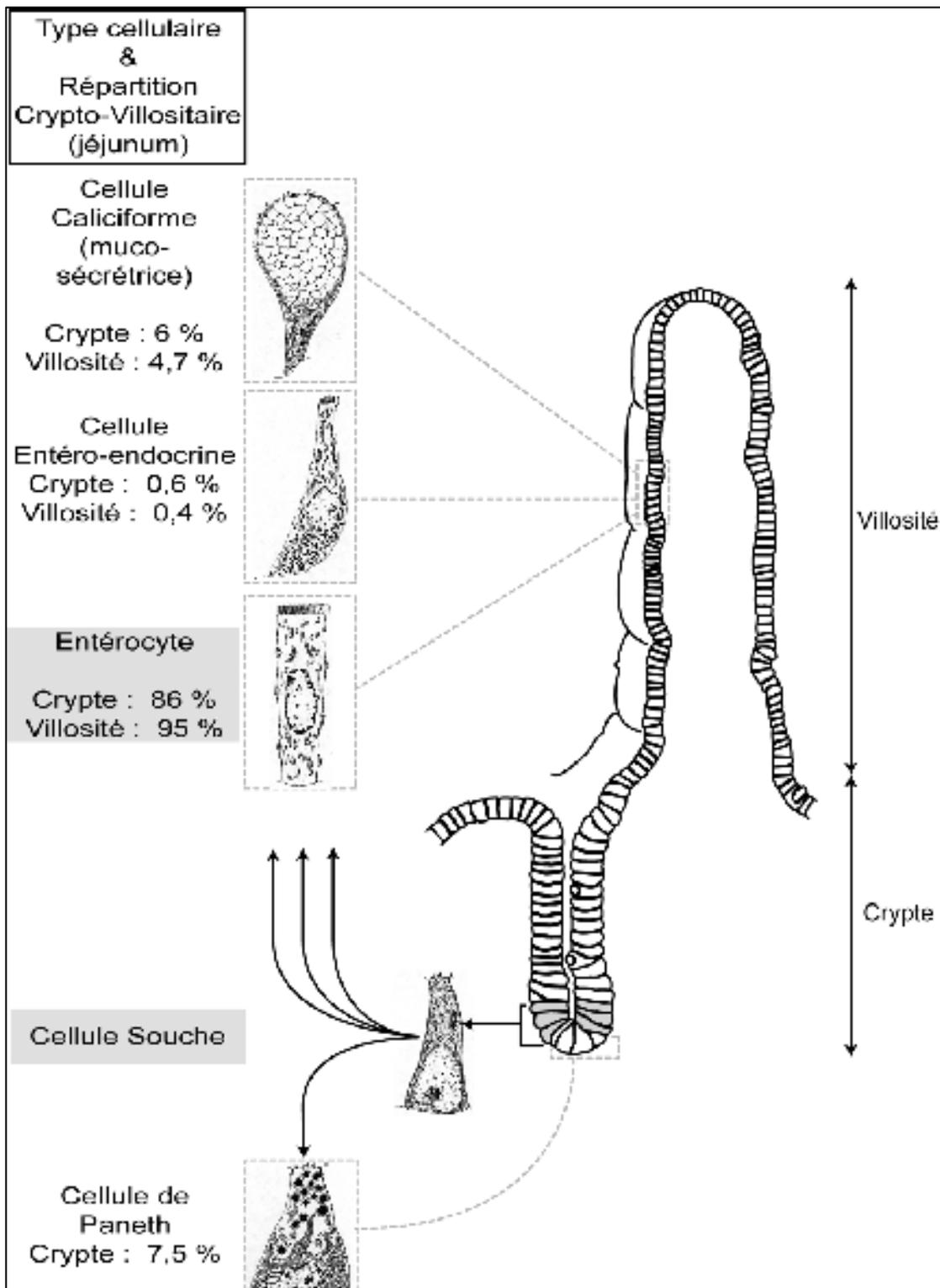


Figure 5 : les cellules souches se divisent pour donner naissance à des progéniteurs à partir desquels se différencient 4 types cellulaires (reproduit avec l'aimable autorisation de Stéphane Fouquet, Thèse de l'université Paris VI, 2004).

Aux différents types cellulaires précédemment présentés s'ajoutent les myofibroblastes et les fibres nerveuses. En association avec des fibres de collagène et des structures riches en mucopolysaccharides, les myofibroblastes sont localisés à la base de l'épithélium et forment une gaine ou manchon péricryptique qui englobe les cryptes. Les myofibroblastes, ainsi nommés parce qu'ils présentent des similarités structurelles et d'immunoréactivité avec les cellules musculaires lisses [Richman *et al.* 1987], sont des éléments cellulaires clef de la physiopathologie du tractus gastro-intestinal. Les études menées par le groupe de R. Mahida ont mis en évidence, l'implication de ces cellules dans la synthèse et la sécrétion des constituants de la MEC comme le collagène IV [Mahida *et al.* 1997], dans l'accroissement de la restitution [McKaig *et al.* 1999] et dans la synthèse et la sécrétion de MMP et TIMP [McKaig *et al.* 2000].

On notera que la densité en cellules à caractère immun de la lamina propria est nettement plus importante dans l'intestin grêle que dans la colon, sans doute en raison des rôles respectifs joués dans la défense antimicrobienne par les différents segments du tractus intestinal.

La musculaire-muqueuse est constituée d'une mince couche de tissu musculaire lisse, qui assure la mobilité de l'épithélium ; elle est absente aux extrémités du tube (1/3 supérieur de l'œsophage et canal anal).

La sous-muqueuse est constituée d'un tissu conjonctif relativement lâche et paucicellulaire où sont retrouvés principalement des fibroblastes, quelques macrophages, des mastocytes et occasionnellement des polynucléaires éosinophiles ou basophiles. Cette structure contient un réseau de vaisseaux sanguins et lymphatiques, d'artères, ainsi que des fibres nerveuses motrices et sensibles qui constituent le plexus sub-muqueux ou plexus nerveux de Meissner.

La musculature a une disposition générale en 2 couches de tissu musculaire lisse : circulaire interne et longitudinale externe. Entre ces deux couches se situe le plexus nerveux myentérique ou plexus d'Auerbach. Au sein de ces deux couches musculaire, il existe un type

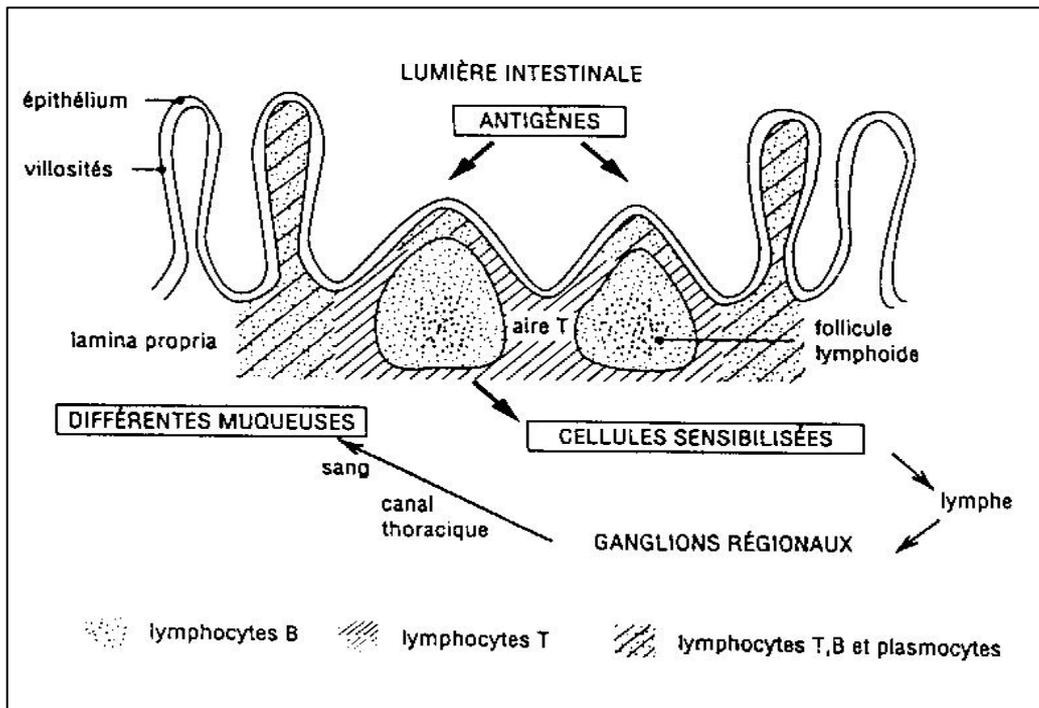


Figure 6a : Représentation schématique d'une plaque de Peyer

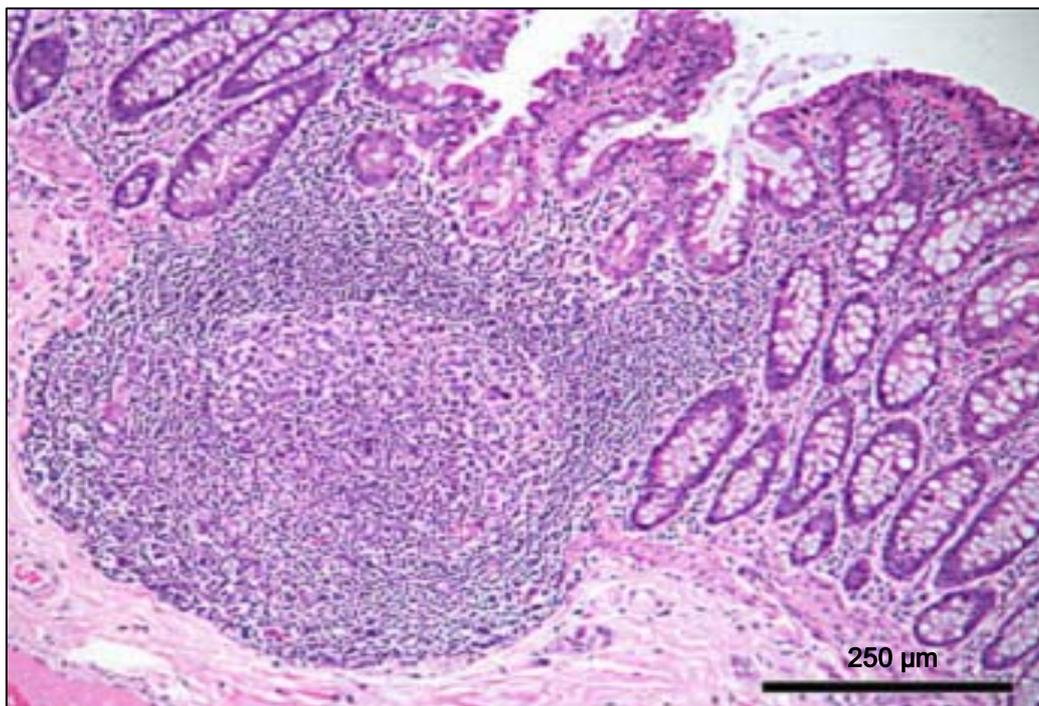


Figure 6B : Photographie d'une plaque de Peyer après coloration hémalun-éosine

cellulaire particulier : les cellules interstitielles de Cajal aussi nommées ICC. Ces cellules, véritables « pace maker », génèrent des vagues de contractions spontanées des muscles lisses intestinaux [Thuneberg *et al.* 1995] qui facilitent le mouvement des contenus luminaux.

La tunique externe est soit une adventice, soit une séreuse. Aux extrémités du tube digestif la tunique externe est constituée par un tissu conjonctif lâche qui la rend solidaire aux organes voisins ; on lui donne le nom d'adventice. Entre ces deux extrémités, la tunique externe comporte un tissu conjonctif tapissé sur son versant externe par un épithélium simple (mésothélium), constituant ainsi le feuillet viscéral de la séreuse péritonéale. On lui donne alors le nom de **séreuse**.

B. Matrice extra-cellulaire et lame basale : structure et fonction :

Tous les épithélia reposent sur une structure organisée de la matrice extracellulaire (MEC) qu'est la lame basale. D'épaisseur variable, elle sépare l'épithélium du tissu conjonctif sous-jacent à partir duquel diffusent l'oxygène et les métabolites nécessaires aux épithélia. Les différents constituants de la matrice extracellulaire sont synthétisés à la fois par les cellules épithéliales et par les cellules mésenchymateuses [Kedinger *et al.* 1998]. La lame basale joue un rôle important dans l'adhésion cellulaire et l'organisation du cytosquelette. Elle influence aussi, au sein d'un ensemble fonctionnel incluant l'épithélium lui-même, les cellules mésenchymateuses, des facteurs trophiques (hormones, nutriments, facteurs de croissance) mais aussi la lame basale elle-même, la prolifération et la différenciation de l'épithélium intestinal. Au vu de ces éléments il est aisé d'appréhender l'importance de la lame basale et plus généralement de la matrice extracellulaire dans le devenir cellulaire et dans le dialogue entre le mésenchyme et l'épithélium intestinal. Ce dialogue, indispensable au cours du développement, l'est toujours au stade adulte [Kedinger *et al.* 2000].

La majeure partie des travaux portant sur les constituants matriciels et les intégrines dans l'intestin concerne essentiellement le développement embryonnaire et non le stade adulte. Il existe néanmoins quelques données dans la littérature qui permettent de connaître le profil

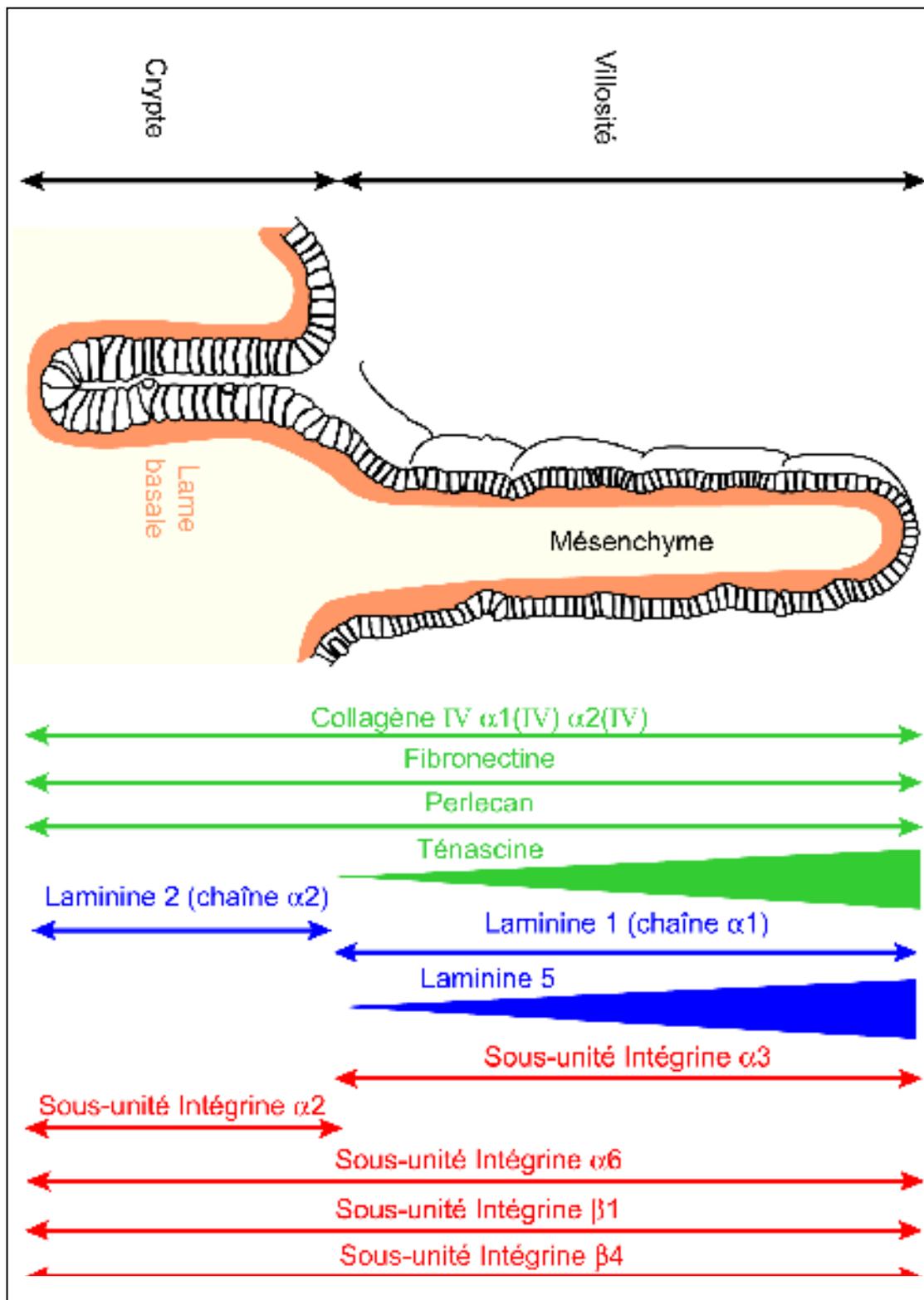


Figure 7 : Localisation cryptovillonnaire des constituants de la matrice extracellulaire et des intégrines (reproduit avec l'aimable autorisation de Stéphane Fouquet, Thèse d'université Paris VI, 2004).

d'expression de quelques constituants de la matrice extracellulaire et de sous-unités d'intégrines (Figure 7).

1. Constituants matriciels des lames basales :

Le terme de lame basale décrit, sur la base d'études ultra-structurales, une structure amorphe et dense aux électrons, mesurant de 50 à 100 nm d'épaisseur [Kalluri 2003]. Similaire à la matrice extracellulaire présente partout au niveau des interstitiums, elle diffère de cette dernière en densité et en composition. En plus de son rôle structural, elle participe à la signalisation en permettant aux cellules de recevoir des informations de la part de leur micro-environnement [Kalluri 2003].

Les lames basales sont constituées de matériels insolubles enchâssés qui forment des composites de plusieurs glycoprotéines. Plus de 50 protéines entrant dans la composition des lames basales ont été répertoriées à ce jour, parmi lesquelles les collagènes représentent à eux seuls près de 50% de tous les constituants répertoriés. Le collagène de type IV est le type de collagène le plus répandu dans les lames basales parmi les vingt-cinq types décrits chez les mammifères; aussi appelé le "collagène formant des réseaux" (collagen forming network), il diffère des autres types dits "fibrillaires" (types I, II et III) par sa capacité à s'auto-assembler. Il est constitué d'un trimère de chaînes α polypeptidiques, codés par six gènes ($\alpha 1(IV)$ à $\alpha 6(IV)$) [Kalluri 2003]. Au niveau de la lame basale intestinale adulte, on trouve les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ formant l'isoforme $\alpha 1(IV)_2\alpha 2(IV)$ [Kedinger *et al.* 2000]. Cette isoforme est la plus représentée dans les lames basales et présente une localisation uniforme le long de l'axe crypto-villositaire [Coopersmith *et al.* 1997].

Les laminines sont constituées de trois chaînes polypeptidiques génétiquement distinctes α , β et γ reliées par des ponts disulfures. A ce jour, douze laminines différentes ont été décrites [Colognato, Yurchenco 2000]. Quatre sont présentes dans la lame basale séparant l'épithélium intestinal du mésenchyme sous-jacent : la laminine 1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$), la laminine 2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$), la laminine 5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$) et la laminine 10 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$). Chez les rongeurs, les laminines 1

et 2 sont restreintes aux cryptes dans l'intestin adulte, les laminines 5 et 10 sont elles, restreintes aux villosités [Kedinger *et al.* 2000]. Chez l'Homme, on observe une répartition de la laminine 1 avec un profil d'expression croissant de la base au sommet de la villosité ainsi que l'absence de laminine 10 [Kedinger *et al.* 2000].

A la différence du collagène et des laminines, le nidogène, le perlécan et les autres constituants des membranes basales ne sont pas capables de s'auto-assembler. Le perlécan est un protéoglycane à héparane sulfate qui présente une large distribution tissulaire; il interagit notamment avec le collagène IV [Villar *et al.* 1999] [Hopf *et al.* 1999], la fibronectine [Isemura *et al.* 1987; Heremans *et al.* 1990; Hopf *et al.* 1999] et la laminine 1 [Olsen 1999]. Son expression est constante tout le long de l'axe crypto-villositaire [Kedinger *et al.* 2000]. La fibronectine est constituée d'un dimère de deux sous-unités liées de manière covalente par deux ponts disulfures. Chez l'homme, il existe vingt formes de fibronectine issues de l'épissage alternatif d'un gène unique. Elle compte près d'une douzaine de récepteurs parmi les membres de la famille des intégrines, le plus répandu étant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ [Pankov, Yamada 2002]. La fibronectine est exprimée de façon décroissante le long de l'axe crypto-villositaire [Kedinger *et al.* 2000].

Les ténascines (Tn-C, Tn-R, Tn-X, Tn-Y, Tn-W) sont des glycoprotéines caractérisées par des structures multi-branches. La ténascine-C que l'on retrouve dans l'intestin humain et murin est distribuée de façon croissante le long de l'axe crypto-villositaire [Probstmeier *et al.* 1990] [Belanger, Beaulieu 2000], à l'inverse de la fibronectine.

Au niveau non plus de la répartition crypto-villositaire mais tissulaire, on retiendra que la MEC de la muqueuse est principalement composée de collagène de type IV, de protéoglycanes sulfatés (héparine sulfate) et de laminine [Stanley *et al.* 1982], la *lamina propria* de collagènes de type I, III, IV et V, et la musculature de collagènes de type I et III [Epstein, Munderloh 1975].

2. Les récepteurs de la matrice extracellulaire, les intégrines :

Les récepteurs majeurs de la matrice extracellulaire, les intégrines, forment une large famille de récepteurs transmembranaires hétérodimériques, constitués d'une sous-unité

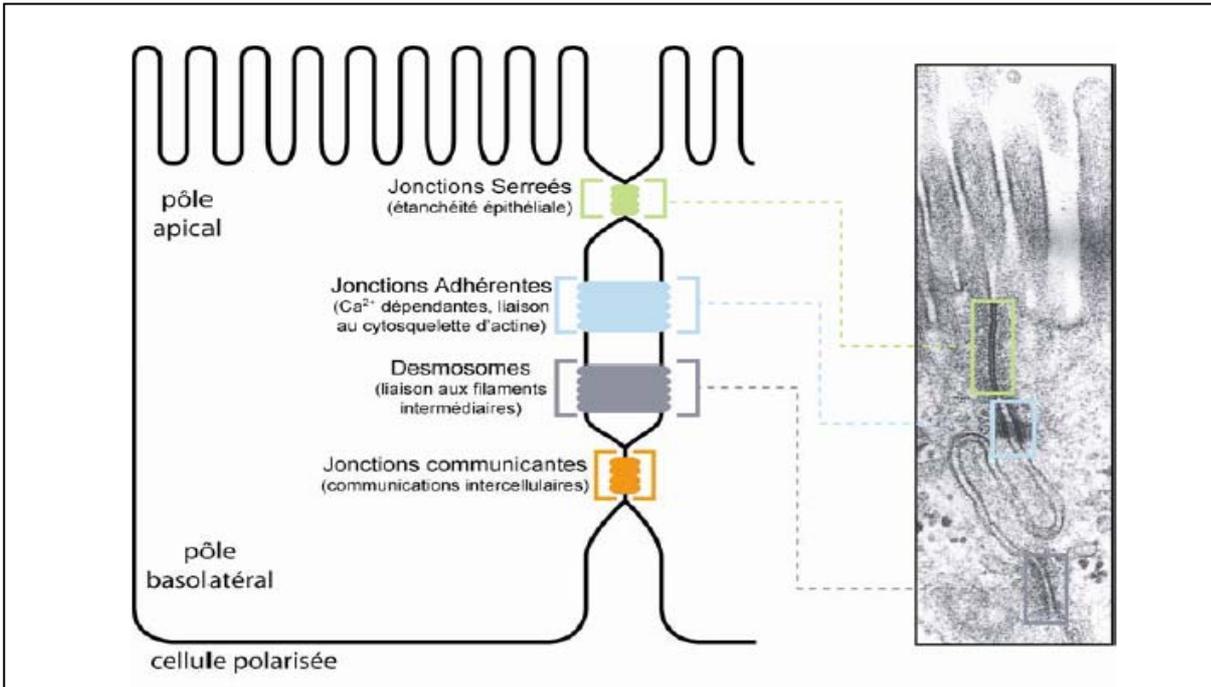


Figure 8 a : Répartition des différentes jonctions intercellulaires dans les cellules épithéliales (reproduit avec l'aimable autorisation de Stéphane Fouquet, Thèse d'université Paris VI, 2004).

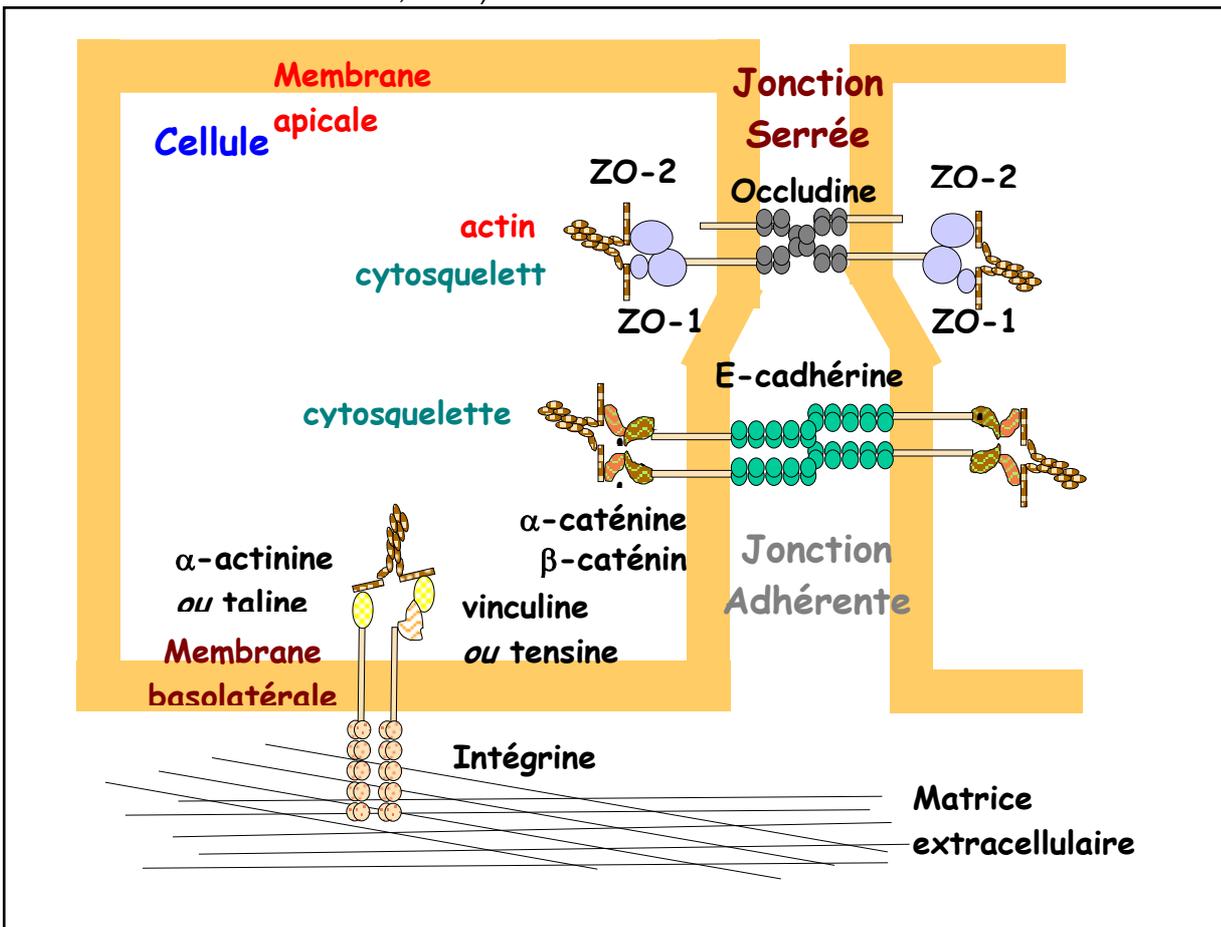


Figure 8 b : Composition schématique des différents types de jonctions cellule-cellule et cellule-matrice

régulatrice α et d'une sous-unité β assurant la transduction du signal [Fuchs *et al.* 1997]. A ce jour, dix-huit sous-unités α , huit sous-unités β et vingt-quatre combinaisons ont été identifiées [Hynes 2002]. C'est la combinaison des différentes sous-unités α et β qui procure la spécificité du récepteur envers les éléments matriciels. Des séquences consensus ont été identifiées concernant les sites de fixation des éléments de matrice à leurs récepteurs, telle que la séquence peptidique RGD (Arg-Gly-Asp) qui est retrouvée au sein de la fibronectine et de la vitronectine. Au niveau intracellulaire, une multitude de protéines du cytosquelette, de protéines de signalisation ou des protéines adaptatrices peuvent interagir avec les domaines intracytoplasmiques des intégrines et ainsi participer à leur activation [Travis *et al.* 2003]. En plus de leur fonction de récepteur des constituants de la matrice extracellulaire, les intégrines servent de lien entre la matrice et le cytosquelette de la cellule, et plus précisément avec les microfilaments d'actine. Les protéines interagissant avec les domaines intracytoplasmiques des intégrines sont multiples et permettent une variété de mécanismes de signalisation. Les intégrines sont impliquées dans le transfert d'informations entre la cellule et son environnement extracellulaire et ce de manière bidirectionnelle ("inside out" et "outside in").

C. Les jonctions cellule épithéliale-cellule épithéliale et cellule épithéliale-matrice :

Dans les organismes multicellulaires, les cellules reconnaissent les cellules voisines, adhèrent à celles-ci et forment des jonctions intercellulaires qui ont un rôle important dans des processus cellulaires majeurs tels que la morphogenèse, la différenciation, la prolifération, la migration et la survie [Gumbiner B. M. 1996; Grossmann 2002]. Les jonctions intercellulaires sont généralement associées au cytosquelette, ce qui renforce l'adhésion intercellulaire et participe à la polarisation des cellules épithéliales. Dans ces cellules, l'adhésion intercellulaire est réalisée par des complexes jonctionnels comprenant les desmosomes, les jonctions adhérentes ou *zonula adherens* et les jonctions serrées ou *zonula occludens* [Farquhar, Palade 1963] (Figures 8a et 8b). La fonctionnalité de l'épithélium repose, entre autres, sur la présence

et l'intégrité des jonctions intercellulaires, permettant ainsi la continuité de la monocouche de cellules épithéliales et de ce fait son étanchéité.

■ Les jonctions serrées sont localisées à la base du pôle apical des cellules et formées par l'assemblage de complexes multimoléculaires (ZO-1, ZO-2, occludine...) enchâssés dans des microdomaines membranaires spécialisés. Elles sont liées au cytosquelette d'actine et ont deux fonctions principales : premièrement rendre l'épithélium imperméable aux ions ainsi qu'aux solutés et deuxièmement délimiter les domaines membranaires apical et basolatéral, ce qui permet la ségrégation des composants membranaires (protéiques et lipidiques) de ces deux domaines [Zahraoui *et al.* 2000; Matter, Balda 2003].

■ Les jonctions *adherens* et les desmosomes, localisés au niveau de la membrane latérale de la cellule, sont liés respectivement au cytosquelette d'actine et aux filaments intermédiaires [Matter, Balda 2003]. En fonction des épithélia, les composants des jonctions *adherens* (E-cadhérine, a-caténine, b-caténine ...) se retrouvent juste en dessous des jonctions serrées et sont liés à la ceinture d'actine corticale ou peuvent être répartis tout le long de la membrane latérale des cellules [Fleming *et al.* 2001]. Les jonctions adhérentes participent à la mise en place des jonctions serrées et des desmosomes [Gumbiner B. *et al.* 1988]. Les desmosomes quant à eux sont localisés le long de la membrane latérale des cellules formant un épithélium monocouche [Green, Gaudry 2000].

D. Renouvellement cellulaire :

La muqueuse intestinale est un des tissus qui se renouvelle le plus dans l'organisme, en effet son renouvellement complet est réalisé en deux à trois jours chez les rongeurs ainsi que chez d'autres mammifères [Wright, Alison 1984]. Chez l'homme il intervient en cinq à six jours [MacDonald W. C. *et al.* 1964]. A l'échelle de l'organisme, ce laps de temps très court permet la division cellulaire au sein de la crypte, la migration des cellules le long de la crypte et l'acquisition concomitante d'un phénotype différencié pour ensuite, à la sortie de la crypte, pouvoir remplir leurs fonctions spécifiques durant leur migration le long de la villosité. Cette migration prend fin au sommet de la villosité où les cellules sont éliminées. Le maintien de la

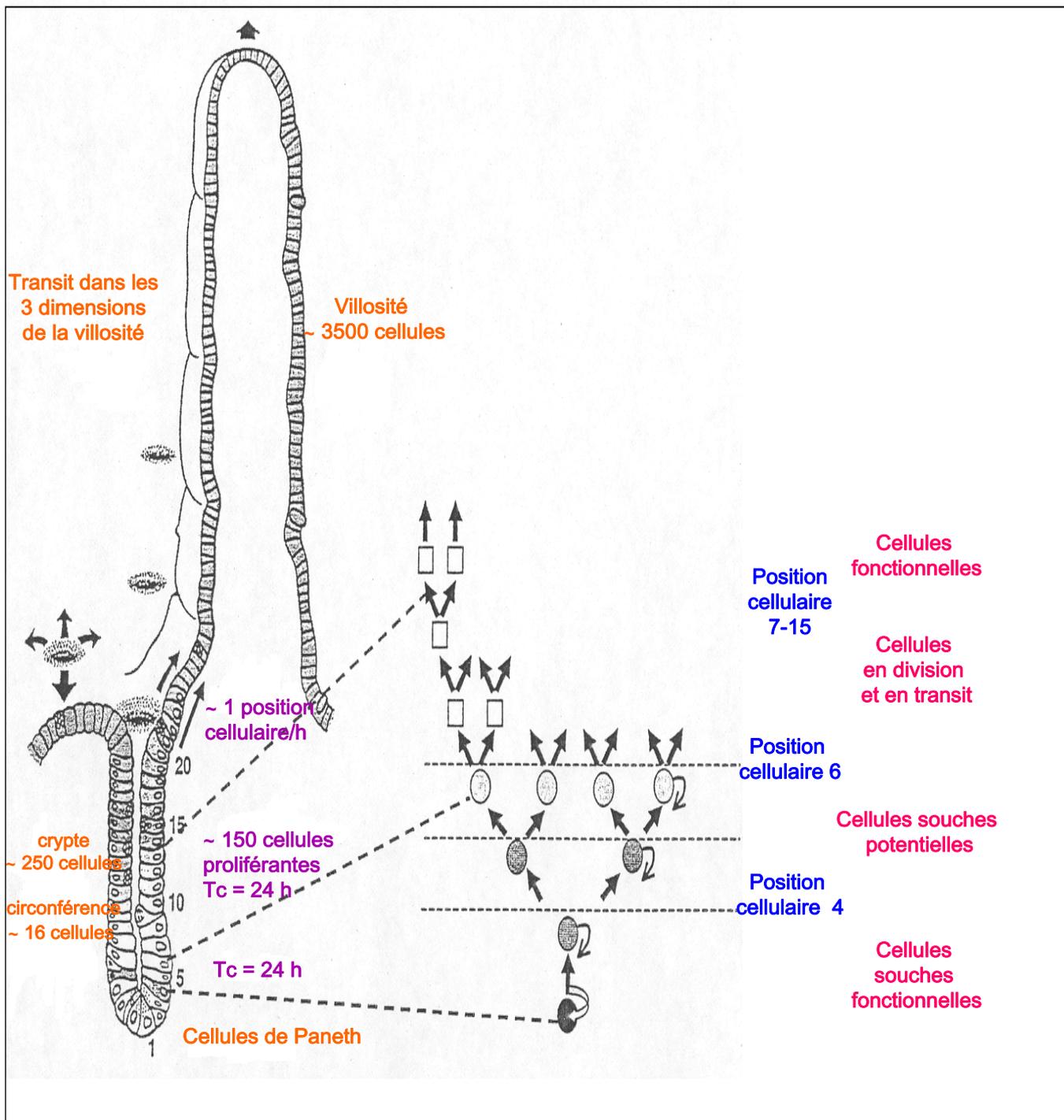


Figure 9 : Renouveau cellulaire dans l'intestin grêle

D'après Christopher S. Potten, dans *Radiation and Gut*, (1995) et *Radiation Research* **161**, (2004) p123-136.

fonctionnalité des différents types cellulaires dépend de la division continue des cellules proliférantes au sein de la crypte, qui va assurer le renouvellement de l'épithélium.

Il existe deux niveaux de régulation de l'homéostasie de l'épithélium intestinal : le premier concerne la prolifération dans la crypte, le deuxième l'élimination des cellules au sommet de la villosité. Le contrôle de la balance prolifération / élimination des cellules permet une régulation fine de l'homéostasie de l'épithélium intestinal.

1. La prolifération cellulaire intestinale :

La prolifération est confinée dans les cryptes de Lieberkühn, elle est détectée à la base et dans la portion moyenne de la crypte [Cheng, Leblond 1974a; Cheng, Leblond 1974b]. Chez la souris, chacune des 750 000 cryptes [Marshman *et al.* 2002] contient en moyenne 250 cellules épithéliales sur une hauteur de 25 cellules, pour une circonférence de 16 cellules et chaque crypte produit environ 300 nouvelles cellules par jour [Gordon *et al.* 1997; Potten *et al.* 1997] (figure 9). La cellule souche est capable de générer deux cellules filles différentes selon un mode de division asymétrique. Cette hypothèse, formulée par J.Cairns en 1975 [Cairns 1975], suggère qu'une cellule souche se divise tout en conservant sélectivement (et non pas aléatoirement) un brin d'ADN matrice. Ce mode de réplication, que l'on retrouve pour toutes les cellules souches adultes des tissus somatiques [Sherley 2002], permet de générer d'une part une nouvelle cellule souche et d'autre part une cellule fille qui va servir de progéniteur "transitoire" et se diviser dans la partie médiane de la crypte. Cette hypothèse a été récemment confirmée dans l'épithélium intestinal par Potten et collaborateurs [Potten *et al.* 2002] (figure 9).

La cellule souche donne ainsi naissance à des cellules filles qui vont se diviser à leur tour quatre à six fois, formant ainsi des cohortes d'environ 150 cellules de transit dans la portion moyenne de la crypte [Potten *et al.* 1997]. Ces cohortes de cellules se différencient au cours de leur migration au sein de la crypte. Une fois différenciées, les cellules continuent leur migration le long de la villosité et sont exfoliées à l'apex de celle-ci. La durée moyenne du cycle cellulaire dans l'intestin grêle de souris est l'un des plus rapide répertorié chez les mammifères, soit

environ 12 h, dans le colon il est un peu plus long et prend 18 h. Chez l'Homme ces temps sont respectivement estimés à 36-48 h dans l'intestin grêle et à 60-80h dans le côlon [Potten 2004].

Des études réalisées sur des souris chimères ont permis de montrer que chaque crypte était monoclonale [Ponder *et al.* 1985] [Stappenbeck *et al.* 1998], c'est-à-dire qu'elle contient des cellules épithéliales ayant le même génotype. Ce concept reste néanmoins discuté, certains estimant qu'il existe en moyenne quatre à cinq cellules souches au sein de chaque crypte [Bjerknes, Cheng 1999]. En revanche, chaque villosité est alimentée par plusieurs cryptes, de trois à six en fonction de la localisation le long de l'axe duodéno-ileal [Wright, Irwin 1982], ce qui entraîne un nombre de cellules variant de 2000 à 7000 par villosité [Wright, Alison 1984].

2. L'apoptose dans l'intestin :

L'apoptose permet de réguler le nombre de cellules intestinales produites au sein de la crypte, elle intervient également dans l'élimination des cellules différenciées qui ont atteint le sommet de la villosité. A ce jour, on ne sait pas si l'apoptose précède l'exfoliation des cellules ou si elle est une conséquence du détachement des cellules du mésenchyme sous-jacent. C'est cette deuxième hypothèse qui est actuellement privilégiée : les entérocytes atteignant le sommet de la villosité seraient éliminés par *anoikis*, l'apoptose induite par la perte de l'adhésion cellulaire.

L'homéostasie des cryptes est en partie assurée grâce à un contrôle précis du nombre de cellules souches, dans lequel l'apoptose est impliquée [Potten 1997]. Les cellules présentant une morphologie apoptotique sont détectées surtout à la position supposée des cellules souches. Elles représentent une proportion significative (1 à 10%) de la totalité des cellules localisées à cette position à chaque instant, ce qui suggère que l'apoptose spontanée dans la crypte intestinale est destinée à éliminer les cellules souches en excès et donc à contrôler le nombre de cellules qui vont se différencier en quittant la crypte. L'élimination des cellules apoptotique de la crypte semble être assurée par des phagocytes [Pritchard, Watson 1996].

Le flux de cellules en cours de migration le long de la villosité a été estimé à 1000-1400 cellules par villosité et par jour [Potten, Hendry 1983]. Il faut donc, pour préserver l'homéostasie du tissu, qu'un nombre équivalent de cellules soit éliminé. Les mécanismes qui contrôlent l'élimination des entérocytes au sommet de la villosité restent discutés. Gavrieli et collaborateurs [Gavrieli *et al.* 1992] ont montré, par la technique TUNEL, qu'il existait une coiffe de cellules apoptotiques au sommet de la villosité, suggérant pour la première fois un rôle de l'apoptose dans l'exfoliation des entérocytes. Cependant, d'autres travaux ont montré que la technique TUNEL ne semble pas être la technique la plus appropriée pour détecter l'apoptose dans le tissu intestinal du fait de nombreux faux-positifs [Hall *et al.* 1994; Marshman *et al.* 2001]. Dans des conditions optimales de préparation des tissus, on observe la présence d'un petit nombre de cellules apoptotiques au sommet de la villosité (en moyenne une cellule apoptotique par coupe de villosité). Lorsque ce chiffre est rapporté à l'épaisseur d'une villosité et au temps estimé de la disparition de la cellule apoptotique, on obtient 960 à 1200 cellules par villosité et par jour [Hall *et al.* 1994]. Cette observation est compatible avec le nombre estimé de cellules produites dans la crypte et confirme que l'apoptose est un mécanisme possible d'élimination des cellules de l'épithélium intestinal.

Les mécanismes de contrôle de l'apoptose dans le tissu intestinal restent mal connus. Malgré le nombre croissant de méthodes immunohistochimiques ou biochimiques permettant de détecter l'apoptose dans les phases les plus précoces, les études sur l'intestin sont rendues difficiles du fait que la plupart de ces techniques ne sont utilisables que sur des cellules isolées ou des modèles cellulaires et non sur les tissus eux-mêmes. Les cultures primaires d'entérocytes n'existent pas du fait de l'impossibilité de faire survivre des entérocytes *ex vivo* et toutes les lignées cellulaires intestinales établies à ce jour sont transformées ou d'origine cancéreuse et présentent une balance prolifération / mort cellulaire modifiée.

II. Effets de l'irradiation :

La radiobiologie a pour objectif une meilleure compréhension des pathologies radio-induites en vue d'une protection des populations et des travailleurs vis à vis du risque radiologique, mais également vis à vis des conséquences d'une radiothérapie en permettant une modélisation plus fine qui permet à la fois d'assurer un meilleur contrôle tumoral et de minimiser les effets des rayonnements ionisants sur les tissus sains.

A. Nature des expositions aux rayonnements ionisants :

1. Exposition accidentelle :

Des dysfonctionnements survenus sur des installations nucléaires civiles (Tchernobyl 1987) ou militaires (Tcheliabinsk 1957) ont donné lieu à des accidents radiologiques marquants, dont ont été victimes à la fois des travailleurs et le public. Les accidents d'irradiation sont tout à fait exceptionnels, en effet le Laboratoire de Dosimétrie Biologique, dont la mission est d'estimer la dose reçue à partir du dénombrement des anomalies chromosomiques instables sur les lymphocytes circulants, est amené dans le cadre de suspicion d'accident à faire en moyenne 15 expertises de dosimétrie par an, dont seulement 10 % des cas traités montreront un nombre de chromosomes discentriques supérieur à la fréquence observée dans la population normale. Ces accidents d'irradiation sont observés essentiellement en milieu industriel (85% des cas), on citera à titre d'exemple les accidents de Brescia (1975), Soreq (1990), Biélorussie (1991) et Tokaï Mura (1999). Ces accidents peuvent aussi survenir en milieu médical (15% des cas), et toucher alors le public (Goiania 1987, Istanbul 1998) ou les patients (Indiana 1992, Costa Rica 1996). Les progrès réalisés dans le diagnostic et la prise en charge des accidentés permettent de prolonger leur vie. Ces patients peuvent développer alors des pathologies radio-induites chroniques dont la prise en charge s'avère particulièrement délicate [Lefaix, Daburon 1998]. Lors d'irradiations accidentelles, S'il y a point de contact le point avec la source ce point reçoit la dose maximale et évolue rapidement vers la radionécrose, sans point de contact les dommages se répartissent à distance du point central selon des courbes

d'isodoses. Ainsi les dommages infligés à distance du point central impliquent des doses moins importantes. Ces accidents impliquent en règle générale des irradiations à fortes doses, localisées aux mains, cuisses, thorax ou pieds. De par sa localisation, la peau est la cible primaire de l'irradiation. Lors des accidents de Géorgie (Lilo en 1996-97 et Lia en 2001) et de Pologne (2002), les lésions observées étaient de type cutané, très sévères et consistaient essentiellement en des lésions nécrotiques. Leur traitement se limite actuellement à la résection chirurgicale, suivie d'une greffe de peau. Les chirurgiens se heurtent au problème récurrent de la réactivation tissulaire tardive des zones irradiées, accompagnées de poussées inflammatoires, pouvant nécessiter des ré-interventions itératives.

2. La radiothérapie :

La radiothérapie a pour objectif de délivrer à la tumeur la dose maximale nécessaire au contrôle tumoral tout en préservant au maximum les tissus sains adjacents. L'optimisation des configurations d'irradiation, de la balistique, de l'imagerie médicale et des protocoles de traitements ont permis de réduire aux maximum les effets secondaires inévitables à ce type de traitement. Cependant les doses élevées utilisées engendrent des phénomènes de toxicité aiguë et tardive. La toxicité aiguë est observée chez tous les patients. Elle peut être très sévère et nécessiter chez certains patients radiosensibles une modulation du protocole d'irradiation, mais elle n'est en général que transitoire et rétrocede à l'arrêt de l'exposition. La toxicité tardive est moins fréquente, on estime que 5 à 10 % des patients irradiés au niveau pelvien à des doses comprises entre 45 et 55 Gy, présentent des complications tardives [Rubin, Casarett 1968]. Par rapport aux effets aigus, l'impact clinique de ces complications tardives est bien plus important, de par leur chronicité, leur progressivité et par la morbidité et la mortalité qui leur sont associées.

B. Effets généraux d'une irradiation :

L'exposition du tissu vivant à des rayonnements ionisants induit une série d'altérations cellulaires et moléculaires complexes qui se traduisent, quel que soit le site, par des effets

directs et indirects, qui peuvent être d'ordre cellulaire, structural, fonctionnel. Leur gravité est fonction d'un grand nombre de facteurs, tels que la nature du rayonnement, la dose délivrée, le débit de dose, la nature et l'étendue des champs irradiés, la radiosensibilité individuelle. La manifestation clinique temporelle des lésions radio-induites dépend, en plus de la dose reçue, de l'organisation structurale du tissu exposé, des caractéristiques radiobiologiques des cellules lésées (radiosensibilité, capacité de réparation de l'ADN, taux de prolifération ...).

L'intestin, de par la présence de cellules souches à activité mitotique intense situées à la base de ses cryptes, est extrêmement sensible aux rayonnements ionisants. Les cellules souches étant responsables du renouvellement des cellules épithéliales fonctionnelles, leur capacité de multiplication et la qualité de celle-ci seront déterminantes vis à vis de la fonctionnalité intestinale.

1. Conséquences cellulaires :

Les rayonnements ionisants sont des rayonnements énergétiques capables d'ioniser la matière. On distingue deux classes de rayonnements ionisants : les rayonnements particuliers (neutrons, positons, électrons, α , β , noyaux d'hélium) et les rayonnements électromagnétiques (X et γ). L'effet du rayonnement dépend de l'énergie cédée à la matière, l'énergie absorbée est exprimée en Gray (Gy), un Gy correspondant à une énergie de un joule déposée par kilogramme de matière ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J / kg}$).

L'atteinte d'un organisme par les rayonnements ionisants se caractérise par des dépôts d'énergie importants au sein des systèmes cellulaires. On distingue des effets directs (absorption directe de l'énergie par les biomolécules et ionisations) [Streffer,Beisel 1974] et des effets indirects que sont la production de radicaux libres par dépôt d'énergie dans le milieu aqueux (radiolyse de l'eau) et la réaction de ceux-ci avec les biomolécules [Chapman,Gillespie 1981].

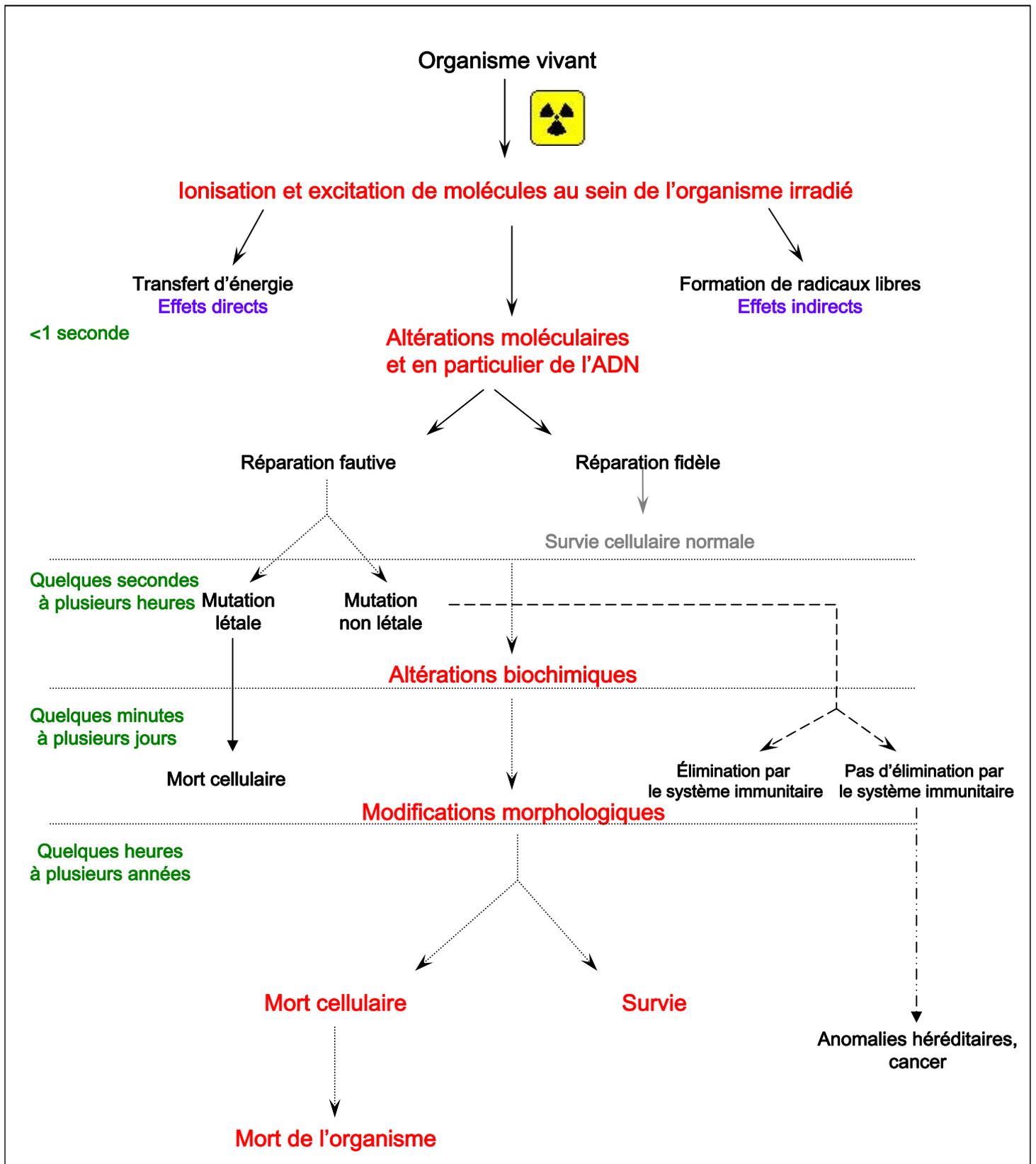


Figure 10 : Représentation schématique de la genèse des effets biologiques faisant suite à une exposition à des rayonnements ionisants.

D'après Streffer, 1969, Tubiana et al, 1986 et Schmidt-Ullrich et al, 2000.

a) l'ADN, cible majeure des dommages radio-induits :

Au sein de la cellule vivante, l'ADN est depuis les prémices de la radiobiologie reconnu comme la cible majeure des dommages cellulaires radio-induits [Warters, Hofer 1977]. Cependant cette vision classique, est aujourd'hui modulée grâce à l'avènement de nouvelles techniques qui ont permis de mettre en évidence l'existence de l'effet bystander que nous ne développerons pas ici. Les rayonnements ionisants peuvent interagir soit directement avec l'ADN [Moulder 2002], soit indirectement, via la genèse d'effecteurs que sont les radicaux libres tels que le radical hydroxyl OH[·], les anions O₂⁻ et le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, tous ces radicaux pouvant aussi être issus de la radiolyse de l'eau (figure 10) [Haimovitz-Friedman 1998].

Les altérations majeures de l'ADN par les rayonnements ionisants peuvent être de plusieurs types : cassure simple ou double brins, modification ou élimination d'une ou plusieurs bases ou encore d'un ou plusieurs sucres, formation de liaisons covalentes entre des nucléotides d'un même brin ou même de deux brins, délétion, translocation et/ou inversion chromosomique [Iliakis 1991; Obe *et al.* 1992]. On peut citer à titre d'exemple les travaux de Tubiana qui ont montré qu'une irradiation X de 1 à 1,5 Gy provoque par cellule, 1000 cassures simple brin et 50 à 100 cassures double brin [Tubiana *et al.* 1986].

Les lésions moléculaires radio-induites pré-citées interfèrent ensuite avec les processus cellulaires de réplication et de transcription, affectant ainsi la capacité de la cellule à se diviser et à générer des cellules filles viables et saines mais aussi son aptitude à synthétiser toutes les protéines nécessaires à sa fonction physiologique spécifique (production d'enzymes, de transporteurs, d'hormones, de médiateurs divers etc...). En fonction de la dose reçue et de la lésion ou des lésions ainsi provoquées, la progression dans le cycle cellulaire des cellules irradiées peut être stoppée afin de permettre la mise en place des processus de réparation de l'ADN, qui pourront aboutir à l'entrée en apoptose en cas d'échec de ces derniers [Langberg *et al.* 1992; Merritt *et al.* 1994]. La réparation peut aussi ne pas être totalement efficace et cependant ne pas induire forcément l'élimination de la cellule, laissant ainsi subsister une

mutation importante. Cette cellule altérée pourra générer des cellules filles modifiées, dont les fonctions physiologiques seront potentiellement endommagées.

Les radicaux libres ont par ailleurs la capacité d'interagir sur les acides aminés soufrés, générant ainsi des radicaux soufrés qui interagiront pour former des ponts disulfures inter ou intra moléculaires, qui seront capables de bloquer le site catalytique d'une enzyme ou sa régulation, comme cela a été montré pour p21ras et le récepteur au facteur de croissance Erb1 [Lander *et al.* 1995; Schmidt-Ullrich *et al.* 2000].

Les atteintes visant les lipides sont majoritairement des peroxydations des acides gras insaturés, qui engendrent une modification de la fluidité membranaire [Dobretsov *et al.* 1977; Benderitter *et al.* 1999].

L'irradiation a par ailleurs la capacité d'induire l'augmentation des taux de céramides, après activation de la sphingomyélinase acide, qui peut conduire à l'induction de la mort cellulaire [Haimovitz-Friedman 1998].

b) Apparition des dommages radio-induits :

L'atteinte des cellules dans leur capacité à se diviser et/ou dans leurs fonctions physiologiques provoque des altérations fonctionnelles tant au niveau tissulaire, qu'organique, qui ont des répercussions sur l'organisme dans son intégralité. La sévérité et la rapidité d'apparition des dommages radio-induits au sein d'un tissu sera fonction, comme nous l'avons déjà présenté, de la radiosensibilité, de la capacité de réparation des lésions induites, du taux de prolifération cellulaire mais aussi et surtout de la durée de vie de ses cellules fonctionnelles différenciées. En effet, pour un tissu à renouvellement cellulaire très lent, les cellules fonctionnelles et différenciées, peu sensibles aux rayonnements, pourront assurer leur rôle physiologique aussi longtemps qu'elles n'auront pas besoin d'être remplacées. L'atteinte fonctionnelle n'apparaîtra que lorsque les cellules filles issues des cellules souches atteintes prendront le relais, avec leurs anomalies fonctionnelles ou leurs défauts de maturité. Ces tissus à renouvellement cellulaire lent (tissu nerveux, conjonctif ou musculaire) présenteront donc des dysfonctionnements tardifs et/ou à forte dose d'irradiation [Dooms *et al.* 1986; Hsu *et al.* 1998].

Par opposition, lorsque des rayonnements ionisants endommagent des tissus à fort taux de renouvellement cellulaire tels que les épithélia, la moelle osseuse ou la microvascularisation, les lésions se manifestent au niveau clinique dans les heures ou les jours qui suivent l'exposition. Ces tissus seront par conséquent plus sensibles aux rayonnements ionisants et affectés par des doses plus faibles [Dubois A *et al.* 1995].

Quel que soit le tissu, la repopulation des structures atteintes est possible si demeure au sein du tissu un nombre suffisant de cellules souches saines.

c) Notion d'atteinte en « cascade » :

Il faut avoir à l'esprit que la probabilité d'atteinte directe d'une cellule par un rayonnement est relativement faible. Ainsi les effets observés (dysfonctionnement d'un organe, dysrégulation d'un processus physiologique) à l'échelle tissulaire ou à l'échelle de l'organisme, résultent de phénomènes plus complexes qu'une simple diminution du nombre de cellules et/ou de leur fonctionnalité. Ils peuvent être assimilés à la résultante d'une cascade événementielle. Les effets observés seront de deux ordres : directs et dus aux pertes cellulaires mais également indirects, plutôt de type paracrin et provoqués par la présence de médiateurs inflammatoires, de radicaux libres, la rupture radio-induite de bons nombre d'équilibres régissant par exemple le système de coagulation ou la balance cytokines anti-inflammatoires/cytokines pro-inflammatoires. La conjonction des effets directs et indirects entraîne des modifications de l'environnement cellulaire et tissulaire qui peuvent aussi être engendrées par exemple par la mort radio-induite de certains types cellulaires comme les cellules endothéliales des microvaisseaux [Paris *et al.* 2001], dont la perte conduira à des troubles vasculaires, produisant de surcroît une réponse inflammatoire. Ainsi, une cellule ou un tissu, qui ne seront pas atteints directement par un rayonnement pourront être sensibles à des variations environnementales et affectés dans leur capacité de multiplication, de différenciation et/ou leur fonctionnalité, même s'ils n' étaient pas dans le champ irradié [Francois *et al.* 2003]. La notion d'atteinte en "cascade" est cruciale dans les démarches tant au niveau de la recherche appliquée que dans l'établissement de stratégies thérapeutiques.

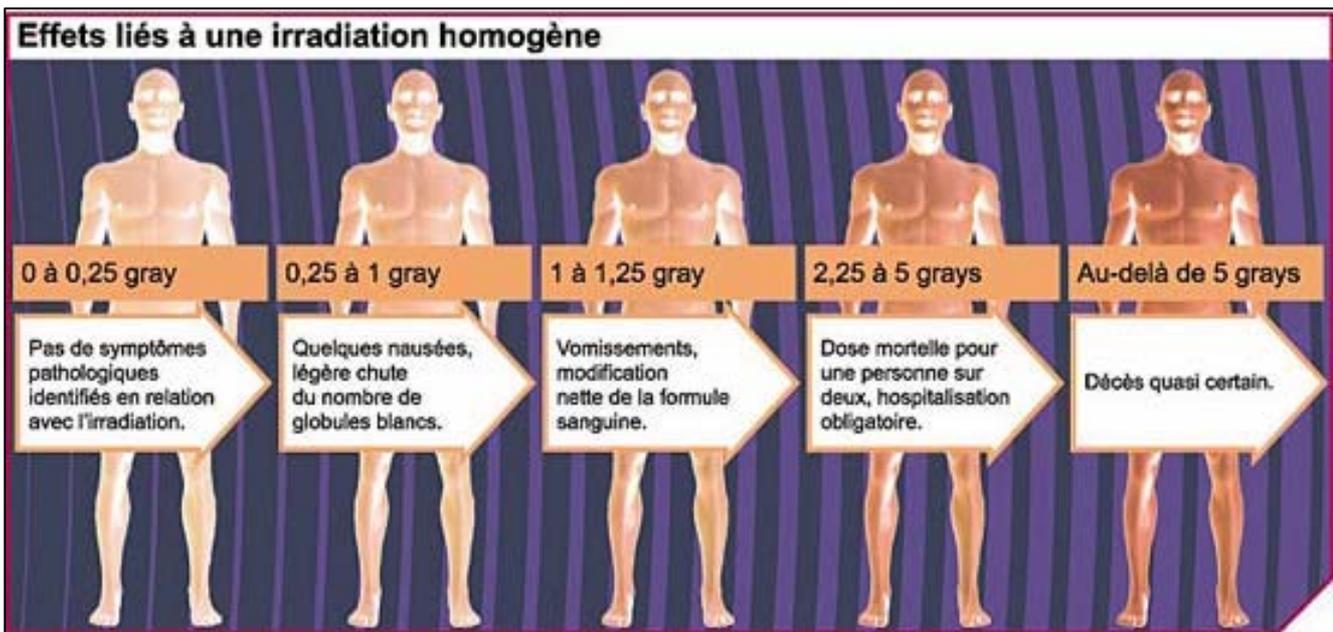


Figure 11a : Effets liés à une irradiation homogène

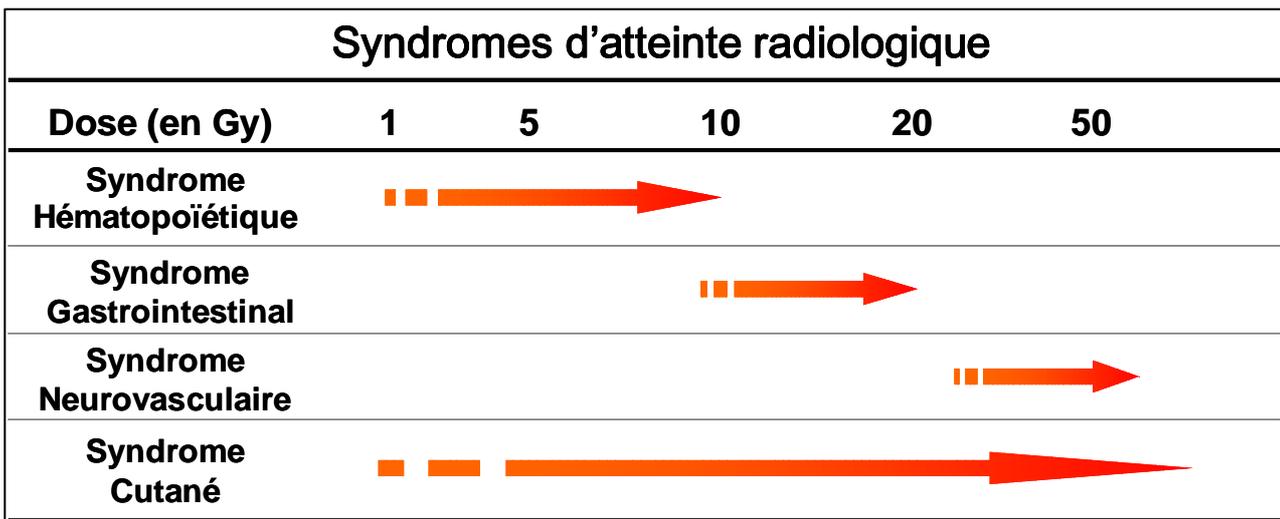


Figure 11b : Le syndrome d'atteinte radiologique est fonction de la dose reçue

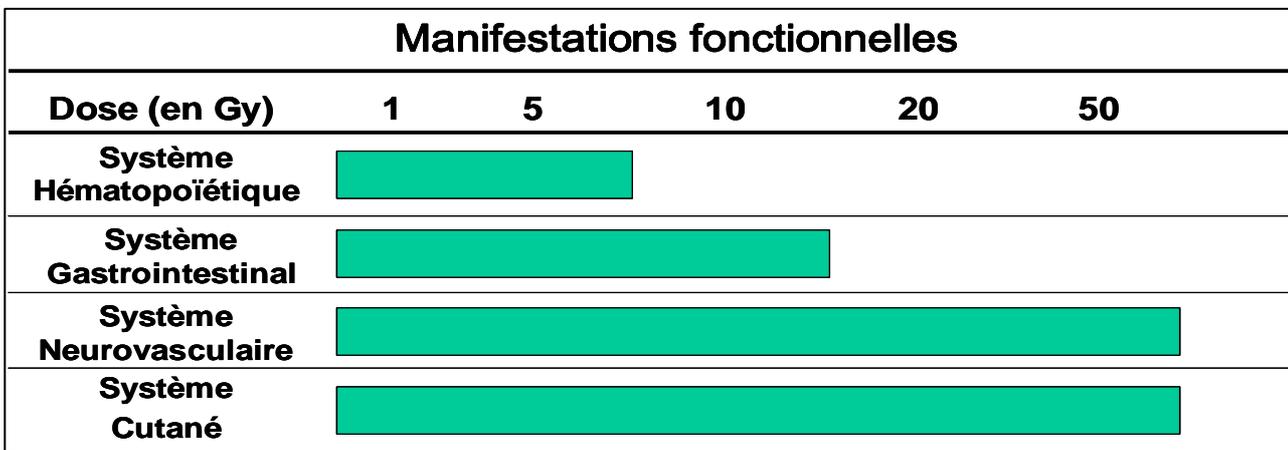


Figure 11c : Les manifestations fonctionnelles varient avec la dose

2. Conséquences tissulaires : les syndromes d'atteinte radiologique :

La radiosensibilité d'un organe et l'expression de dysfonctionnements radio-induits, dépendent de la nature des différents tissus qui le composent et de leurs radiosensibilités respectives. La complexité et la multiplicité des phénomènes physiques résultants d'une irradiation ionisante, laisse présager de la diversité des atteintes radiologiques, qui seront fonction d'un grand nombre de facteurs liés au rayonnement et à l'irradiation : nature du rayonnement (pénétration, énergie), dose totale reçue, débit de dose, récurrence de l'irradiation (dose unique ou fractionnée), nature et étendue des structures irradiées, mais également à des facteurs génétiques et épigénétiques, liés quant à eux à l'irradié.

L'exposition à des doses d'irradiation moyennes à fortes peut conduire à des syndromes aigus d'irradiation, susceptibles de causer la mort de l'irradié (figure 11a). Leur apparition dépend, comme nous l'avons déjà vu, de la configuration de l'irradiation, c'est à dire : dose reçue, type de rayonnement, surface irradiée...

On distingue classiquement quatre syndromes radio-induits : hématopoïétique, gastro-intestinal, neuro-vasculaire et enfin cutané. Ces syndromes possèdent une chronologie d'apparition. La durée des différentes étapes et leurs manifestations cliniques varient selon l'intensité de l'irradiation et l'importance de la zone irradiée (figures 11b et 11c). Cependant l'alternance entre les phases symptomatiques et asymptomatiques est constante. La phase prodromale apparaît dans les trente minutes qui suivent l'exposition. C'est au cours de cette phase qu'apparaissent les premiers symptômes relatifs aux organes irradiés, leur intensité préjuge de la gravité de l'atteinte et de la dose absorbée. On observe au cours de cette phase, une anorexie, des nausées, des vomissements, un ralentissement de la vidange gastrique et de fortes diarrhées. La perturbation des fonctions hématopoïétiques et intestinales conduit à des hémorragies, un déséquilibre hydrominéral, une anémie ainsi qu'une sensibilité accrue aux infections. Si l'irradié survit à cette phase aiguë, il s'en suit une phase cliniquement asymptomatique dite « de latence », d'autant plus longue que la dose d'irradiation est faible. La phase de latence est suivie d'une réapparition des symptômes précoces, survenant

généralement peu de temps avant le décès du patient. Des effets tardifs peuvent survenir des mois à des années après l'exposition, reflétant l'atteinte de systèmes supplémentaires à ceux pré-cités, et donnant lieu par exemple à des dommages tissulaires locaux : on citera la cataracte et la stérilité radio-induites.

a) Syndrome hématopoïétique :

Le syndrome hématopoïétique apparaît dès les faibles doses (1 Gray) et se caractérise par une diminution drastique des taux des différentes cellules sanguines circulantes [Fliedner *et al.* 1988] par incapacité de la moelle osseuse à produire des cellules matures. L'atteinte de ces populations cellulaires entraîne une diminution voire une perte des propriétés de défense de l'organisme et des processus de coagulation. Il s'en suivent des hémorragies et des altérations des processus de migration des cellules sanguines et de la microvascularisation [Bond *et al.* 1965; Fliedner 1969]. La sévérité des atteintes hématopoïétiques, parce qu'étroitement liée à la dose reçue, est utilisée comme critère discriminant dans le tri des irradiés accidentels. Par ailleurs l'aplasie médullaire radio-induite est un «outil thérapeutique», utilisé dans la préparation des patients à une greffe hétérologue dans le but d'éviter les phénomènes de rejet.

b) Syndrome gastro-intestinal :

Des dysfonctionnements intestinaux peuvent apparaître dès les faibles doses (1 Gy) mais ne constituent pas le syndrome gastro-intestinal proprement dit (SGI). Les radiobiologistes définissent le syndrome gastro-intestinal comme étant l'apparition, tout au plus quelques dizaines de minutes après l'exposition, d'une somme de symptômes spécifiques que sont les nausées, les vomissements, les diarrhées et les douleurs abdominales [Hendry *et al.* 1983; Flynn *et al.* 1995], généralement à partir de 10 Gy et qui aboutissent à la mort de l'individu dans les jours qui suivent (3 à 5 jours) des suites directes des atteintes digestives. L'effet d'une irradiation au niveau de l'intestin grêle donnant lieu au SGI a été histologiquement décrit par Quastler en 1956 [Quastler 1956]. Dans l'heure qui suit l'exposition, il y a apparition de corps apoptotiques au niveau de la crypte, [Becciolini *et al.* 1976], un arrêt des mitoses des cellules

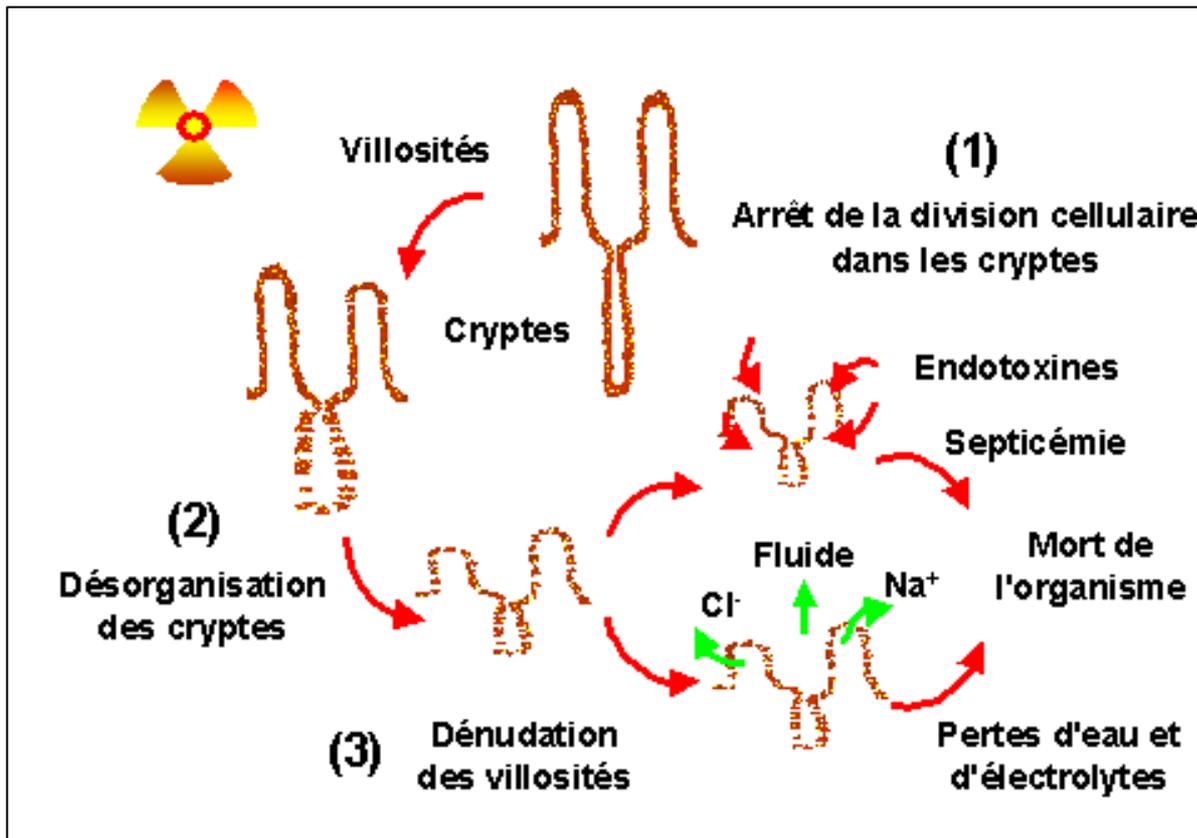


Figure 12 : La conjonction de trois facteurs est responsable de la létalité du syndrome gastro-intestinal D'après P.J. Gunter-Smith, tiré de « Military radiobiology ». Conklin JJ, Walker RL eds, Orlando : Academic press, 1985, p135-151.

souches cryptiques [Becciolini *et al.* 1995], une augmentation du temps de maturation cellulaire [Leshner 1967] [Potten 1990] et une atteinte des cellules endothéliales de la microvascularisation intestinale [Paris *et al.* 2001]. Ces atteintes donnent lieu à des modifications morphologiques notables un jour après l'irradiation, le nombre de cellules diminue, la taille des cellules cryptiques augmente, la taille des villosités diminue. Deux jours après l'exposition, ces modifications sont fortement accentuées et au troisième jour il y a une quasi disparition de la barrière épithéliale, un effondrement des villosités et un œdème du tissu conjonctif. Comme cela est représenté dans la figure 12, c'est la conjonction de trois facteurs [Gunter-Smith PJ 1987] qui est responsable de la létalité du syndrome gastro-intestinal : la dénudation de la barrière épithéliale permet l'entrée de bactéries dans l'organisme et la survenue d'une septicémie, il y a libération importante d'enzymes protéolytiques, déséquilibre de la balance hydrominérale qui induit des pertes massives d'eau et d'électrolytes responsables de la déshydratation de l'organisme [Gunter-Smith P. J. 1986], au cours de la diarrhée radio-induite. Chacun de ces trois facteurs pris indépendamment ne provoqueraient pas la mort [Carr 2001].

Ces symptômes peuvent aussi se manifester pour des doses infralétales, sans qu'il y ait SGI, par exemple au cours d'une radiothérapie nécessitant une irradiation totale à une dose comprise entre 2 et 10 Gy [Feuvret *et al.* 1994], ou dans le cadre de configurations partielles incluant tout ou partie du tractus digestif [Rubio, Jalnäs 1996].

Il semble qu'en plus de la dose, un autre paramètre clef doive être pris en considération. En effet, comme cela a déjà été abordé, le temps de renouvellement de l'épithélium intestinal est un facteur primordial dans l'établissement du SGI. En 1922, Warren observait que la mort précoce après irradiation abdominale ou totale à forte dose était directement liée à la destruction de l'épithélium [Warren, Whipple 1922]. En 1956, Quastler a mis en évidence que la mort provoquée par le syndrome gastro-intestinal résultait de l'atteinte de la quasi-totalité de l'intestin grêle [Quastler 1956]. Cette notion a été confirmée et approfondie par Hendry [Hendry *et al.* 1983], qui ont montré l'existence d'une étroite relation entre la mort par syndrome gastro-intestinal et la perte de cellules cryptiques de l'intestin grêle. Des études sur souris axéniques ont confirmé le rôle joué par le temps de renouvellement épithélial dans la mort par syndrome

Dose en Gy	Nombre d'accidentés	Intensité du SGI	Mortalité
6.6-10.2	7	Modérée	6
8.1-16	11	Sévère	11

Tableau 1 : Place du syndrome gastro-intestinal dans la radiopathologie accidentelle :
Cas de l'accident de Tchernobyl

gastro-intestinal [Matsuzawa,Wilson 1965]. En effet, les animaux axéniques, qui présentent par rapport aux animaux conventionnels un ralentissement du renouvellement et de la migration des cellules vers le sommet de l'épithélium, meurent par SGI non pas 3 à 4 jours après exposition mais 7 jours.

Les diarrhées associées au syndrome gastro-intestinal sont à l'heure actuelle sévères et incurables (tableau 1). Les seuls traitements disponibles sont de type palliatif : supplémentation en eau et électrolytes en association avec une antibiothérapie. Il n'existe pas actuellement de traitement du SGI proprement dit.

c) Syndrome neuro-vasculaire :

Le troisième syndrome décrit est l'atteinte du système nerveux central. En raison du renouvellement cellulaire extrêmement lent du tissu nerveux, ce troisième syndrome apparaît tardivement et/ou à des doses d'irradiation élevées (figure 11c). Le syndrome affectant le système nerveux central est difficilement caractérisable en termes d'atteintes histologiques comme c'est le cas pour le syndrome gastro-intestinal. En plus des nausées et vomissements, l'atteinte du système nerveux central se traduit par une succession de phases d'agitation et d'apathie, de désorientation, de pertes d'équilibre, de spasmes tétaniques, de convulsions, de prostrations et de coma dans les 24 ou 48 heures qui suivent l'exposition [Sauer 1961].

d) Syndrome cutané :

Le syndrome cutané est caractérisé par une atteinte des cellules souches, responsables du renouvellement de l'épiderme, dans leur capacité de multiplication, comme lors de l'atteinte de l'épithélium intestinal [Hopewell 1998]. La dénudation radio-induite du derme entraîne une déshydratation dermique, une grande sensibilité aux infections et des ulcérations. Les délais d'apparition des dommages sont plus long pour la peau que pour l'intestin en raison d'une vitesse de renouvellement plus lent (30 jours chez l'homme). Comme dans le cas dans l'intestin, l'environnement cellulaire et les cellules adjacentes au derme semblent jouer un rôle

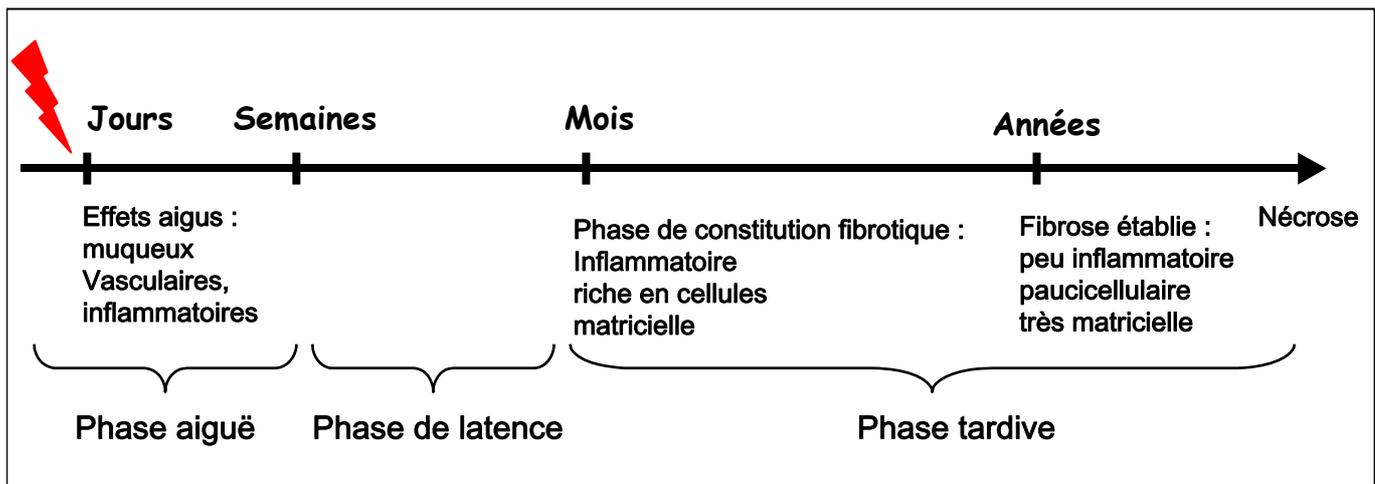


Figure 13 : Il existe un continuum entre les étapes d'initiation, de développement et de persistance des lésions radio-induites

déterminant dans le développement des atteintes radio-induites [Peter 1998]. Les effets à plus long terme sont de type fibrotique [Lefaix *et al.* 1990] voire même nécrotique.

C. Effets des rayonnements ionisants sur l'intestin :

L'exposition tissulaire aux rayonnements ionisants, accidentelle ou thérapeutique, peut conduire à des effets historiquement et schématiquement classés en fonction de la chronologie d'apparition des symptômes cliniques, en effets aigus quasi immédiats et en effets tardifs dont les séquelles s'étendent de la fibrose à la nécrose [Denham *et al.* 2001]. Aujourd'hui les nombreux progrès réalisés dans la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la réponse tissulaire aux rayonnements ionisants, permettent d'envisager l'existence d'un continuum entre les étapes d'initiation, de développement et de persistance des lésions radio-induites. Ainsi, la phase aiguë est suivie d'une phase de latence, elle-même suivie d'une phase tardive de fibrose caractérisée par trois étapes : une phase de constitution, une phase de fibrose établie aboutissant au stade ultime d'évolution de la pathologie qu'est la nécrose (figures 13 et 14a).

1. Effets précoces d'une irradiation ionisante :

Le compartiment muqueux et les cellules épithéliales qui le composent ont longtemps été considérés comme les cellules à l'origine des troubles fonctionnels radio-induits associés à l'initiation des processus lésionnels et cicatriciels [Potten *et al.* 1994]. Une hypothèse récente propose que la cible primaire des rayonnements ionisants ne serait pas la cellule épithéliale mais la cellule endothéliale microvasculaire [Paris *et al.* 2001]. Néanmoins, l'irradiation des épithélia provoque la mort massive des cellules du compartiment progéniteur dans les heures qui suivent l'exposition au rayonnement. Les mécanismes de repopulation de l'épithélium sont alors fortement perturbés en particulier si les cellules souches sont détruites [Gunter-Smith PJ 1995]. Lorsque les cellules différenciées desquameront par le processus physiologique de renouvellement cellulaire, elles ne seront plus remplacées et un phénomène d'ulcération massive pourra se produire. La dénudation épithéliale provoque la perte de la fonction de

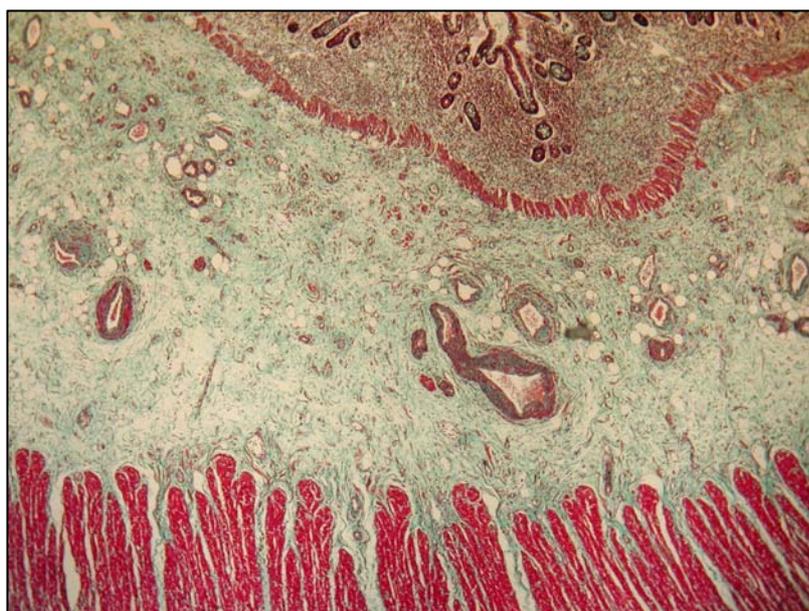


Figure 14a : Photographie d'une coupe d'iléon humain, après coloration par un trichrome de masson au vert d'aniline, présentant une fibrose caractérisée (reproduit avec l'aimable autorisation de Marie-Catherine Vozenin-Brottons).

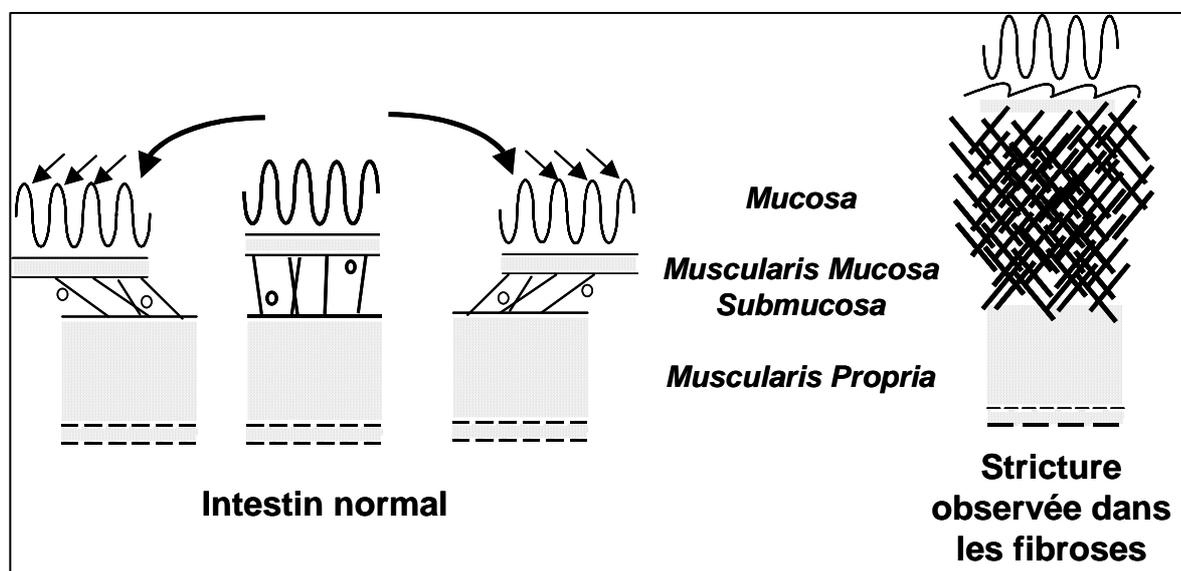


Figure 14b : L'inflammation chronique de la sous muqueuse mène à une accumulation de collagène, au cours du processus fibrotique. Ces événements concourent à la perte de la possibilité de mouvement entre la muqueuse et la musculaire muqueuse qui mène à l'obstruction (Graham , 1995).

barrière et engendre le contact du compartiment sous-muqueux avec des agents du non-soi (la flore intestinale, les acides biliaires...) particulièrement délétères pour les cellules vasculaires et mésenchymateuses. Il se forme alors un tissu de granulation visant à combler la perte de substance et à produire une réépithélialisation rapide pour restaurer la fonction de barrière. Concomitamment aux lésions muqueuses, une absorption anormale des acides biliaires, des lipides, des protéines et des carbohydrates a été rapportée revue dans Fajardo [Fajardo *et al.* 2001], ainsi qu'une altération importante de l'absorption de l'eau et des électrolytes [Dublineau *et al.* 2002].

Les travaux réalisés par Dublineau et collaborateurs sur l'irradiation X hémicorporelle basse de 10 Gy de rat, montrent qu'une telle exposition entraîne des dysfonctionnements au niveau de l'intestin grêle, dus à la perte de l'intégrité de la barrière intestinale, qui se traduit entre autre par une diminution marquée de la résistance tissulaire épithéliale mais aussi par une augmentation massive de la perméabilité au mannitol, une forte désorganisation des protéines des jonctions serrées et adhérentes ZO-1 et β -caténine. Au niveau histologique, les auteurs ont montré un pic lésionnel trois jours après irradiation caractérisé par une perte massive des cellules épithéliales du sommet des villosités associée à un raccourcissement de ces dernières, une dilatation marquée de la base des cryptes. Sept jours après irradiation, un rétablissement de l'organisation des protéines fonctionnelles a été observé concomitamment avec un retour à la normale de la perméabilité intestinale et de la structure histologique du tissu [Dublineau *et al.* 2002; Dublineau *et al.* 2004]. Ces effets sont en accords avec ceux de l'étude de Rubio et Jalnäs publiée en 1996 [Rubio, Jalnäs 1996]. Cette étude plus ancienne, montrait les effets histologiques faisant suite à l'irradiation d'une anse extériorisée d'iléon de rat (tableau 2).

L'exposition aux rayonnements ionisants peut aussi induire une réaction inflammatoire qui est encore aujourd'hui mal caractérisée et dont l'existence est grandement débattue. Tandis que la réaction inflammatoire observable après une irradiation partielle est un processus physiopathologique classiquement observé [Buell, Harding 1989] qui semble faire suite à la production radio-induite de radicaux libres, dans le cas d'une irradiation totale, l'existence d'une

Histologie	Jours après irradiation			Dose		
	3	10	30	faible 9-12 Gy	modérée 15-18 Gy	forte 21-24 Gy
nécrose	8	4	0	0	7	8
perte de cellules de granulation	9	0	0	0	5	4
abscès cryptiques	11	5	4	1	12	9
modification de la structure cryptique	11	4	3	2	9	7
perte des cellules de Paneth	9	2	0	0	7	4
diminution des mitoses	5	1	1	0	2	5
ulcérations de la muqueuse	2	4	1	0	0	7
diminution des lymphocytes intraépithéliaux	16	4	5	9	8	9
augmentation du collagène						
submucosae	11	12	16	9	18	11
muscularis mucosae	3	5	7	0	4	9
subserosae	12	13	5	9	18	11
congestion capillaire	12	4	3	7	6	5
augmentation des cellules rondes infiltrant la lamina propria	12	9	1	6	10	6
Nombre total d'animaux	16	16	16	18	18	12

Tableau 2 : effets histologiques faisant suite à l'irradiation d'une anse extériorisée d'iléon de rat.
D'après C. A. Rubio et Jalnäs. M. in Digestive Diseases and Sciences, Vol. 41, 1996, pp. 392-401.

telle réponse est controversée. En effet pour certains auteurs l'irradiation totale entraîne une diminution importante du nombre de mastocytes, de neutrophiles, mais aussi des lymphocytes, dans la muqueuse intestinale [MacNaughton *et al.* 1994; Rubio, Jalnäs 1996; Francois *et al.* 1998] suggérant l'absence d'invasion tissulaire par ces cellules. Parallèlement ces auteurs ayant entrepris le dosage tissulaire de médiateurs inflammatoires (LTB₄, NO synthase inducible, histamine ...), n'ont pas montré de production suffisante de ces molécules pour témoigner d'une réaction inflammatoire tissulaire et cela même à des temps précoces [MacNaughton *et al.* 1997; Francois *et al.* 1998]. Ces résultats les ont conduits à émettre l'hypothèse selon laquelle après irradiation totale et dans les temps d'apparition des désordres intestinaux radio-induits, l'inflammation intestinale ne pouvait pas être considérée comme un facteur majeur impliqué dans les altérations du fonctionnement intestinal. Des travaux récents contredisent ces résultats plus anciens. En effet les travaux de C. Linard mettent en évidence, la production radio induite précoce (dès 3 h après exposition) d'ARN messagers codant pour l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-6, et des protéines correspondantes, dans la musculature iléale de rats soumis à une irradiation γ totale de 10 Gy [Linard *et al.* 2004]. A la lumière de ces données récentes il paraît probable que la mise en place d'un processus inflammatoire intestinal pourrait finalement être impliquée dans les désordres intestinaux radio-induits.

Les études menées par le groupe de Panès ont montré que la réaction inflammatoire induite par une irradiation localisée entraîne dans les toutes premières heures qui suivent l'exposition aux rayonnements ionisants, une augmentation de la perméabilité vasculaire, qui engendre localement le recrutement de leucocytes, l'extravasation des protéines sériques et l'activation du système de coagulation. Les leucocytes recrutés, en produisant des peptides vaso-actifs comme l'histamine et les prostaglandines, et pro-coagulants comme la thrombine, facilitent l'adhésion des PNN à la surface des cellules endothéliales. Plusieurs études ont montré une infiltration leucocytaire et plus particulièrement neutrophilique du tractus digestif de rats 24 h après une irradiation abdominale X de 10 Gy [Buell, Harding 1989; Panes *et al.* 2000; Linard *et al.* 2003b]. Cette infiltration par des PNN via l'augmentation de l'expression de la myéloperoxydase, a aussi été mise en évidence dans l'iléon du furet 48 h après une irradiation

abdominale γ de 5 Gy [Freeman *et al.* 2001]. Cette infiltration est associée à un œdème de la *lamina propria* [Buell,Harding 1989] et pourrait être due soit à une augmentation de la perméabilité épithéliale aux bactéries [Guzman-Stein *et al.* 1989], soit à une altération du métabolisme des prostanoides [Freeman *et al.* 2001]. Les leucocytes recrutés synthétisent et libèrent par ailleurs des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, des prostaglandines E2, des facteurs de croissance tels que le TGF- β 1 et le CTGF, des protéases impliquées dans le remodelage matriciel [Rubin,Casarett 1968] [Rubin *et al.* 1995] [McBride 1995] [Dammeier *et al.* 1998] [Vozenin-Brotons *et al.* 2003] [Linard *et al.* 2003b] [Freeman *et al.* 2001].

Si l'irradiation a des effets sur les acteurs cellulaires du tractus intestinal, par rebond ils ne sont pas sans conséquences sur la matrice extracellulaire elle-même. En effet des travaux portant sur l'effet des rayons X sur la membrane chorioallantoïque embryonnaire de poulet à montré une diminution de l'expression tant au niveau protéique que génique de la fibronectine, la laminine, du collagène I, et uniquement protéique de l'intégrine α V β 3 [Giannopoulou *et al.* 2001]. L'exposition de rats à des rayons X réalisée dans le cadre de l'étude des dommages cardiaques radio-induits par Krüse et collaborateurs, à montré une augmentation de l'expression ventriculaire des ARNm codant pour les collagènes I et II qui perdure plus de six mois après l'exposition [Kruse *et al.* 1999], associée à une augmentation de ceux codant pour le TGF- β 1. Il a été par ailleurs montré chez des patients irradiés dans le cadre du traitement de tumeurs localisées à la tête ou au cou, une sur-expression de l'intégrine β 2 dans la muqueuse buccale [Handschel *et al.* 1999]. Les travaux menés par le groupe de J.L Lefaix ont en particulier mis en évidence, six mois après l'exposition de porcs à une irradiation γ du radius à forte dose, une augmentation à la fois de la concentration tissulaire et de la synthèse des composants de la MEC de type collagènes (types I, III, IV et V) [Wegrowski *et al.* 1988] et glycoaminoglycanes (acide hyaluronique, héparanes sulfates et chondroïtine sulfate) et de la fibronectine [Wegrowski *et al.* 1986]. Par ailleurs les travaux menés par le groupe de R. Naftalin, ont mis en évidence l'augmentation de la production du collagène de type IV, localisée

Obstruction de l'intestin grêle	33/45
Fistule	9/45
Saignements récurants	1/45
Abcés subphrénique	1/45
Néoplasme radio-induit	1/45

Tableau 3a : Dysfonctionnements faisant suite à une radiothérapie nécessitant une intervention chirurgicale (échantillon de 45 patients). D'après Fajardo L, Berthrong M, Anderson R. " Alimentary tract radiation pathology. Oxford University Press, 2001, p208-247.

0 - 5 mois	2/38
6 - 12 mois	9/38
1 - 2 ans	9/38
3 - 5 ans	6/38
6 - 10 ans	7/38
11 - 15 ans	3/38
16 - 20 ans	1/38
plus de 21 ans	1/38

Tableau 3b: Intervalle de temps entre la radiothérapie et l'intervention chirurgicale pratiquée suite à l'apparition de complications post-radiques (échantillon de 38 patients). D'après Fajardo L, Berthrong M, Anderson R. " Alimentary tract radiation pathology. Oxford University Press, 2001, p208-247.

au niveau du manchon péricryptique colique, chez le rat 3 mois après une irradiation γ totale de 8 Gy [Thiagarajah *et al.* 2002].

2. Effet tardif d'une irradiation ionisante, la fibrose :

a) La fibrose, une complication tardive des irradiations pelviennes :

On estime que 5 à 10% des patients irradiés à des doses comprises entre 50 et 55 Gy présentent des complications tardives [Coia *et al.* 1995] et que 95% de ces patients ont des problèmes localisés au rectum et au colon sigmoïde qui font suite au traitement de cancers utérins [Allen-Mersh *et al.* 1986]. Leur développement et leur sévérité dépendent de l'organe irradié mais également du volume irradié, de la dose d'irradiation, de la radiosensibilité inter-individuelle, mais aussi de facteurs génétiques et épigénétiques comme les facteurs de comorbidité (brides chirurgicales, problèmes infectieux, diabète). Ces problèmes tardifs sont cliniquement très importants à cause de leur chronicité, de la morbidité et de la mortalité qu'ils engendrent. Ils sont le plus souvent caractérisés par une dysmotilité, une malabsorption, qui peuvent conduire à des complications requérant une intervention chirurgicale le plus souvent urgente (tableau 3a). La plupart des stratégies médicamenteuses utilisées à ce jour dans le traitement des complications intestinales de l'irradiation thérapeutique humaine s'avèrent être assez décevantes [Hauer-Jensen *et al.* 2003], contrairement à ce qui est observé dans les modèles animaux.

Les complications post-radiques tardives de l'intestin grêle peuvent se manifester moins de six mois après la radiothérapie. Cependant, elles se déclarent usuellement des années plus tard comme le montre le tableau 3b et sont généralement dues à des lésions des tissus vasculaires et conjonctifs (revue dans [Fajardo *et al.* 2001]). Une fibrose extensive se développe, en particulier dans la séreuse et la sous muqueuse, caractérisée par une prolifération cellulaire anormale et une accumulation de fibres de collagène dans l'intima et la média vasculaires qui concourent à réduire la lumière vasculaire et le flux sanguin. Une

vascularite subaiguë des vaisseaux sanguins de petit calibre, confinée à la zone irradiée a par ailleurs été mise en évidence. Les aspects microscopiques de la fibrose varient en fonction de l'évolution de la pathologie, cependant trois phases successives menant à la fibrose peuvent être distinguées :

La phase de constitution ou phase préfibrotique, qui est caractérisée par une inflammation chronique pendant laquelle la cellule endothéliale, comme cela a déjà été évoqué, semble jouer un rôle prépondérant. Cette inflammation est associée à une augmentation de la perméabilité vasculaire avec une extravasation des protéines sériques et formation d'œdème. Les fragments de dégradation du collagène et de la fibronectine attirent localement les cellules mésenchymateuses, épithéliales et sanguines. La perte de la barrière endothéliale engendrerait ainsi l'exposition directe des cellules du mésenchyme à des stimuli qui pourraient être à l'origine de l'activation fibroblastique.

La phase de fibrose établie, qui est caractérisée par l'accumulation de cellules inflammatoires et de myofibroblastes activés qui prolifèrent et sont responsables de l'accumulation pathologique de matrice extracellulaire. La dédifférenciation des cellules musculaires lisses vasculaires en cellules productrices de matrice extracellulaire provoque l'accumulation vasculaire de matrice extracellulaire et cause la hyalinisation des vaisseaux et la fibrose vasculaire. Les mastocytes interviendraient comme des amplificateurs facilitant la communication entre les fibroblastes et les cellules endothéliales [Zheng *et al.* 2000]. Ces dernières interviennent dans les processus de néo-vascularisation liés à l'extension de la fibrose. Des plages de fibrose active composée d'une matrice extracellulaire désorganisée avec une densité élevée de myofibroblastes et de néo-vaisseaux alternent avec des plages de fibrose pauci-cellulaire peu vascularisée. La muqueuse, peu épaisse, montre des cryptes irrégulières dont les cellules situées à leur base peuvent occasionnellement avoir des noyaux larges et atypiques et également des villosités érodées et courtes. La *lamina propria* est particulièrement riche en cellules mononuclées. La sous muqueuse est significativement épaissie par des amas de polynucléaires éosinophiles et par des fibroblastes à gros noyau et cytoplasme abondant. Elle est particulièrement riche en matériel matriciel dans lequel sont

visibles des capillaires sanguins télangectasiques, des veines montrant une hyperplasie endothéliale, ainsi que des artérioles épaissies et hyalinisées. Une photographie représentative est proposée en figure 14a. L'extrême richesse de la sous muqueuse en collagènes fibrotiques provoque l'adhésion de la muqueuse à la musculature et par conséquent la perte de capacité de mouvement entre ces deux compartiments, contribuant ainsi au processus occlusif comme cela a été proposé par M. Graham (figure 14b) [Graham 1995]. La phase tardive est une fibrose peu vascularisée pauvre en fibroblastes et caractérisée par la densification du tissu fibreux due au remodelage permanent de la matrice extracellulaire. Elle peut aboutir à la nécrose, une des étapes ultimes du processus de cicatrisation pathologique caractérisée par une perte de substance et la mort tissulaire. Celle-ci se développe chez des patients avec des bases génétiques de prédisposition ou bien lorsque les facteurs de co-morbidité viennent amplifier le processus de destruction du tissu (surinfection, inflammation).

L'atteinte combinée de l'endothélium et des cellules du tissu conjonctif, amplifiée par des facteurs de croissance comme le TGF- β et le CTGF, est à l'origine du remodelage du tissu fibreux et de sa pérennité [Burger *et al.* 1998], [Vozenin-Brotons *et al.* 2003]. Le TGF- β semble jouer un rôle fondamental dans la réponse tissulaire à l'irradiation, l'isoforme β 1 est actuellement considérée comme le prototype même du médiateur profibrosant. De nombreuses études ont mis en évidence son augmentation après irradiation dans différents tissus [Wang J., Robbins 1996] et son implication dans la fibrose [Martin *et al.* 1993; Martin *et al.* 2000a; Martin *et al.* 2000b] [Vujaskovic, Groen 2000] [Seong *et al.* 2000] [Skwarchuk, Travis 1998] [Hauer-Jensen *et al.* 1998] [Hakenjos *et al.* 2000] [Rube *et al.* 2000], ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle.

b) Les modèles d'étude de la fibrose intestinale radio-induite :

Pour étudier la fibrose intestinale radio-induite, des modèles animaux ont été mis au point chez les rongeurs, malgré le fait que ces animaux montrent des mécanismes de cicatrisation très différents de l'homme. Ils produisent en particulier très peu de tissus de granulation et de fibrose, ce qui explique qu'il est très difficile de générer une fibrose chez le rat

et plus encore chez la souris (revue dans Sartor [Sartor 1995]). Malgré ces difficultés liées à l'espèce, des modèles ont été mis au point entre autre par le groupe de M. Hauer-Jensen [Hauer Jensen *et al.* 1983; Langberg *et al.* 1992]. La synthèse des données publiées de leurs études montre que les conditions d'irradiation (dose unique ou fractionnée) permettent de générer deux pathologies distinctes. L'irradiation X d'une anse extériorisée de l'intestin grêle à 21 Gy génère une fibrose secondaire à l'exposition qui se développe rapidement. Deux temps clefs sont analysés : 2 semaines après l'irradiation l'étude histologique montre une atteinte à la fois muqueuse, vasculaire et inflammatoire intenses comme cela a été montré chez l'homme [Hovdenak *et al.* 2000a], 15 semaines après l'exposition, l'étude histologique montre une fibrose sous muqueuse établie. L'irradiation fractionnée d'une anse de l'intestin grêle isolée dans le scrotum du rat, permet quant à elle de générer une fibrose qui se développe beaucoup plus tardivement, à partir des lésions induites par les rayonnements ionisants au niveau des cellules du mésenchyme. Ce dernier modèle est certainement celui qui fourni des lésions les plus proches de celles observées en radiothérapie humaine (revue dans Denham [Denham *et al.* 2000]).

III. Structure et fonctions des métalloprotéases matricielles ou MMP :

L'homéostasie tissulaire est régie de façon spatio-temporelle par l'équilibre existant entre les processus anaboliques et cataboliques affectant les constituants de la matrice extracellulaire ou MEC. De nombreuses endopeptidases neutres appartenant à différentes familles d'enzymes participent à la dégradation des constituants de la MEC, cependant les métalloprotéases matricielles ou MMP, ainsi que des protéinases du système de la plasmine incluant les activateurs du plasminogène (urokinase, activateur tissulaire du plasminogène) et la plasmine, jouent un rôle prépondérant dans cette hydrolyse [Woessner J.F. 1991; Kleiner,Stettler-Stevenson 1993; Nagase,Woessner 1999; Woessner JF,Nagase 2000].

Ces protéinases extracellulaires sont requises dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques qui s'étendent du développement à la pathogenèse, la capacité à dégrader les protéines extracellulaires étant indispensable aux cellules pour interagir correctement avec leur microenvironnement, et aux organismes pluricellulaires pour se développer et fonctionner normalement. Le chemin parcouru depuis les premières observations de Gross et Lapiere, montrant que des enzymes diffusant à partir de fragments de queue de têtard involutives avaient la capacité de dégrader des gels de collagène fibrillaire natif, a été riche en découvertes [Gross,Lapiere 1962]. C'est à la suite de cette première mise en évidence que, de l'hydre à l'homme, la famille des MMP a été identifiée. Elles ont été ainsi nommées en raison de leur activité catalytique dépendante des ions métalliques des protéines structurales de la matrice extracellulaire (ECM) et en raison de considérations spécifiques de l'évolution de leur séquence qui les distinguent d'autres métalloprotéases [Stocker *et al.* 1995]. Les MMP constituent une famille multigénique d'au moins 25 membres chez les vertébrés, dont 22 ont été identifiées, clonées et caractérisées chez l'Homme. Elles dérivent d'un gène ancestral commun, présentent de grandes analogies de structure mais diffèrent par leurs spécificités de substrats qui bien que distinctes se recouvrent quelque peu [Nagase,Woessner 1999]. Globalement, ces protéinases sont capables de dégrader de nombreux substrats extracellulaires et entre autres la presque totalité des constituants des matrices conjonctives extracellulaires : collagènes de divers types, protéoglycanes, élastine et glycoprotéines de structure de type fibronectine, laminine, [Hooper 1994; Sternlicht,Werb 2001]. En plus de leurs substrats matriciels, les MMP clivent aussi des molécules à la surface des cellules ainsi que des protéines péricellulaires non matricielles, pesant ainsi sur le devenir des cellules [Sternlicht *et al.* 2000]. Comme la plupart des molécules qu'elles modifient, les MMP influencent différents processus physiologiques et pathologiques incluant la reproduction [Dubois B. *et al.* 2000], le développement embryonnaire, la morphogenèse tissulaire, la cicatrisation, les maladies inflammatoires et les cancers [Nelson *et al.* 2000; Sternlicht *et al.* 2000].

L'aptitude à influencer le destin cellulaire et le développement nécessitent des systèmes de contrôle pointus. Les MMP sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs qui

MMP	Poids Moléculaire (latente/active)	Nom commun
MMP-1	55 / 45 kDa	Collagénase-1, collagénase interstitielle, collagénase fibroblastique, collagénase tissulaire
MMP-2	72 / 66 kDa	Gélatinase A, Gélatinase de 72kDa, Gélatinase de type IV, Gélatinase des neutrophiles
MMP-3	57 / 45 kDa	Stromélysine -1, Transine-1,
MMP-7	28 / 19 kDa	Matrilysine, PUMP-1, petite métalloprotéase utérine
MMP-8	75 / 58 kDa	Collagénase-2, Collagénase des neutrophiles
MMP-9	92 / 86 kDa	Gélatinase B, Gélatinase de 92 kDa, Collagénase de type IV
MMP-10	57 / 44 kDa	Stromélysine -2, Transine-2,
MMP-11	51 / 44 kDa	Stromélysine -3
MMP-12	54 / 45 et 22 kDa	Métalloélastase, Elastase des macrophages,
MMP-13	60 / 48 kDa	Collagénase-3
MMP-14	66 / 56 kDa	MT1-MMP
MMP-15	72 / 60 kDa	MT2-MMP
MMP-16	64 / 52 kDa	MT3-MMP
MMP-17	57 / 53 kDa	MT4-MMP
MMP-18	70 / 53 kDa	Collagénase-4 (Xénope)
MMP-19	54 / 45 kDa	RASI-1
MMP-20	54 / 22 kDa	Enamélylsine
MMP-21	?	XMMP
MMP-22	?	CMMP (Poulet)
MMP-23	?	Femalisyne
MMP-24	? / 62 kDa	MT5-MMP
MMP-25	?	MT6-MMP
MMP-26	28 / 19 kDa	Endométase, matrilysine-2
MMP-27	?	
MMP-28	?	Epilysine

Tableau 4 : Classification des MMP

D'après Sternlicht, M. D. and Werb, Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol 17, p463-516.

requièrent une activation [Harper *et al.* 1971]. Il s'est écoulé une décade entre cette découverte et la première révélation des activités collagénolytiques, et plus longtemps encore pour démontrer l'existence du premier des quatre inhibiteurs de MMP endogènes nommés inhibiteurs tissulaires de MMP ou TIMP [Bauer *et al.* 1975]. Depuis, d'autres niveaux de régulation des MMP ont été élucidés, mais il en reste certainement de plus complexes encore à éclaircir. En plus d'être différentiellement exprimées au niveau transcriptionnel, les MMP peuvent être contrôlées au niveau protéique par leurs activateurs et inhibiteurs endogènes, mais aussi par des facteurs influençant leur sécrétion, leur localisation à la surface cellulaire, ainsi que leur dégradation et leur clairance. La multiplicité des MMP, leurs fonctions qui bien que distinctes sont quelque peu redondantes, agissent certainement comme un garde-fou vis à vis d'une potentielle perte de contrôle de la régulation de ces enzymes. De nombreux travaux montrent les MMP comme étant des actrices clés de nombreux processus biologiques dont les fonctions premières sont aussi nécessaires que bénéfiques, cependant les mécanismes précis expliquant leur contribution ne sont pas complètement connus à ce jour.

A. Structure des MMP :

Il est fait référence aux MMP soit par leur nom commun soit par une nomenclature numérique séquentielle réservée aux vertébrés (tableau 4). Les MMP montrent une grande homologie de séquence et une structure hautement conservée [Stocker *et al.* 1995]. Elles sont regroupées en fonction de la structure modulaire de leurs différents domaines (figure 15).

Elles sont caractérisées par la présence d'un motif peptidique conservé au sein de leur structure : HEBXHXBGBXHZ ou les trois histidines se lient à l'atome de zinc du site actif et ou l'acide glutamique est essentiel à l'activité catalytique de l'enzyme. Comme les autres membres de la superfamille des metzincines [Barrett 1995], les MMP possèdent une boucle méthionine stabilisant la structure de leur site actif. Le prodomaine des MMP contient un motif PCR-X-X-PD ou la cystéine forme une liaison de coordination avec le zinc du site actif dans le proenzyme. L'ion zinc du site actif joue un rôle essentiel dans la catalyse en augmentant le caractère électrophile de l'atome de carbone appartenant au carbonyle de la liaison peptidique. Ces

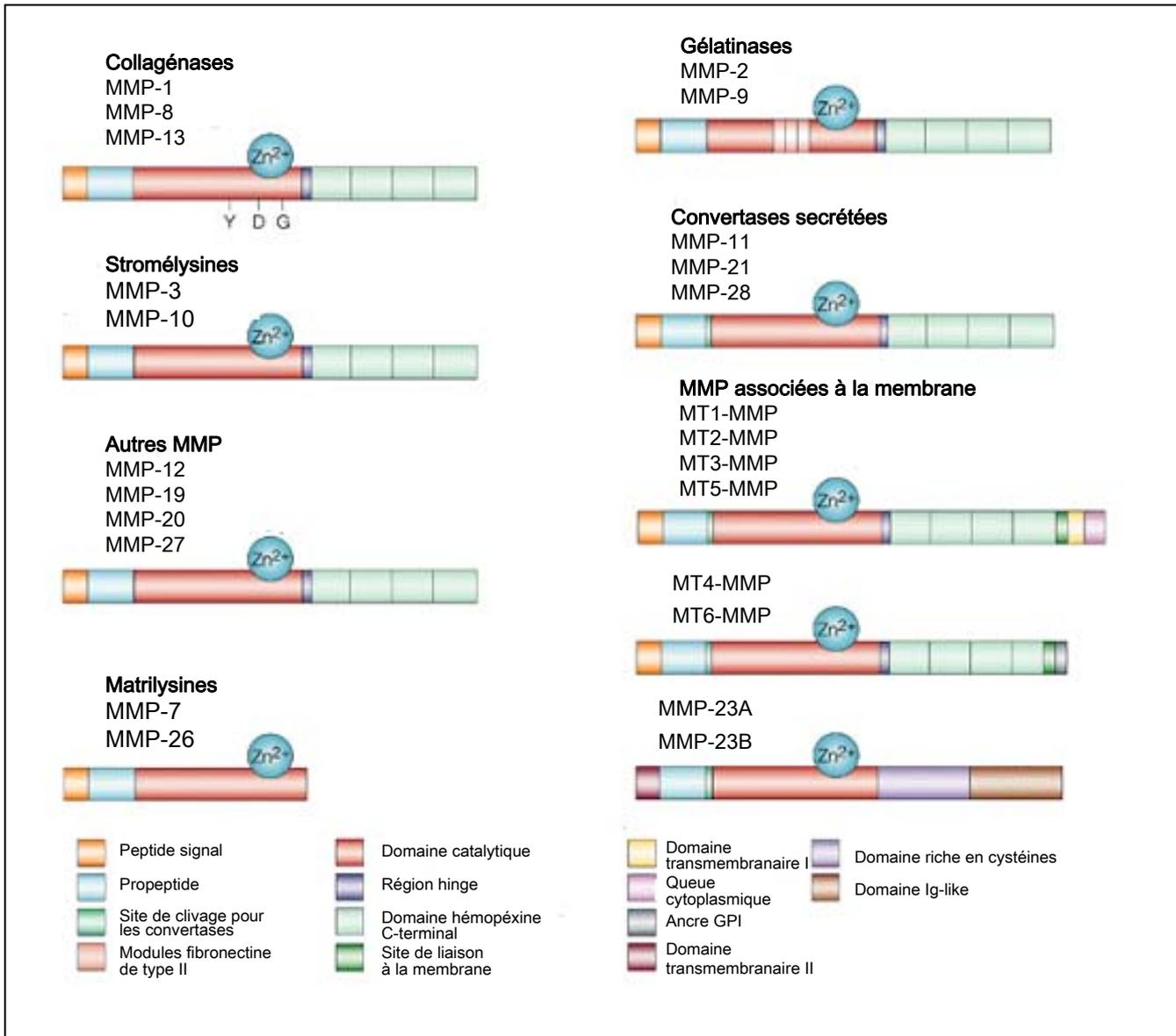


Figure 15 : Représentation de la structure modulaire des MMP.

D'après C. M. Overall, Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. 2002, Nat Rev Cancer, 2, 657-672.

enzymes requièrent par ailleurs l'ion calcium pour leur stabilité et l'expression de leur activité [Vallee,Auld 1992]. Au vu des rôles importants tenus par les ions Zn^{2+} et Ca^{2+} dans ces enzymes, leur vulnérabilité vis à vis des chélateurs capables de déplacer et de fixer les cations divalents est aisément imaginable.

Toutes les MMP ont une séquence signal N-terminale ou prédomaine, qui est clivée après leur synthèse dans le réticulum endoplasmique. La plupart de ces enzymes sont secrétées, cependant il faut noter que six MMP possèdent un domaine transmembranaire et sont exprimées à la surface cellulaire. Le prédomaine est suivi par un propeptide « pro » domaine qui maintient l'enzyme à l'état inactif jusqu'à ce qu'il soit clivé ou détruit, et un domaine catalytique qui contient la région de liaison au zinc hautement conservée [Nagase,Woessner 1999].

A l'exception de la MMP-7, de la MMP-26 et de la MMP-23, toutes les MMP ont un domaine « hémopexin/vitronectin like » qui est connecté au site catalytique par une région « hinge » ou « linker » [Gururajan *et al.* 1998; Park *et al.* 2000]. Quand il est présent, le domaine hémopexine influence la liaison aux TIMP, à certains substrats, l'activation membranaire et certaines activités protéolytiques. L'étude d'enzymes chimériques a montré que les extrémités N terminale et C terminale de la MMP-1 sont requises pour qu'elle puisse cliver le collagène fibrillaire natif [Murphy *et al.* 1992; Sanchez-Lopez *et al.* 1993]. Cette activité collagénolytique requiert initialement la liaison et l'orientation de la fibre de collagène, le débobinage local de la structure en triple hélice et le clivage séquentiel des chaînes α individuellement parce que la fente du site catalytique est trop exiguë pour pouvoir travailler sur la triple hélice entière [Overall C. M. *et al.* 1991b]. Apparemment le domaine hémopexine participe à toutes ces étapes mais en dernier. La composition et la taille de la région « hinge », varient selon les MMP et influencent la spécificité de substrat [Knauper *et al.* 1997].

Les gélatinases A et B, soit respectivement les MMP-2 et MMP-9, se distinguent des autres MMP par l'insertion à l'intérieur de leur domaine catalytique de trois motifs « tête à queue » riches en cystéine. Ces inserts ressemblent au site de liaison au collagène de type II de la fibronectine et sont requis pour lier et cliver le collagène et l'élastine [Murphy *et al.* 1994;

MMP	1	2	3	7	8	9	10	11	12	13	14	16	18	19	26
Substrats conventionnels															
Aggrecane	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+				
Collagène I	+	+	-	+	+	-			+	+	+		+	+	-
Collagène II	+				+	-				+	+				-
Collagène III	+	+	+	-	+	-	+				+	+	+		
Collagène IV	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-				+	+
Collagène V	-	+	+	-	-	+	+			-					
Collagène VI	-	-	-			-				+					
Collagène VII	+	+	+												
Collagène VIII	+														
Collagène IX	-	-	+							+					
Collagène X	+	+	+	-						+					
Collagène XI	+	+	+			+				-					
Collagène XIV	-		-	-		+				+					
Décorine	-	+	+	+		+									
Elastine	-	+	+	+		+	+		+						
Entactine/Nidogène	+	+	+	+					+		+				
Fibrilline		+	+				+		+	+	+				
Fibronectine	+	+	+	+	-	-	+		+	+	+	+		+	+
Fibuline		+		+											
Gélatine	+	+	+	+		+	+		+	+	+	+			+
IGFBP	+	+	+					+							
Laminine	+	+	+	+		+		-	+		+				-
Protéines de liaison	+	+	+	+		+	+								
Myeline basique	+	+	+	+		+			+						
Ostéonectine		+	+	+		+				+					
Tenascine	+	+	+	+		-								+	
Vitronectine	+	+	+	+		+			+		+				
Substrats non conventionnels															
α 1-antichymotrypsine	+	+	+			-									
α 2-macroglobuline	+	-	+		+	+		+	+	+	+				
α 1-protéase inhibiteur	+	+	+	+	+	+		+	+						+
Caseine	+	-	+			+	+	-		+				+	-
C1q	+	+	+		+	+				+					
E-cadhérine			+	+											
Facteur XII					-				+	+	+				
Fibrine	+	+	+			+					+				
Fibrinogène	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+				+
Il-1 α	-	-	-			-									
Il-1 β	+	+	+			+									
ProMMP-2											+	+			
ProTGF- β		+				+									
ProTNF- α	+	+	+			+			+		+				
Plasminogène		+	+			+			+						-
Substance P		+	+	+	+	+									
T kinogène		-	+			-									

Tableau 5 : Classification des MMP

D'après Sternlicht, M. D. and Werb, Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol 17, p463-516.

Shiple et al. 1996]. Par ailleurs, MMP-9 a un insert semblable au collagène de type V à la fin de la région « hinge », dont l'importance est à ce jour inconnue [Huhtala et al. 1990].

Finalement, les MMP membranaires, mises en évidence par Sato et collaborateurs [Sato H. et al. 1994] ont un domaine transmembranaire à passage unique et une courte queue cytoplasmique C terminale (MMP-14, -15, -16 et -24) ou bien une région hydrophobe qui agit comme une ancre glycoposphatidyl inositol (MMP-17 et -25) [Itoh et al. 1998]. Ces domaines jouent un rôle essentiel dans la localisation d'évènements protéolytiques spécifiques de certaines régions de la surface cellulaire.

B. Substrats conventionnels et non conventionnels des MMP :

Très peu de véritables substrats des MMP ont été définitivement identifiés *in vivo*, la plupart des candidats ont été testés et identifiés *in vitro*. Pendant très longtemps, seuls les substrats conventionnels des MMP, c'est à dire les substrats matriciels, ont été explorés, mais cela ne donne qu'une vision limitée et tronquée du champ des substrats de ces enzymes. En effet elles ont la capacité de cliver bons nombres de substrats non conventionnels, que sont les cytokines, les facteurs de croissance, ainsi que d'autres protéines. Par contre, les substrats conventionnels ont permis de répartir les membres de la famille MMP en quatre groupes principaux que sont les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, l'élastase et un dernier groupe ou sont rassemblées les MMP membranaires :

- **les collagénases** regroupent la collagénase interstitielle ou MMP-1, la collagénase des neutrophiles ou MMP-8 et la MMP-13 ou collagénase 3,
- **les gélatinases** sont déclinées en gélatinases de type A ou MMP-2 et de type B ou MMP-9,
- **les stromélysines** qui se composent des MMP-3, -10 et -11, dont le chef de file est sans conteste la MMP-3,
- **l'élastase** ou MMP-12,
- **les MMP membranaires** ou MT1-, MT2-, MT3- et MT4-MMP.

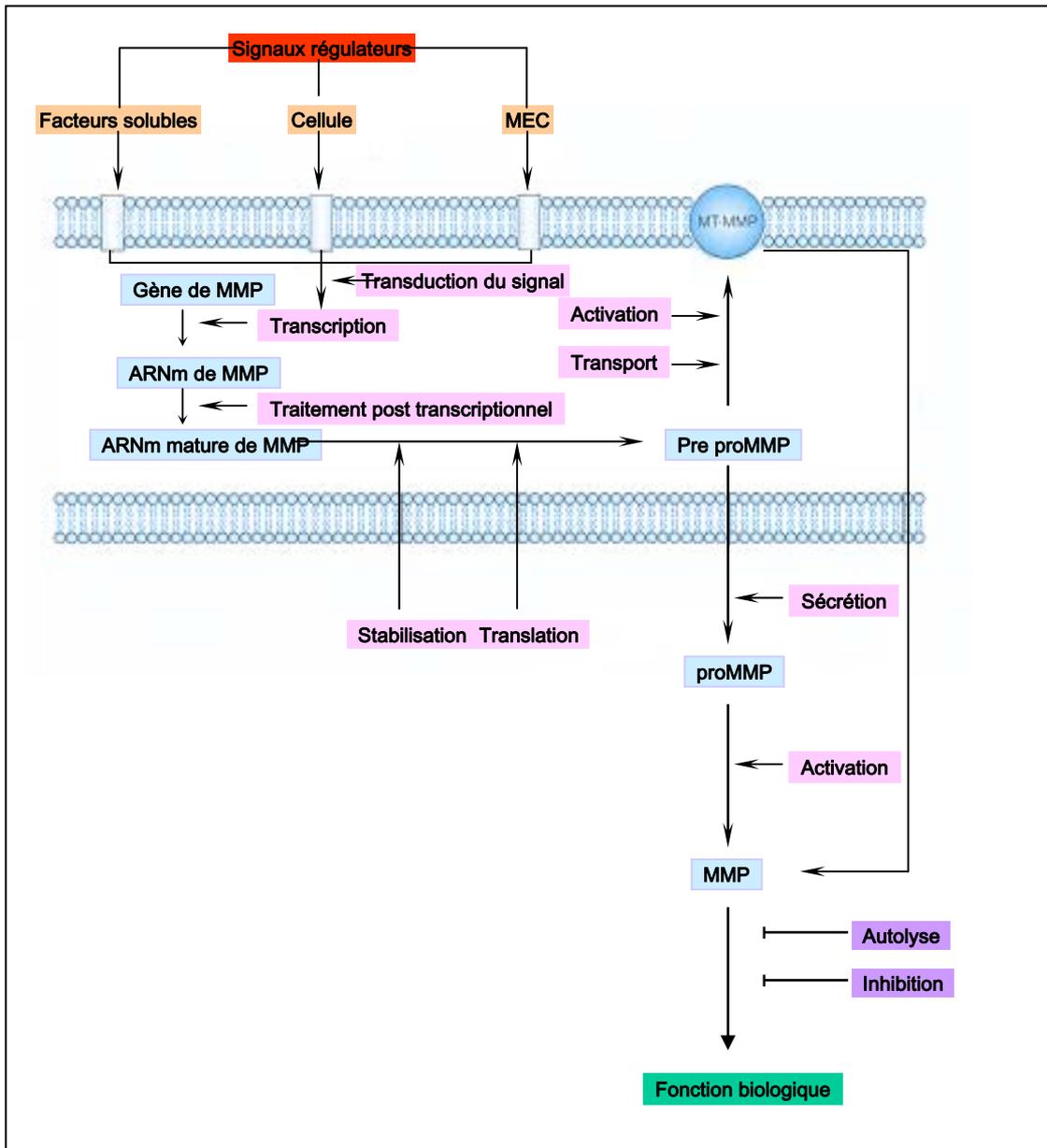


Figure 16 : Différents niveaux de régulation de l'expression de l'activité des MMP

D'après C. M. Overall, Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. 2002, Nat Rev Cancer, 2, 657-672.

Une liste des substrats conventionnels et non conventionnels de ces enzymes est présentée dans le tableau 5 [Hiller *et al.* 2000; Park *et al.* 2000; Uria,Lopez-Otin 2000; Woessner JF,Nagase 2000; Sternlicht,Werb 2001].

IV. Les différents modes de régulation de l'activité des MMP :

Les MMP sont hautement régulées, aux niveaux transcriptionnels et post-transcriptionnels et sont aussi contrôlées au niveau protéique via leurs activateurs, leurs inhibiteurs et leur localisation à la surface de la cellule (figure 16).

A. Régulation transcriptionnelle :

La plupart des MMP, à l'exception notable de la MMP-2 qui est constitutivement exprimée, sont régulées au niveau transcriptionnel. La façon selon laquelle un gène de MMP va répondre à un certain stimulus dépend de l'organisation de son promoteur transcriptionnel, de la présence ou de l'absence de certains autres signaux et plus largement du contexte cellulaire.

L'expression génique des MMP, basale et inductible, peut aussi être influencée par des variations génétiques, ce qui peut par conséquent influencer sur le développement et / ou la progression de certaines maladies. Un polymorphisme mono-nucléotidique bi-allélique commun ou SNP, qui influence le taux de transcription, a été identifié dans certains promoteurs de gènes de MMP [Ye 2000]. On peut citer à ce titre l'exemple des SNP de MMP-3, -9 et -12 qui sont malgré leur modeste influence sur la transcription génique, associés chacun à la progression de maladies des artères coronaires.

L'expression génique des MMP est régulée par de nombreux facteurs exogènes stimulants ou suppresseurs impliqués dans de multiples voies de signalisation [Fini M. E. *et al.*]. On peut citer l'exemple des esters de phorbol, des protéines de la matrice extracellulaire, des signaux dérivés des intégrines, du stress cellulaire, qui peuvent stimuler ou réprimer l'expression des MMP [Sternlicht,Werb 2001]. L'expression des MMP peut de plus être régulée par certaines cytokines et facteurs de croissance, comme les interleukines, les interférons, l'EGF, le KGF, les différentes isoformes du TGF- β , le TNF- α , le butyrate...via des facteurs de

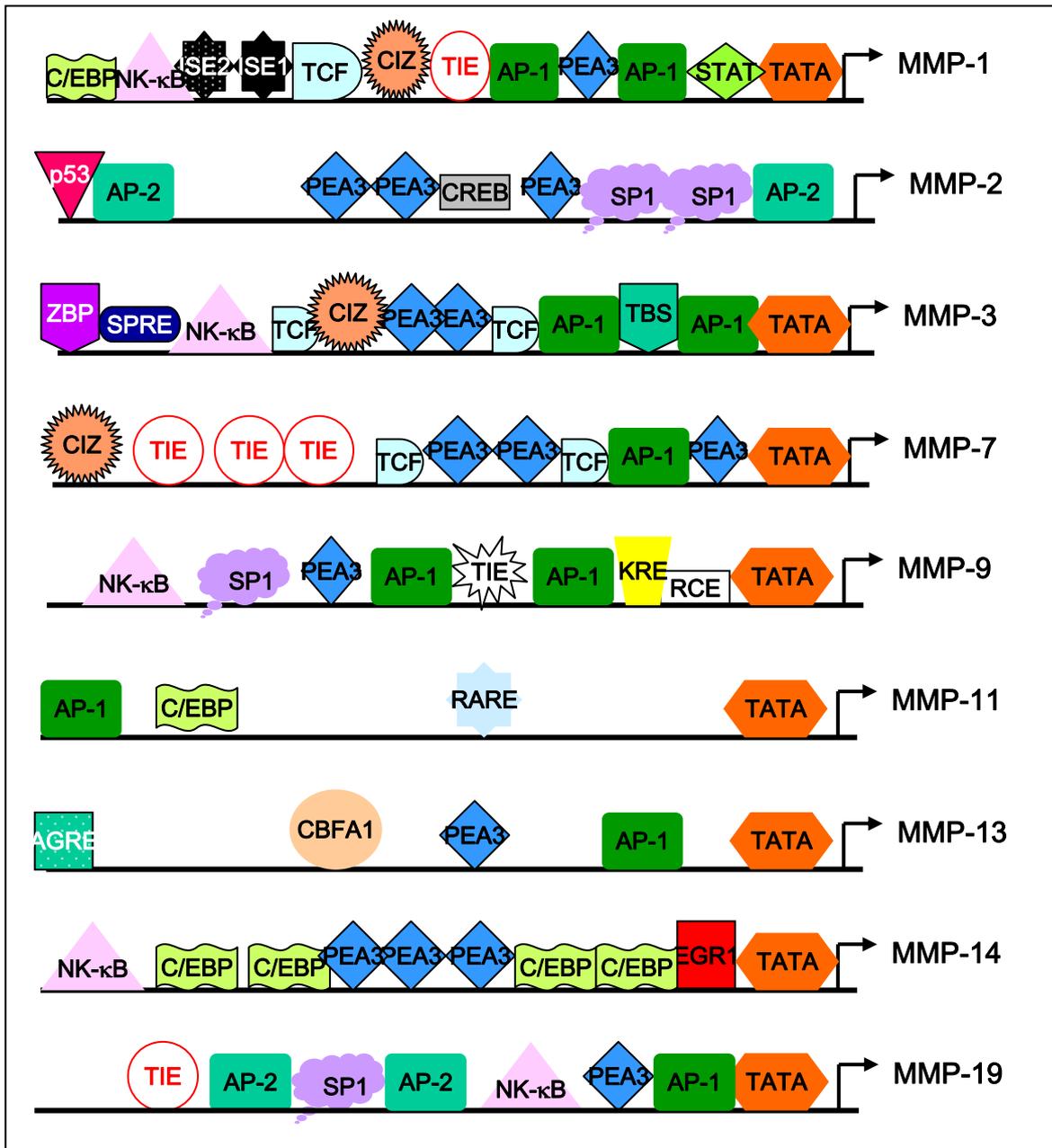


Figure 17 : Éléments de régulation des régions promotrices des gènes humains de MMP.

D'après C. M. Overall, Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. 2002, Nat Rev Cancer, 2, 657-672.

transcription [Pender *et al.* 2000a] [Esteve *et al.* 1998] [Gan *et al.* 2001]. La plupart des ces stimuli induisent l'activation de NF- κ B et /ou des proto-oncogènes c-fos et c-jun qui hétérodimérisent et lient les sites AP-1 présents dans les sites promoteurs de certaines MMP (figure 18) [Smart *et al.* 2001].

Certains éléments *cis* de régulation influencent l'expression génique des MMP, en fonction de leur proximité vis à vis d'autres éléments dans le promoteur du gène (figure 17). Les sites AP-1 donnent à certains gènes de MMP la capacité d'être induits par les esters de phorbol et agissent synergiquement avec les sites Ets adjacents comme c'est le cas pour MMP-1, en revanche d'autres MMP comme MMP-13, ne sont pas régulés de cette façon [Pendas *et al.* 1997]. Cette différence est certainement due au fait que les sites AP-1 et Ets sont éloignés de 9 nucléotides dans le promoteur de MMP-1 alors qu'ils sont distants de 20 nucléotides dans le promoteur du gène de MMP-13 et que la distance entre ces deux sites est un élément critique [Gutman, Wasylyk 1990]. Certains autres éléments potentiels de régulation ont été identifiés dans les promoteurs de divers gènes de MMP, on peut citer les éléments AP-2, Sp1, Sp3, l'élément de réponse à l'acide rétinoïque, les éléments inhibiteurs du TGF- β , NF- κ B, ce dernier élément étant sans doute l'un des plus importants [Fini M. E. *et al.* 1998; Lohi *et al.* 2000] [Ludwig *et al.* 2000]. Par ailleurs un site de liaison pour la p53 sauvage a été identifié dans le promoteur du gène MMP-2 [Bian, Sun 1997], elle dérégule l'expression génique basale et inductible de MMP-2 dans les fibroblastes humains alors que les mutants de p53 n'y parviennent pas [Sun *et al.* 1999]. Dans le même ordre d'idée, la dérégulation de p53 via l'antigène T de SV40 conduit à la suppression de l'expression de MMP-2, -3 et -9 dans des trophoblastes de placenta humain [Logan *et al.* 1996]. Par ailleurs, les travaux de Lohi et collaborateurs indiquent que l'expression basale de MMP-2, MMP-14 et TIMP-2 est co-régulée, ce qui semble logique au vu non seulement de leur collaboration au cours du processus d'activation de MMP-2 (voir paragraphe D) mais aussi de similarités retrouvées dans leurs promoteurs [Lohi *et al.* 2000].

Dans certains cas, un signal peut réguler de façon coordonnée les gènes de certaines MMP et différenciellement en contrôler d'autres. On peut citer à ce sujet le TGF- β qui supprime

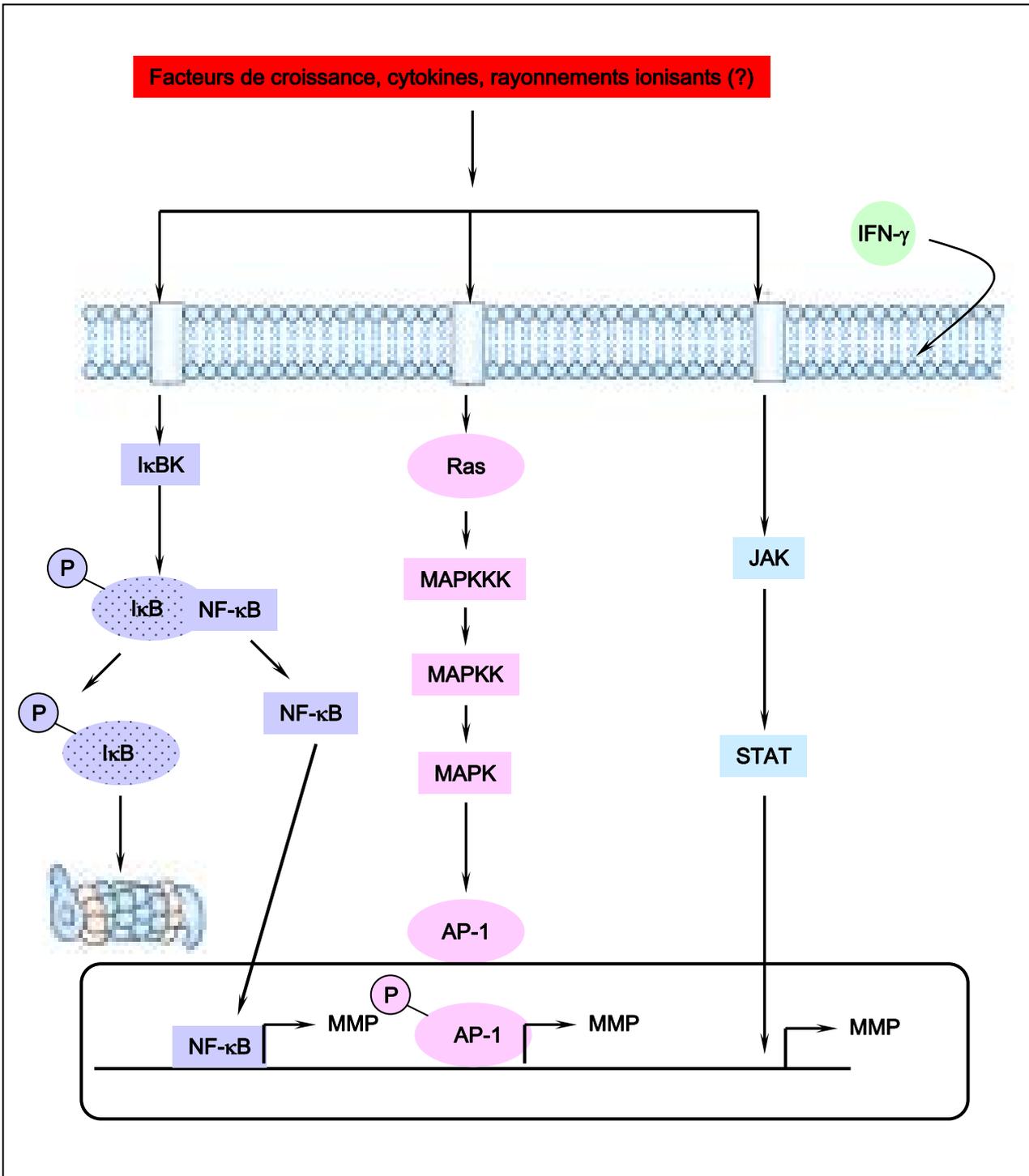


Figure 18 : Voies de signalisation impliquées dans la transcription des gènes de MMP.
 D'après C. M. Overall, Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. 2002, Nat Rev Cancer, 2, 657-672.

la transcription des MMP-1 et -3 tout en induisant la MMP-13 [Uria *et al.* 1998], mais aussi la MMP-2 [Overall CM. *et al.* 1991a; Mauviel 1993; Phillips *et al.* 2003].

B. Régulation post-transcriptionnelle :

Des mécanismes post-transcriptionnels affectant les ARNm peuvent aussi influencer l'expression des MMP. C'est le cas des ARNm codant pour MMP-1 et -3 qui sont stabilisés par les esters de phorbol et l'EGF alors que ceux de la MMP-13 sont stabilisés par le PDGF et les glucocorticoïdes et déstabilisés par les TGF- β , tandis que ceux de la MMP-2 sont stabilisés par le TGF- β 1 [Overall C. M. *et al.* 1991b].

C. La régulation de la sécrétion des MMP :

Les MMP néosynthétisées sont secrétées, leur sécrétion est placée sous le contrôle d'acteurs cellulaires ou moléculaires prêts à intervenir dès la fin de la traduction. La plupart des MMP sont constitutivement sécrétées exception faite des MMP-8 et -9. Ces dernières sont synthétisées entre autres par les granulocytes différenciés de la moelle osseuse, stockées dans les granules tertiaires des neutrophiles circulants et relarguées au cours de l'activation neutrophilique médiée par des médiateurs inflammatoires (comme le TNF α , l'IL1- β , les facteurs de croissance, les prostanoïdes, ...) [Hasty *et al.* 1990]. Les travaux menés par G. Opdenakker ont mis en évidence que les polynucléaires neutrophiles (PNN) produisent certes de la MMP-9, mais le plus souvent sous forme de complexes covalents d'homodimères de 200 kDa ou d'hétérodimères de 120 kDa associant la gélatinase B au lipocalin. Comparativement aux monocytes et aux cellules tumorales, les neutrophiles ne produisent ni gélatinase A ni TIMP-1 [Opdenakker *et al.* 2001]. Dans les macrophages, la plasmine induit la synthèse de MMP-12 sans moduler son taux de transcription [Raza *et al.* 2000].

D. L'activation des proMMP :

Comme nous l'avons déjà entrevu et pareillement aux autres enzymes protéolytiques, les MMP sont tout d'abord synthétisées sous forme de pro-enzymes inactives ou zymogènes.

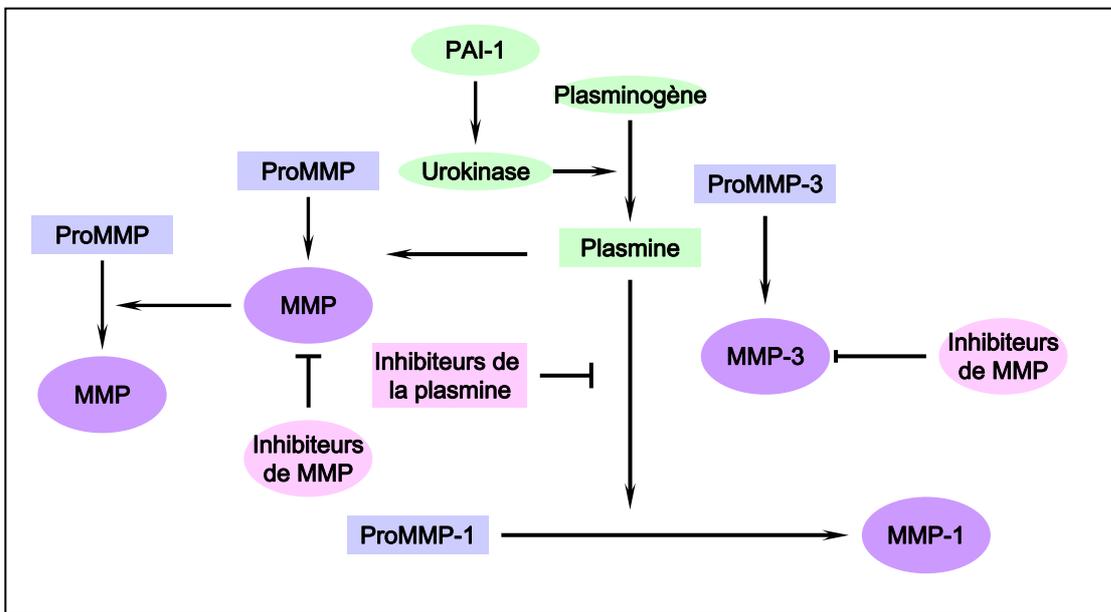


Figure 19 : Schéma global de la cascade protéolytique d'activation des MMP.
 D'après C. M. Overall, Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. 2002, Nat Rev Cancer, 2, 657-672.

Leur latence est maintenue par un groupe cystéine sulfhydryl non apparié localisé à proximité de la portion C-terminale du domaine propeptide. Ce groupement sulfhydryl agit comme un quatrième ligand vis à vis de l'ion zinc du site actif, et l'activation requiert le clivage de la liaison cystéine-zinc par protéolyse du domaine propeptide ou par perturbation ectopique de l'interaction cystéine-zinc [Van Wart, Birkedal-Hansen 1990]. Une fois déplacé, le groupe thiol est remplacé par une molécule d'eau qui pourra attaquer le pont peptidique des cibles des MMP.

Alors que la plupart des MMP sont sécrétées sous forme de zymogènes latents, la MMP-11, -27 et les MT-MMP contiennent un motif de reconnaissance pour les enzymes de type furine RXK/RR, entre leur propeptide et leur domaine catalytique. Cela leur alloue la capacité d'être activées par une sérine protéase de type subtilisine, et cela même avant d'arriver à la surface cellulaire ou d'être sécrétée [Pei, Weiss 1995]. Une voie d'activation des MMP membranaires, indépendante de la furine a été décrite, impliquant une proprotéine convertase [Sato T. *et al.* 1999; Yana, Weiss 2000].

Les autres MMP ne possèdent pas cet insert de reconnaissance pour la furine et sont par conséquent activées à l'extérieur de la cellule, après leur sécrétion. La protéolyse du plasminogène inactif, sous l'influence de l'activateur du plasminogène de type urokinase (U-PA) ou de type tissulaire (t-PA), génère une sérine protéase, la plasmine, responsable au même titre que d'autres MMP préalablement activées, de l'activation extracellulaire de la plupart des MMP. L'activation se fait par clivage des ponts peptidiques assurant la liaison entre le corps enzymatique et le prodomaine [Woessner JF, Nagase 2000]. Un schéma global des cascades protéolytiques d'activation des MMP est proposé en figure 19.

L'activation de la MMP-2 est régie par un mécanisme particulier, en effet elle est activée à la surface cellulaire suivant un processus différent et unique impliquant MT1-MMP et TIMP-2 (figure 20) [Strongin *et al.* 1995]. L'activation de la proMMP-2 à la surface cellulaire est régulée par la balance existant entre MT1-MMP complexée à TIMP-2 (fonction de récepteur à MMP-2) et TIMP-2 et MT1-MMP libres (fonction d'activateur de la liaison de MT1-MMP à MMP-2). TIMP-2 se lie au site catalytique des molécules de MT1-MMP préalablement activées, générant ainsi

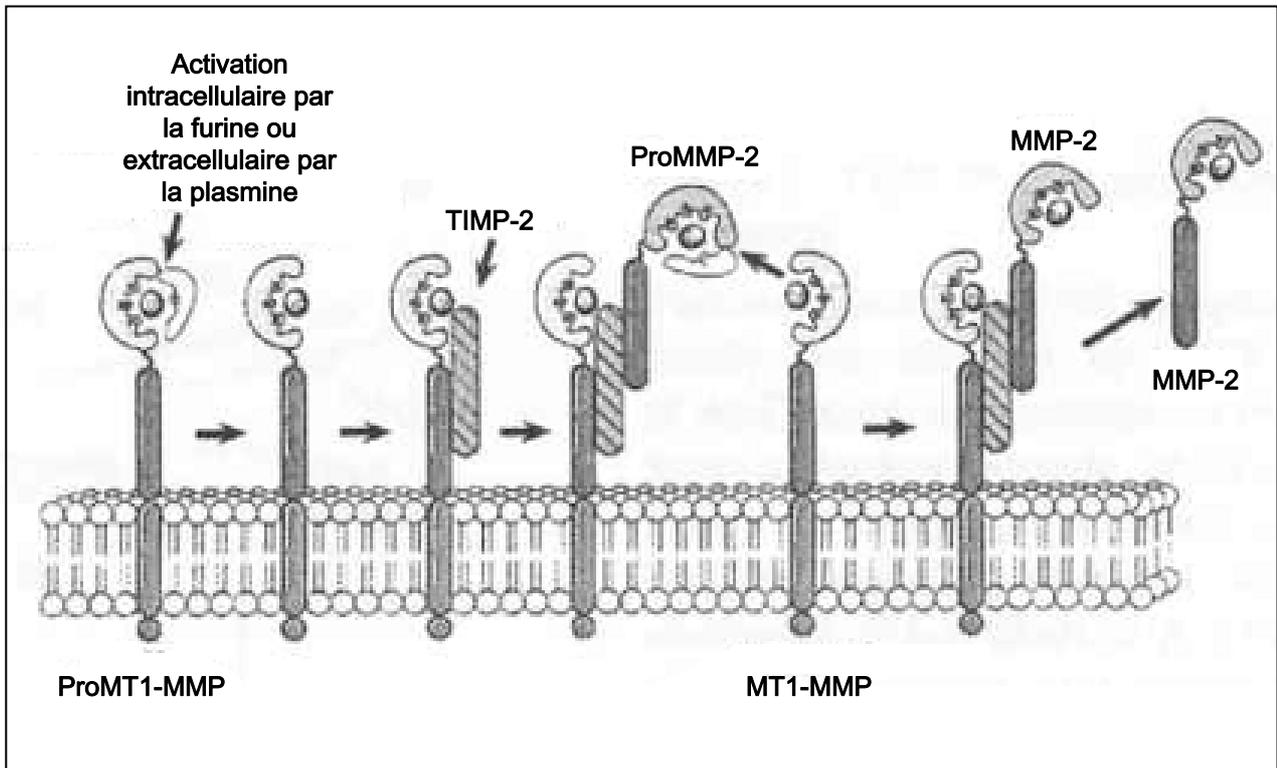


Figure 20 : Activation de la ProMMP-2

D'après Z. Werb, ECM and Cell Surface Proteolysis : Regulating Cellular Ecology. 1997, Cell, 91, p 439-442.

des récepteurs à proMMP-2. C'est la liaison du complexe trimoléculaire formé (MT1-MMP●TIMP-2●ProMMP-2) à une seconde MT1-MMP active qui libère la gélatinase A active [Maquoi *et al.* 2000]. Ces données illustrent la dualité de TIMP-2, qui pour des taux bas à modérés promeut l'activation de MMP-2 alors que des taux élevés inhibent cette activation en saturant les MT-MMP libres qui ne peuvent plus alors détacher le prodomaine de MMP-2 [Strongin *et al.* 1995; Caterina *et al.* 2000].

Le rôle de TIMP-2 dans l'activation de MMP-2 est primordial dans les fonctions *in vivo* de l'enzyme [Hernandez-Barrantes *et al.* 2000] et a été montré au cours d'expériences de mutagenèse dirigée chez la souris [Wang Z. *et al.* 2000b]. Tandis que le domaine C-terminal de TIMP-2 participe à la rétention à la surface de la cellule et à l'activation de MMP-2 [Lehti *et al.* 2000], sa partie N-terminale est un inhibiteur de MMP. En présence de substrats de la MMP-2 comme le collagène de type IV, les taux de protéine TIMP-2 sont réduits et l'activation de la MMP-2 est augmentée [Maquoi *et al.* 2000]. Toutefois, la capacité du collagène à induire « à la demande » l'activation de MMP-2, résulte probablement de la dégradation de TIMP-2, parce qu'elle ne s'accompagne pas de modulation dans l'expression des ARNm codant pour MMP-2, MT1-MMP ou TIMP-2 ou dans la synthèse ou l'activation de MT1-MMP. Cependant, une accumulation locale de collagène de type IV pourrait conduire à la dégradation de MMP-2 par modulation locale des concentrations de TIMP-2 à des taux favorisant l'activation de MMP-2.

E. Les inhibiteurs endogènes des MMP :

Une autre régulation majeure de l'activité des MMP est exercée par des antagonistes tissulaires spécifiques que sont les TIMP. Souvent produits et sécrétés par les mêmes types cellulaires que ceux qui produisent les MMP, ils se retrouvent à leur côté dans les milieux extracellulaires. Les TIMP constituent une famille de quatre protéines glycosylées, sécrétées, numérotées de 1 à 4, dont la taille est comprise entre 20 et 24 kDa, présentant de grandes analogies de structure, mais différant par leurs expression et régulation géniques, leurs caractéristiques structurales, leurs propriétés biochimiques et par leur spécificité tissulaire (tableau 6) [Edwards 2001]. Par association stœchiométrique 1 :1 au site catalytique des MMP

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Poids en kDa	28	21	24/27	22
sites de N-glycosylation	2	0	1	0
Localisation	soluble	soluble + surface cellulaire	matrice extracellulaire	soluble + surface cellulaire
Association à une pro-MMP	proMMP-9	proMMP-2	proMMP-2/-9	proMMP-2

Tableau 6 : Classification des TIMP

D'après Lambert E, Critical Review in Oncology and hematology, 49 (2004), p187-198.

activées, ils forment avec celles-ci des complexes non covalents, réversibles, qui les empêchent d'accéder à leurs substrats. Les TIMP inhibent toutes les MMP et peuvent aussi réguler l'auto-activation des pro-MMP. Des expériences de mutagenèse dirigée ont mis en évidence d'une part que l'inhibition réside entièrement dans le domaine N-terminal, alors que les autres domaines semblent influencer la liaison de l'inhibiteur à l'enzyme [Willenbrock, Murphy 1994], mais aussi que la spécificité de TIMP-2 pour les MMP-2, -3, -7, -13 et -14 peut être modifiée par la mutation d'un seul acide aminé [Butler *et al.* 1999]. Par ailleurs, il semble exister des modes préférentiels d'inhibition. C'est à ce titre que peut être évoqué l'exemple du domaine C-terminal de TIMP-1 qui se lie au domaine hémopexine de MMP-9 plus facilement qu'il ne se lie au domaine hémopexine de MMP-2, alors que le domaine C-terminal de TIMP-2 se lie préférentiellement au domaine hémopexine de MMP-2 [Murphy, Willenbrock 1995]. Ils diffèrent dans leur capacité à inhiber les différentes MMP. Par exemple, TIMP-2 et -3 inhibent MT1-MMP, alors que TIMP-1 en est incapable [Will *et al.* 1996]. La connaissance des promoteurs des gènes de TIMP est moins étendue que celle des MMP, cependant des travaux récents ont mis en évidence que l'expression génique de TIMP-1 est médiée au niveau transcriptionnel via des facteurs de transcription de type AP-1, STAT, Pea3/Ets, UTE-1 [Logan *et al.* 1996; Bahr *et al.* 1999; Trim *et al.* 2000]. TIMP-2 est souvent produit de façon concomitante avec TIMP-1, cependant sa régulation est totalement distincte de celle de TIMP-1, sa production est en effet constitutive. Il faut rappeler le rôle supplémentaire joué par TIMP-2, qui intervient dans la présentation de la proMMP-2 à la MT-MMP, dans l'activation de MMP-2. L'étude des souris KO pour TIMP-2 a démontré l'hypothèse mécanistique du rôle unique joué par TIMP-2 dans l'activation de la proMMP-2 avancée par Wang et collaborateurs. En effet ces souris montrent une altération de l'activation de la proMMP-2 [Caterina *et al.* 2000; Wang Z. *et al.* 2000b]. La production des TIMP est régulée par divers agents parmi lesquels il faut citer les cytokines comme l'IL1- β , le TNF- α , le TGF- β , et les facteurs de croissance comme l'EGF, les rétinoïdes et les glucocorticoïdes.

En plus de leur fonction d'inhibiteur de métalloprotéases, les TIMP ont d'autres fonctions biologiques, distinctes de l'inhibition des MMP et dont les mécanismes restent à découvrir

(revue dans [Lambert *et al.* 2004]). Les TIMP ont des effets sur la croissance cellulaire et la survie. Il a récemment été montré que TIMP-1 et TIMP-2 stimulent la croissance de certaines cellules [Bertaux *et al.* 1991; Hayakawa 1994; Corcoran, Stetler-Stevenson 1995; Hornebeck 2003], stimulent la capacité de résorption osseuse des ostéoclastes via une voie impliquant les tyrosines et MAP kinases alors que les inhibiteurs synthétiques de MMP sont sans effet [Sobue *et al.* 2001]. Ces antagonistes tissulaires ont par ailleurs des effets divergents sur la mort cellulaire programmée et sur la tumorigénèse [Baker *et al.* 2002].

Tous ces éléments font des TIMP des protéines multifonctionnelles, éléments clefs de la régulation de l'activité des MMP, qui permettent une dégradation sélective et contrôlée des constituants matriciels par les MMP [Nguyen *et al.* 1994; Willenbrock, Murphy 1994].

Les TIMP ne sont pas les seuls inhibiteurs endogènes des MMP, il faut citer l' α 2-macroglobuline qui est l'inhibiteur majeur des MMP dans les fluides corporels et en particulier dans le plasma, alors que les TIMP agissent localement [Sottrup-Jensen, Birkedal-Hansen 1989]. L' α 2-macroglobuline est une protéine de 720 kDa, majoritairement synthétisée dans le foie par les hépatocytes et minoritairement par d'autres cellules comme les macrophages. Cette protéine est décrite comme étant un inhibiteur universel de protéases incluant les MMP. Elle agit selon un mécanisme impliquant la présentation d'une région, qui joue le rôle d'amorce, clivée par protéolyse, causant ainsi une modification conformationnelle qui prend au piège la protéase, qui devient ancrée de façon covalente par transacylation [Baker *et al.* 2002]. S'il existe un consensus général sur le fait que l' α 2-macroglobuline soit l'inhibiteur majoritaire des MMP dans le plasma, son rôle et son importance dans la régulation de l'activité péricellulaire des MMP est assez mal caractérisé et controversé. Par ailleurs, il faut noter que l' α 2-macroglobuline a aussi une variété d'effets qui ne sont pas directement liés à sa capacité à inhiber les protéases et qui incluent par exemple la liaison aux cytokines et en particulier au TGF- β [Armstrong, Quigley 1999].

F. Catabolisme et clairance des MMP :

Un moyen évident de régulation des MMP est leur propre inactivation protéolytique et leur clairance physique. Malgré les progrès considérables qui ont été faits dans la connaissance du processus de protéolyse progressive de ces enzymes, bien peu de choses sont connues sur l'autoprotéolyse des MMP actives. Néanmoins, il semble clair que certains clivages inactivent les MMP, tandis que d'autres et en particulier ceux qui séparent le domaine hémopéxine, peuvent générer des enzymes tronquées qui perdent ainsi leur capacité à dégrader certains substrats [Woessner JF, Nagase 2000]. Ces clivages peuvent par ailleurs diminuer leur affinité pour les TIMP et moduler ainsi leur capacité à être inhibée, comme cela a été montré pour la partie C-terminale de MMP-2 [Itoh *et al.* 1998]. La perte du domaine « hémopéxine like » peut aussi faire perdre à certaines MMP la capacité à être localisée à la surface cellulaire. Dans de telles conditions, les MT-MMP peuvent être sécrétées [Imai *et al.* 1996]. Les facteurs qui influencent la dégradation des MMP peuvent altérer la concentration des MMP, leur spécificité de substrats, leur localisation et leur capacité à être activées ou inhibées.

Un autre mode de régulation des taux extracellulaires de MMP est la clairance directe de enzymes intactes. Certaines MMP clivent la région amorce de l' α 2-macroglobuline, ce qui initie un changement conformationnel de cette macroglobuline, piégeant ainsi irréversiblement la MMP [Sottrup-Jensen, Birkedal-Hansen 1989]. Même si l'activité catalytique de l'enzyme n'est pas ainsi inhibée, cette modification conformationnelle empêche l'enzyme d'interagir avec ses substrats naturels, le complexe MMP- α 2-macroglobuline peut alors être éventuellement endocyté et définitivement éliminé.

La thrombospondine-2 ou TSP-2, protéine matricielle, est impliquée dans la clairance des MMP. Les souris déficientes en TSP-2 présentent de nombreuses anomalies du tissu conjonctif et leurs fibroblastes montrent un défaut d'adhésion résultant d'une augmentation des taux de MMP-2. L'augmentation des taux de MMP-2 est due au fait que normalement la TSP-2 lie la MMP-2, sous la forme latente mais aussi sous la forme active, avant d'être endocytée par le récepteur scavenger LRP [Yang *et al.* 2001] et dégradée dans les lysosomes.

G. Localisation péricellulaire et activité protéolytique :

La plupart des événements de signalisation extracellulaire qui régulent le devenir de la cellule se produisent à la membrane cellulaire ou à proximité de cette dernière. Ces signaux cellulaires sont créés ou supprimés par protéolyse péricellulaire [Werb 1997], qui parce qu'irréversible, est un moyen idéal de régulation des signaux extracellulaires de transduction. Les MMP, hautement impliquées dans ces protéolyses péricellulaires, sont confinées ou concentrées dans le microenvironnement péricellulaire immédiat par des mécanismes spécifiques. Ces mécanismes de localisation des MMP à la surface cellulaire, au niveau de domaines spécifiques, incluent l'expression des MMP membranaires liées à la membrane, la liaison des MMP aux récepteurs cellulaires de surface, la présence d'enzymes qui activent les MMP comme u-PA, le plasminogène, et la concentration des MMP au niveau des molécules de la matrice extracellulaire péricellulaire. Ces différents mécanismes augmentent l'activation des MMP, limitent l'accès aux inhibiteurs de ces enzymes, concentrent les MMP à proximité de leurs cibles, et limitent l'extension de la protéolyse à des régions péricellulaires peu étendues.

Les MT-MMP membranaires ou liées par ancre GPI sont les médiateurs les plus patents de l'activité protéolytique à la surface des cellules. La perte des domaines transmembranaires des MT1, MT2 et MT3-MMP abolit totalement leur capacité à promouvoir l'invasion cellulaire [Hotary *et al.* 2000].

L'arrimage à la surface cellulaire via des récepteurs est un autre moyen de localiser les MMP à la surface des cellules. C'est le cas de la MMP-2 active qui se lie à l'intégrine $\alpha v \beta 3$ à la surface des cellules endothéliales et des cellules cancéreuses invasives [Brooks *et al.* 1996]. De la même façon, MMP-1 peut aussi interagir avec les intégrines de la surface cellulaire, MMP-1 inactive et active se lient aux intégrines $\alpha 2 \beta 1$, alors que MMP-3 et MMP-13 en sont incapables [Stricker *et al.* 2001].

L'environnement péricellulaire matriciel, au travers de sa composition en certains constituants, comme le collagène de type I natif ou dénaturé, peut lui même moduler l'activité des MMP-1 et MT1-MMP comme cela est montré dans la figure 21 proposée par W. Hornebeck

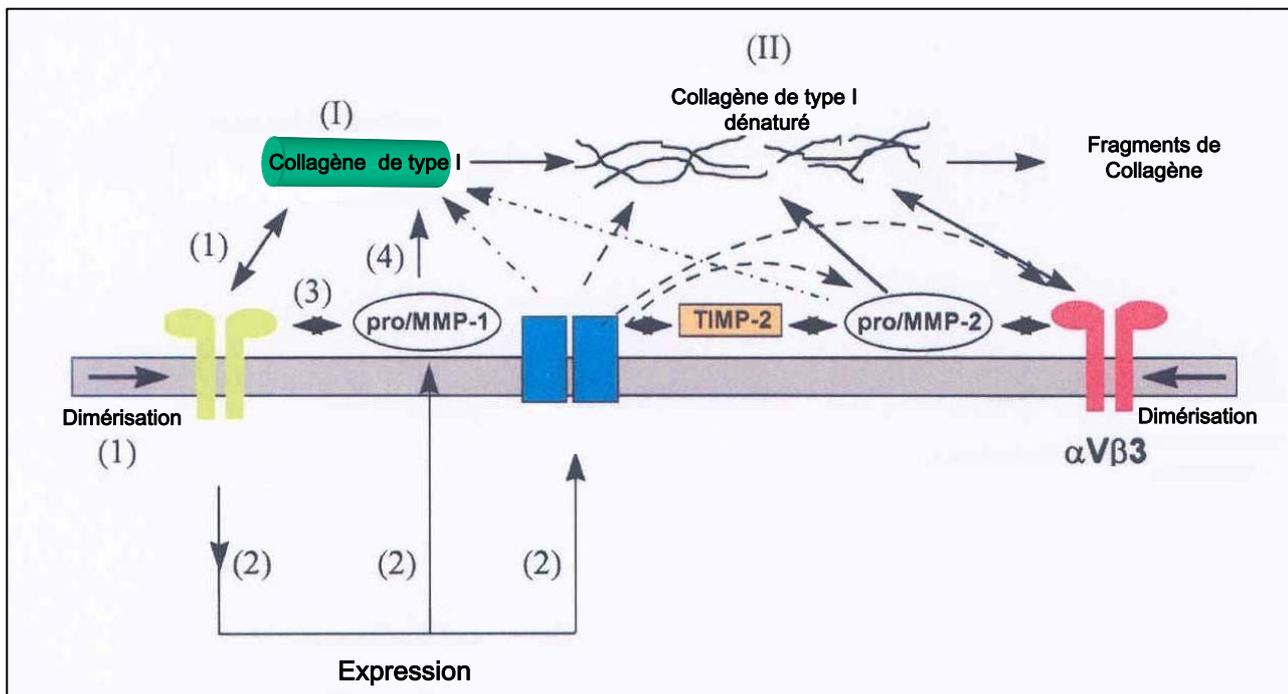


Figure 21 : Collaborations collagènes-MMP-Intégrines.

D'après Hornebeck. Seminars in Cancer Biology, 2002, vol 12, pp231-241.

Étape I : le collagène de type I interagit avec les intégrines, provoquant leur dimérisation (1), cette interaction induit l'expression de MMP-1 et MT-1-MMP (2), la proMMP-1 se lie à l'intégrine $\alpha2\beta1$ favorisant ainsi sa propre activation (3), et par suite le clivage des collagènes fibrillaires (4).

Étape II : Les collagènes dénaturés exposent des sites reconnus par l'intégrine $\alphaV\beta3$ (1), l'augmentation de la MT1-MMP à la membrane catalyse la première étape de l'activation de la proMMP-2 via la formation du complexe ternaire MT1-MMP/TIMP-2/proMMP-2 (2), MT1-MMP peut aussi participer à l'hydrolyse du collagène fibrillaire de type I, comme dans l'étape I, la proMMP-2 partiellement activée se lie à l'intégrine $\alphaV\beta3$ suivant une interaction favorisant le processus final par lequel l'enzyme peut dégrader non seulement les collagènes dénaturés mais aussi le collagène fibrillaire de type I.

[Hornebeck *et al.* 2002]. La MEC, via les produits de dégradation issus de la protéolyse péricellulaire de certains de ses constituants comme le collagène de type IV ou l'élastine médiée par les MMP, peut en retour réguler, positivement ou négativement, l'expression et l'activation des MMP et finalement avoir ainsi une influence directe sur le devenir cellulaire. En effet, le domaine non collagénique de la chaîne $\alpha 3$ du collagène de type IV, par l'intermédiaire de la liaison à l'intégrine $\alpha v \beta 3$, inhibe l'expression de MT1-MMP et de l'intégrine $\alpha v \beta 3$ dans des cellules de mélanome. Cela a pour conséquence d'empêcher la migration et la croissance cellulaire, tandis que de façon opposée, un motif particulier de l'élastine, le peptide VGVAPG, qui via sa fixation à un récepteur spécifique, stimule l'activation de MT-MMP et MMP-2, augmente ainsi le caractère invasif de certaines cellules endothéliales ou de certaines cellules cancéreuses [Brassart *et al.* 1998].

V. Implication des MMP dans la régulation des signaux cellulaires :

Les MMP ont virtuellement la capacité de cliver non seulement toutes les molécules structurales de la MEC, mais aussi certaines molécules circulantes, des protéines de la surface cellulaire ou péricellulaires, ce qui leur permet de moduler de façons variées le comportement cellulaire. Ces mécanismes incluent l'altération des interactions cellule-matrice et cellule-cellule, le relargage, l'activation ou l'inhibition de molécules signal autocrines ou paracrines, et l'activation ou l'inactivation potentielles des récepteurs cellulaires de surface (figure 22).

A. Remodelage de la matrice extracellulaire et devenir cellulaire :

La dégradation de la matrice extracellulaire peut être perçue comme une perturbation, un remodelage structural de la MEC, mais aussi comme un processus de dégradation permettant l'invasion cellulaire. La matrice extracellulaire ne doit pas être considérée comme un enchevêtrement passif de molécules, elle influence le devenir cellulaire en séquestrant des molécules signal comme les facteurs de croissance et leurs protéines de liaison et en agissant

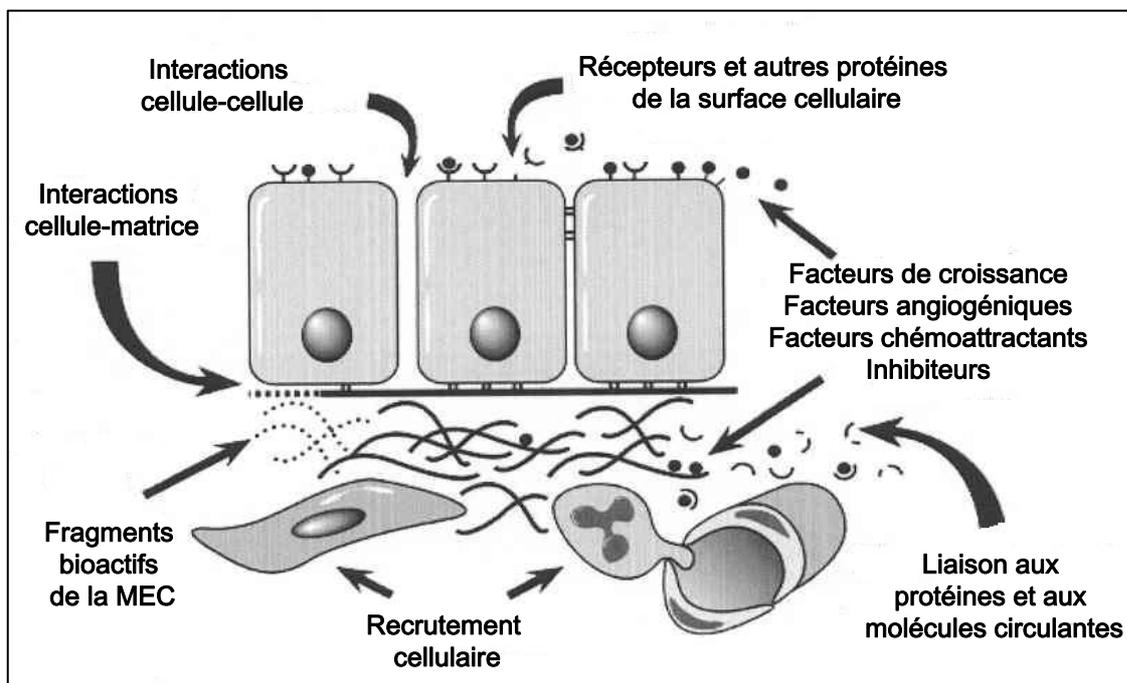


Figure 22 : Régulation des signaux cellulaires par les MMP.

D'après M. D. Sternlicht, and Z. Werb Annu. Rev. Cell. Dev. Biol., 2001, 17: p 463-516.

comme un ligand vis à vis de récepteurs cellulaires comme le font les intégrines qui transmettent le signal à l'intérieur même de la cellule [Streuli, Gilmore 1999]. En effet la MEC régule certains processus de base comme la forme des cellules, leurs mouvements, leur croissance, leur différenciation et leur survie en contrôlant l'adhésion cellulaire et la machinerie du cytosquelette [Lukashev, Werb 1998]. Par extension, les MMP influencent ces mêmes processus en modifiant la composition et l'organisation structurale de la MEC, ainsi qu'en altérant les signaux qui en proviennent. Qui plus est, le remodelage protéolytique de la MEC provoque la libération de produits de clivage modulaires biologiquement actifs. C'est le cas par exemple du clivage de la laminine 5 par la MMP-2, qui génère des fragments de chaîne $\gamma 2$ qui induisent la mobilité des cellules épithéliales [Giannelli *et al.* 1997; Koshikawa *et al.* 2000]. Les molécules matricielles peuvent aussi constituer un « réservoir » pour les MMP elles mêmes [Yu WH, Woessner 2000] mais aussi pour de nombreux facteurs de croissance et cytokines qui seront libérés lors de la dégradation des molécules matricielles. On peut citer l'exemple de l'IL-2 qui se lie aux collagènes de type I, III et VI [Somasundaram *et al.* 2000], mais aussi de la décorine associée au collagène qui agit comme un dépôt de TGF- β et dont la dégradation par de nombreuses MMP libère le TGF séquestré [Imai *et al.* 1997]. Le TGF- $\beta 1$, facteur de croissance connu pour influencer fortement l'homéostasie tissulaire [Feige *et al.* 1996], ainsi libéré pourra exercer ailleurs ses fonctions biologiques comme la stimulation de l'expression des protéines fibreuses de la MEC, ou l'inhibition de l'expression de certaines MMP soit directement pour les MMP-1 et -3 soit indirectement via la stimulation de l'expression de TIMP-1. La libération et l'activation du TGF- β médiées par les MMP peut aussi constituer un mécanisme de rétrocontrôle négatif limitant l'expression des MMP et la libération du TGF.

La plupart des cellules adhèrent à une matrice naturelle ou provisoire pour survivre. La rupture de la matrice subcellulaire médiée par les MMP peut induire l'apoptose chez les cellules dépendantes de l'ancrage et jouer ainsi un rôle important dans la mortalité cellulaire physiologique dans certains tissus comme les glandes mammaires involuants [Alexander *et al.* 1996] ou l'épithélium intestinal [Fouquet *et al.* 2004]. De plus la destruction de la matrice

péricellulaire peut agir de façon ambivalente dans les cas de cancer, positivement en élevant le taux de mortalité cellulaire, négativement en sélectionnant des sous-clones indépendants à l'ancrage et résistants à l'apoptose.

L'utilisation des modèles de souris génétiquement déficientes pour certaines MMP a été riche en enseignements concernant les fonctions biologiques des MMP intégrées à l'organisme entier. En effet, c'est ainsi qu'il a été montré que contrairement aux autres MMP, la MT1-MMP ne semble pas impliquée dans le développement embryonnaire alors que son absence se traduit par une altération du développement et de la croissance post natale du squelette et des tissus mous [Holmbeck *et al.* 2004].

B. Protéolyse de la surface cellulaire et signaux cellulaires :

Les MMP peuvent potentiellement influencer le devenir cellulaire par clivage des protéines d'adhésion cellules-cellules, en libérant de la surface cellulaire des molécules bioactives, ou en clivant des molécules de la surface cellulaire qui transmettent le signal de l'environnement extracellulaire. C'est le cas des MMP-3 et -7 qui clivent la E-cadhérine des jonctions adhérentes, le fragment extracellulaire soluble ainsi libéré désorganise l'agrégation cellulaire et promeut l'invasion cellulaire de façon paracrine, indépendante de l'événement de clivage en lui-même [Lochter *et al.* 1997; Noe *et al.* 2001].

Les MMP peuvent libérer des molécules à partir de la surface cellulaire. Dans les circonstances appropriées, MMP-2 et -9 localisées à la surface cellulaire peuvent activer le TGF- β latent [Yu Q., Stamenkovic 2000], tandis que d'autres MMP peuvent activer le proTNF- α soluble [Woessner JF, Nagase 2000].

En plus d'occasionner la libération et l'activation de cytokines et de facteurs de croissance, les MMP peuvent aussi cliver leurs récepteurs cellulaires de surface. C'est le cas de MMP-2 qui clive le récepteur de type I au FGF ou « fibroblast growth factor », libérant ainsi un fragment soluble du récepteur qui gardant sa capacité de liaison au FGF influence la biodisponibilité du FGF [Levi *et al.* 1996].

C. Régulation des signaux paracrins :

En plus de libérer et d'activer certains facteurs de croissance, les MMP peuvent réguler la disponibilité des signaux paracrins en les inactivant directement soit en inactivant leurs protéines solubles de liaisons. Les MMP peuvent inactiver les angiotensines I et II, la bradykinine et la substance P, limitant ainsi leurs effets biologiques respectifs [Woessner JF, Nagase].

Les MMP participent et assurent l'amplification du processus inflammatoire, mais elles peuvent aussi l'amoindrir. On peut citer l'exemple de MMP-2 qui en clivant la molécule MCP-3 ou « monocyte chemoattractant protein-3 », l'inactive et génère un antagoniste à son récepteur, contrariant en quelque sorte doublement l'inflammation [McQuibban *et al.* 2000]. Les MMP peuvent dégrader des cytokines pro-inflammatoires comme la forme β de l'IL-1, puissant inducteur de l'expression des MMP, mais pas la forme α [Ito *et al.* 1996].

D. Génération et inactivation de molécules bioactives :

En plus d'altérer l'activité et la disponibilité de cytokines, de facteurs de croissance et d'hormones, les MMP peuvent cliver d'autres protéines non matricielles, annihilant d'une part leurs fonctions biologiques normales et générant d'autres part des produits de dégradation possédant des activités biologiques propres et nouvelles. Les MMP peuvent cliver les serines protéases comme le plasminogène et l'u-PA ou « urokinase-type plasminogen activator », tout comme certains inhibiteurs de ces serines protéases comme l' α 1-inhibiteur de protéase ou α 1-PI [Sternlicht *et al.* 1999]. Ces clivages inactivent les protéases ou leurs inhibiteurs et créent simultanément des produits de dégradation bioactifs. MMP-2, -7, -9 et -12 peuvent cliver le plasminogène pour générer un inhibiteur de l'angiogenèse, l'angiostatine [Patterson, Sang 1997; O'Reilly *et al.* 1999].

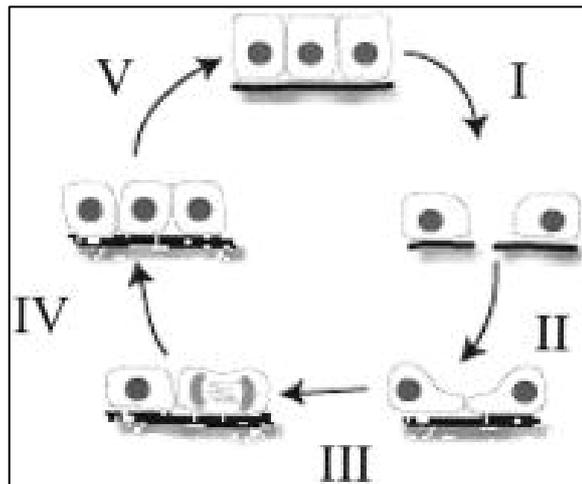


Figure 23a : Séquence évènementielle de lésion épithéliale et de restitution.

D'après J. M. V. Mammen in Crit Care Med, 2003, vol 31, n°8 suppl, p 532-537.

I : l'épithélium est lésé, les cellules se dépolarisent, II : les cellules épithéliales se différencient et s'aplatissent pour boucher la brèche, III : la brèche est colmatée et les cellules épithéliales se redifférencient et se repolarisent, il y a prolifération cellulaire, IV : les jonctions serrées sont réétablies, V : la monocouche est réparée et fonctionnelle.

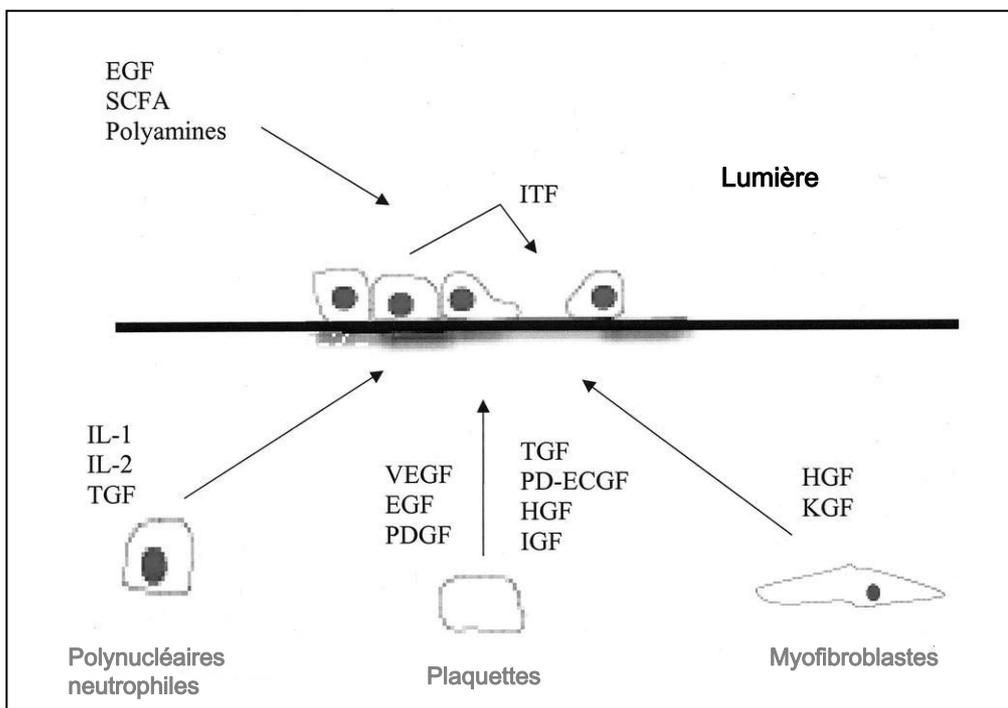


Figure 23b : de nombreux médiateurs sont impliqués dans la cicatrisation

D'après J. M. V. Mammen in Crit Care Med, 2003, vol 31, n°8 suppl, p 532-537.

E. Implication des MMP et des TIMP dans les processus de cicatrisation :

Quel que soit la localisation de l'épithélium considéré, le processus de cicatrisation requiert le recrutement des macrophages et des autres cellules inflammatoires, la résorption des débris nécrotiques par digestion protéolytique, la migration des cellules venant combler la brèche, la néosynthèse de matrice extracellulaire, l'angiogenèse et le remodelage tissulaire. La cicatrisation cutanée est certainement le processus de cicatrisation le plus étudié et le mieux documenté, néanmoins un certain nombre d'études portant sur le tractus digestif ont montré que ce dernier a la capacité de ré-établir rapidement la continuité de l'épithélium de surface après une destruction importante [Feil *et al.* 1987; Silen 1987; Lacy 1988; Waller *et al.* 1988].

La continuité épithéliale est ré-établie en deux phases selon un schéma proposé dans la figure 23a (revue dans [Mammen, Matthews 2003]). Dans un premier temps, les cellules épithéliales adjacentes à la zone lésée ou situées juste en dessous, migrent vers la lésion pour couvrir l'aire dénudée. Cette phase, observée *in vitro* et *in vivo* [Moore *et al.* 1989; Nusrat *et al.* 1992], nommée restitution épithéliale, a lieu dans les 15 minutes qui suivent la lésion inductrice [Takahashi *et al.* 1995; Wilson A. J., Gibson 1997] et ne requière pas de prolifération cellulaire. Les cellules qui bordent la zone lésée changent alors de forme et de phénotype, il y a désassemblage des jonctions qui les lient les unes aux autres et à la matrice, elles s'aplatissent et émettent des lamellipodia pour s'étendre le plus possible. Ces modifications morphologiques s'accompagnent d'une différenciation et de l'acquisition d'un phénotype migratoire [Basson 2001], qui est aussi décrit dans les transitions épithélio-mésenchymateuses. Les MMP interviennent alors dans la digestion contrôlée de la matrice extra cellulaire, elles permettent ainsi aux cellules de migrer vers la brèche à reconstituer. Dans les cellules épithéliales adjacentes au bord de la blessure, la mise en place dans les minutes qui suivent la lésion de fibres de stress et de points d'adhésion focaux avec la matrice permet de guider les cellules qui migrent le long de la lame basale [Jacinto *et al.* 2001]. La restitution est facilitée par la contraction des villosités médiée par les myofibroblastes de la zone lésée [Moore *et al.* 1989].

En effet ce processus réduit efficacement la surface de la zone lésée à réparer. Outre le rétablissement des contacts cellule-cellule, une autre étape est critique vis à vis de la restauration de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal, c'est la reformation des complexes jonctionnels liant les cellules épithéliales entre elles. Une fois les jonctions intercellulaires reformées, la repolarisation épithéliale et la redifférentiation effectuées, la prolifération épithéliale est stimulée afin de restaurer à la fois l'architecture et les capacités fonctionnelles de la muqueuse [Silen 1985]. Quand les lésions sont profondes, l'angiogénèse est initiée, les fibroblastes, myofibroblastes et cellules musculaires lisses participent à la cicatrisation en synthétisant à la fois des constituants matriciels (tissus de granulation) et des MMP. Le processus de cicatrisation est régulé par de nombreux facteurs peptidiques et non peptidiques, dont une liste non exhaustive est proposée dans la figure 23b. Ces facteurs dérivent de l'environnement luminal, ou sont produits par les cellules épithéliales ou par les autres types cellulaires composant la muqueuse. Les myofibroblastes situés sous la zone lésée secrètent entre autre du KGF et de l'HGF qui stimulent la migration et la prolifération cellulaire. Les cellules immunes et inflammatoires localisées dans la lamina propria et la sous muqueuse produisent aussi des facteurs de croissance et des cytokines qui affectent la cicatrisation de l'épithélium. Les macrophages et la plupart des cellules mononuclées de la lamina propria produisent des cytokines pro-inflammatoires de type IL-1, IL-2, TNF- α et du TGF- β . Les plaquettes participent au processus cicatriciel en relarguant des facteurs comme le VEGF, l'EGF mais aussi le TGF- β 1, le PDGF ou l'IGF. Les cellules épithéliales elles-même peuvent produire des facteurs qui vont amplifier la restitution, comme l'IL-8 [Cario *et al.* 1999; Wilson CL. *et al.* 1999]. L'IL-8 provoque le recrutement des PNN et leur activation ce qui se traduit entre autre par leur dégranulation. La MMP-9 libérée à partir des granules des PNN convertit l'isoforme 1-77 de l'IL-8 en isoforme 7-77 qui est au moins 10 fois plus efficace sur le recrutement cellulaire que l'isoforme 1-77 et pérennise ainsi très efficacement l'infiltration tissulaire par des cellules inflammatoires. Les cellules épithéliales, mais aussi les cellules inflammatoires mononuclées, peuvent aussi produire du TGF- β 1, qui stimule la restitution. Il est

intéressant de noter que des cellules traitées avec un anticorps neutralisant dirigé contre le TGF- β 1 ne peuvent migrer suite à une lésion mécanique. Cet anticorps bloque aussi les effets pro-migratoires du TGF- α , de l'EGF, de l'IL-1 β , de l'IL-2 et de l'IFN- γ [Dignass, Podolsky 1993] [Ciacci *et al.* 1993; Yanaka *et al.* 1996]. Il semble que l'IL-1 β et le TNF- α stimulent la restitution via la sécrétion d'HGF, qui promeut le désassemblage des jonctions inter-cellulaire épithéliales et la migration [Nusrat *et al.* 1994; Takahashi *et al.* 1995]. Le mucus produit par les cellules caliciformes assure une protection physique. En revanche, les ITF, produits aussi par les cellules à mucus, ont une action pro migratoire sur les cellules épithéliales.

La restauration de la continuité épithéliale requière des interactions dynamiques entre les cellules épithéliales et la matrice extracellulaire sous jacente. L'utilisation d'anticorps dirigés contre les constituants matriciels et les intégrines altère grandement le processus de réparation [Moore *et al.* 1992; Miller *et al.* 1994]. Dans la phase de prolifération cellulaire qui fait suite à la restitution, la composition de la MEC est un élément critique. En effet des travaux récents ont montré que la migration de cellules épithéliales coliques humaines en culture est plus rapide sur une matrice de collagène I que sur une membrane basale composée de collagène IV, laminine et fibronectine [Basson 2001]. Par ailleurs, d'autres travaux ont montré que l'utilisation d'Ac neutralisants dirigés contre le collagène IV ou la fibronectine, mais pas la laminine-1, inhibent la restitution *in vivo* [Moore *et al.* 1992].

Des facteurs non peptidiques sont aussi impliqués dans la régulation de la réparation de la muqueuse. Les polyamines, comme la spermine, la spermidine et la putrescine, sont des facteurs certes moins bien connus que les cytokines ou les facteurs de croissance, mais dont l'action est importante. Ils interagissent dans le processus de restitution épithéliale, via leur influence sur la constitution des fibres de stress ou sur les intégrines [Wang J., Robbins 1996]. Le butyrate et plus généralement les acides gras à chaîne courte, sont connus pour leur action positive sur la réparation épithéliale, même si leur mécanisme d'action est assez mal connu [Scheppach *et al.* 1996].

chronique s'installe et pérennise la prolifération fibroblastique et l'accumulation de matrice extracellulaire. Ce concept de boucle d'activation chronique est très important pour comprendre le fait que les fibroses sont des tissus en renouvellement constant et non pas des tissus figés ou morts comme ils l'ont été longtemps considérés.

Dans le foie, organe particulier ou le rôle joué par les MMP dans la cicatrisation a été bien étudié, le remodelage de la matrice extracellulaire est un pré-requis nécessaire à la prolifération des hépatocytes au cours de la régénération. L'utilisation d'un modèle d'hépatectomie partielle chez le rat a permis de mettre en évidence que l'expression des ProMMP-2 et -9 est extrêmement rapidement augmentée (30 minutes après hépatectomie) et qu'elles sont presque aussi vite activées (respectivement 6 à 12h et 3 à 6 h après hépatectomie). L'expression de TIMP-1 est augmentée 6 à 18h après hépatectomie, régulant ainsi les MMP-2 et MMP-9 actives. Dans un modèle de résolution spontanée d'une fibrose hépatique induite par le CCl₄, qui constitue un modèle particulier de cicatrisation, les auteurs de ces travaux ont montré que l'activité gélatinolytique et que l'expression des MMP-2 et -14 sont augmentées, participant à la destruction de la matrice surnuméraire [Watanabe *et al.* 2001].

En tenant compte du fait que de même types cellulaires peuvent, dans chaque tissu, réagir différemment aux cytokines et aux facteurs de croissance durant la séquence de cicatrisation, qu'il existe des différences, dans la composition des matrices interstitielles, des récepteurs de liaison à la matrice des cellules épithéliales, il ne semble pas étrange que la palette d'expression des MMP puisse varier quelque peu d'un organe à un autre. Ainsi la collagénase faciliterait la migration des kératinocytes dans une matrice dermique riche en collagène [Dumin *et al.* 2001] alors que la MMP-7 serait une protéase plus appropriée au clivage des composants de la MEC intestinale. [Saarialho-Kere U.K. *et al.* 1996a].

VI. Pathologies digestives impliquant les MMP et les TIMP

Il n'existe pas à proprement parlé de travaux portant sur l'expression physiologique normale des MMP et des TIMP dans le tractus digestif humain. Les données publiées à ce jour

Des études menées sur le processus de cicatrisation, en particulier dans la peau et dans le foie, ont montré le rôle joué par les MMP et les TIMP dans la réparation de ses tissus. Les données obtenues peuvent certainement, à quelques spécificités tissulaires près être transposées à l'intestin, ou leur implication dans le processus de cicatrisation normal est moins bien documenté. Quel que soit l'épithélium, la lésion de la MEC est un élément clef de l'adhésion cellulaire, de la migration, de la prolifération cellulaire et de la différenciation au cours de la cicatrisation. La qualité et l'organisation de la MEC cicatricielle normale sont déterminées par une balance dynamique qui s'exerce entre synthèse globale, dépôt et dégradation du matériel matriciel. Des études, utilisant un inhibiteur de MMP, ont mis en évidence chez des souris, un retard dans la cicatrisation due à un défaut de migration des kératinocytes [Lund *et al.* 1999]. Ce même défaut est retrouvé chez des souris invalidées pour le plasminogène. Ces animaux traités par un inhibiteur de MMP montrent une absence totale de migration des kératinocytes, suggérant d'une part l'action synergique de ces deux enzymes et d'autre part le rôle majeur joué par les MMP et le plasminogène, au cours du processus de cicatrisation [Romer *et al.* 1996]. Soo et collaborateurs ont quant à eux caractérisé les changements temporeux des profils des ARNm pour les MMP-1, -2, -7, -9 -14, TIMP-1 et -2 durant les phases inflammatoires, de granulation, et au cours des phases précoces de remodelage cutané après excision chez le rat [Soo *et al.* 2000]. Ce sont les ARNm codant pour les MMP-1 et -9 et TIMP-1 qui sont les plus rapidement augmentés (en moins de 12 h), ceux pour MMP-2 n'étant significativement augmentés qu'à J3 et ceux pour MMP-7 et MT1-MMP à J2, TIMP-2 n'étant pas significativement modulés. L'augmentation rapide de MMP-1, -9 et TIMP-1 coïncident temporellement avec les phases d'inflammation et de migration épithéliale/prolifération de la réparation. MMP-9 et TIMP-1 sont stockés et libérés « à la demande » par les PNN, alors que MMP-1 qui est néosynthétisée par les kératinocytes est requise pour leur migration. MMP-2 et MT1-MMP sont comparativement exprimées plus tardivement, concomitamment aux phases de granulation et de remodelage de la réparation.

Dans le cas de la cicatrisation normale, une boucle de régulation négative se met en place lorsque le tissu est reconstitué, alors que dans le cas des fibroses, une boucle d'activation

	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-12	TIMP-1	Cytokines
Maladie Coeliaque	↗		↗	↗	↗	↗	Il-1 β , TNF- α
Maladie de Crohn	↗	↗	↗	↗			Il-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8
Colite collagène	↘					↗	
Ulcères	↗	↗	↗	↗			

Tableau 7 : Synthèse des MMP, TIMP et cytokines impliquées dans les pathologies digestives non tumorales.

concernent le plus souvent leur expression génique et/ou protéique ou encore leur activité dans des tissus prélevés sur des patients présentant certaines pathologies ou dans des modèles animaux recréant ces mêmes pathologies ou encore dans des modèles de culture cellulaire. Cependant un intérêt particulier doit être porté aux études du groupe de Seifert sur l'expression des gélatinases dans les anastomoses iléales et coliques qui ont montré par zymographie, que l'on retrouve dans l'intestin normal uniquement des activités proMMP-2 et MMP-2 [Seifert WF. *et al.* 1996; Seifert W. F. *et al.* 1997], données confirmées par Baugh [Baugh *et al.* 1999]. Les travaux menés par le groupe de Saarialho-Kere ont quant à eux montré l'absence dans l'intestin normal des ARNm et des protéines correspondant à MMP-1, -3, -7, -9, ainsi que de TIMP-1 [Saarialho-Kere U.K. *et al.* 1996a].

La majorité des travaux réalisés sur les MMP et les TIMP dans le tractus digestif, porte sur les maladies inflammatoires intestinales, les ulcères ou les cancers, le tableau 7 récapitule l'expression des différentes MMP et TIMP impliqués dans ces pathologies .

A. Affections digestives non tumorales :

Les maladies inflammatoires intestinales ou MICI ou IBD pour « inflammatory bowel disease » sont des maladies inflammatoires chroniques qui affectent en premier lieu le tractus gastro-intestinal et dont l'étiologie et la pathogenèse restent à ce jour encore mal connues (revue dans [Podolsky 2002]). Elles regroupent la maladie cœliaque (CD), la maladie de Crohn, les colites ulcérales ou non (UC) et on peut y adjoindre les ulcères pathologiques et expérimentaux.

La maladie cœliaque ou CD est définie comme une entéropathie sensible au gluten, dont le siège principal est l'intestin mais qui peut avoir des manifestations dermatologiques (dermatite herpétiforme). Depuis quelques années, de nouvelles méthodes de détection des anticorps anti-gliadine et des auto anticorps dirigés contre la transglutaminase tissulaire, ont permis le dépistage des formes silencieuses de la maladie et amené cette dernière du rang de pathologie rare au rang de problème de santé publique (prévalence chez l'adulte = 1/2000 en Europe, et 1/380 pour la forme silencieuse dans le nord de la France). La maladie cœliaque est

histologiquement caractérisée au niveau dermatologique par une éruption d'ampoules sur les coudes, les genoux et les fesses et par un dépôt granulaire d'IgA à la membrane basale et au niveau intestinal par une augmentation de la profondeur des cryptes et un raccourcissement des villosités, l'infiltration de la muqueuse par des lymphocytes T activés, des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, l'augmentation des lymphocytes intraépithéliaux ou LIE, chez des sujets génétiquement prédisposés. Sa pathogénèse est mal connue, cependant il est admis que l'atrophie villositaire caractéristique de la maladie est secondaire à l'activation des lymphocytes T du chorion de la muqueuse intestinale par des peptides toxiques de la gliadine (protéine dérivée du blé, de l'orge, du seigle et de l'avoine) présentés par les molécules HLA qui confèrent le risque génétique de la maladie. Le lymphocyte T aurait un rôle central dans l'immuno-pathogénie intestinale de cette maladie [Daum *et al.* 1999] en répondant au gluten alors que les LIE ne répondraient pas directement au gluten mais s'activeraient en réponse à des modifications de l'épithélium induites par la réaction inflammatoire et / ou favorisée par le terrain génétique [Schmitz, Cerf-Bensussan 2003]. Avec un régime normal, l'expression des ARNm codant pour MMP-1, MMP-3 et TIMP-1 et le nombre de cellules positives pour les protéines correspondantes, sont élevés alors que soumis à un régime sans gluten MMP-1 et MMP-3 sont normalement exprimées, seul TIMP-1 reste élevé. La muqueuse des patients non traités montre une modification de la balance MMP/TIMP en faveur de la dégradation de la matrice extracellulaire, médiée par les myofibroblastes activés par des cytokines proinflammatoires et par les macrophages infiltrés. Elle pourrait être l'un des mécanismes importants conduisant à la transformation de la muqueuse dans la maladie cœliaque [Daum *et al.* 1999]. Des études complémentaires ont par ailleurs montré la surexpression, dans les formes cutanées et intestinales de la maladie, des MMP-9 et -12, cette dernière qui est majoritairement exprimée par les macrophages [Salmela *et al.* 2001] peut l'être à la suite de leur stimulation par des cytokines comme l'IL-1 β ou le TNF- α [Mauviel 1993; Przemioslo *et al.* 1994] ou être le résultat de leur contact direct avec les lymphocytes T activés par le gluten. En contraste avec les IBD, aucune cellule positive pour la MMP-7, -10 ou -13 n'a été mise en évidence dans des biopsies intestinales ou cutanées de patients présentant la maladie. Cette

spécificité de la maladie permet d'espérer que l'utilisation de futurs inhibiteurs spécifiques de la MMP-12 et/ou du TNF- α pourrait soulager les symptômes cutanés et intestinaux de la maladie.

La maladie de Crohn, dont la prévalence est de 1/1000 habitants dans les pays occidentaux, est caractérisée par une inflammation transmurale chronique, évoluant vers une fibrose et la formation de fistules, dont la complication la plus sévère est l'occlusion. Les traitements chirurgicaux mis en place jusqu'alors se sont avérés insatisfaisants, avec formation de « strictures » récurrentes. Ces strictures ne sont pas observées dans les autres MICI et sont exclusivement localisées au niveau des muqueuses coliques et rectales. La maladie de Crohn, dont l'étiologie exacte reste inconnue à ce jour, résulte d'une hyperactivation du système immunitaire muqueux de l'intestin sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux. De nombreux arguments épidémiologiques, cliniques et expérimentaux suggèrent l'intervention d'agents microbiens dans l'initiation et/ou la persistance des lésions [Desreumaux, Colombel 2003]. L'implication des MMP a aussi été mise en évidence dans la pathogénèse de cette maladie. Les collagénases attaquent la triple hélice des collagènes I, II et III en un site unique et débloquent la molécule ce qui la rend alors susceptible à l'attaque protéolytique menée par les gélatinases qui en plus vont dégrader les collagènes IV et V [Lauer-Fields *et al.* 2000]. Une augmentation du nombre des cellules inflammatoires de type PNN contenant de la MMP-9, et la localisation de la MMP-3 extracellulaire dans les régions fibrotiques et de dégradation de la muqueuse, montrent le rôle joué par ces enzymes dans les modifications pathologiques observées [Bailey *et al.* 1994]. Des travaux ont mis en évidence le lien existant entre la présence et l'activité des MMP-1, -2, -3 et -9 et le statut pathologique des biopsies analysées. Ils montrent une augmentation forte de l'abondance et de l'activité des MMP dans les zones inflammées de biopsies de patients présentant une colite ulcéreuse par rapport aux zones non inflammées des mêmes biopsies, qui elles-mêmes montrent une activité supérieure à celle mesurée sur des biopsies contrôles. De toutes les MMP, la MMP-9 des polynucléaires neutrophiles semble être ici la MMP exprimée de façon prédominante dans l'intestin inflammé [Baugh *et al.* 1999]. Ces résultats sont confirmés par d'autres observations qui mettent en évidence une très forte activité MMP-9 dans la *lamina propria* de biopsies de patients atteints

d'une colite active par rapport à des contrôles sains, activité co-localisée dans les aires du tissu conjonctif infiltrées de polynucléaires neutrophiles [Perry *et al.* 1999]. Les cellules mononuclées de la lamina propria de patients présentant une IBD produisent des taux élevés de TNF- α , IL-6 et IL-1 β . Une corrélation positive a été établie entre les concentrations tissulaires en TNF- α et en IL-1 β et l'inflammation de la muqueuse de ces patients. Par ailleurs il a été montré que l'IL-6 était plus abondamment exprimée dans la muqueuse des patients présentant une UC par rapport à ceux souffrant de la maladie de Crohn. En effet dans la colite ulcéreuse, cette cytokine est détectée même en absence de signes microscopiques d'inflammation ce qui met en évidence des différences dans les mécanismes impliqués dans l'initiation de l'inflammation entre l'UC et le Crohn [Reinecker *et al.* 1993]. Les cellules inflammatoires ne semblent pas être les seuls types cellulaires impliqués dans cet « emballement cytokinique », en effet, les cellules musculaires lisses issues de biopsies de patients présentant un Crohn produisent spontanément de l'IL-8 via NF- κ B, suite semble t'il à l'altération de leur balance redox [Natarajan *et al.* 2001]. Dans la maladie de Crohn, l'iléon peut être le siège de lésions précoces et chroniques dans lesquelles la concentration tissulaire locale en IL-8 est augmentée. Dans le cas des lésions précoces, elle provient des PNN, alors que dans les lésions chroniques la source d'IL-8 est pluricellulaire, ce sont les lymphocytes CD3+ de la lamina propria, les LIE, les macrophages et les PNN qui en sont l'origine. La nature de l'infiltrat inflammatoire et le profil d'expression des cytokines diffèrent au cours des différentes phases de la maladie de Crohn entre les phases aiguës et chroniques. Les PNN, lymphocytes T et macrophages, responsables de la production d'IL-8 dans les lésions chroniques, pourraient contribuer selon un mécanisme auto et paracrin, l'augmentation et à la pérennisation de l'attraction des cellules inflammatoires intestinales [Brandt *et al.* 2000]. De nouveaux traitements tenant compte des dernières avancées sur la connaissance de telles pathologies sont à l'essai, c'est le cas de ceux employant des fluoroquinolones de dernière génération. Le traitement de biopsies de patients souffrant de la maladie de Crohn par de l'oflaxine montre une diminution dose dépendante de la production de MMP-3, IL-1 β , IL-6 et TNF- α [Louis, Belaiche 2000].

Une approche globale récente, rendue possible par la mise en œuvre de techniques de type macro array, a permis d'avoir une vue d'ensemble et intégrée du remodelage matriciel. Cette technique, appliquée avec succès aux pathologies inflammatoires intestinales et aux fibroses a définitivement établi que le renouvellement de la MEC aux cours des processus pathologiques précédemment cités, implique la coopération des gènes codant pour les composants matriciels, les protéases et leurs antagonistes tissulaires [von Lampe *et al.* 2000]. Dans un modèle expérimental impliquant les lymphocytes T dans la pathogenèse de lésions intestinales, la sur expression des MMP-1 -3 et -9 et la répression de TIMP-1 a été mise en évidence, tandis que dans la muqueuse inflammée de patients souffrant d'IBD une sur expression concomitante des MMP-1, -2, -3, -14 et de TIMP-1 était montrée [Salmela *et al.* 2002].

En dehors des MICI, l'expression des MMP a été étudiée dans d'autres maladies intestinales comme la colite collagène ou CC. Cette maladie d'étiologie inconnue, est caractérisée par une diarrhée aqueuse en absence de tout résultat radiologique ou endoscopique. Histologiquement, elle est caractérisée par un dépôt matriciel linéaire de collagènes I, III, IV, de fibronectine, très riche en tenascine mais totalement dépourvu d'induline, d'une épaisseur supérieure à 10µm et localisé juste sous la surface de l'épithélium. Ce dépôt de matrice interstitielle est immature et susceptible d'être rapidement dégradé. Les éléments pouvant conduire à la formation de la bande collagénique subépithéliale restent mystérieux même si certains auteurs favorisent une combinaison de mécanismes auto-immuns et inflammatoires dans la cause de la CC. La tunique épithéliale est aplatie et atrophiée et peut être infiltrée par des lymphocytes. L'expression de la MMP-1 est diminuée alors que celle de TIMP-1 est concomitamment augmentée dans des biopsies de patients souffrant d'une colite collagène, ceci pouvant expliquer un défaut local de la fibrinolyse et l'accumulation de collagène [Günther *et al.* 1999].

De nombreux travaux impliquent les MMP dans la formation d'ulcères tant au niveau gastrique qu'au niveau intestinal. Des travaux récents montrent que la formation d'ulcères gastriques induits à l'acide acétique chez le rat s'accompagne de l'augmentation des activités

de la collagénase et de la gélatinase B, qui reviennent graduellement normales au cours de la cicatrisation [Baragi *et al.* 1997]. Une corrélation positive entre l'expression de la collagénase, de la gélatinase B et le dommage tissulaire est observée. La gélatinase A quant à elle reste constante. L'expression différentielle de ces enzymes est intéressante considérant le fait que les promoteurs des collagénases [Angel *et al.* 1987] et de la gélatinase B [Okada Y. *et al.* 1990] [Huhtala *et al.* 1990], rappelons-le, contiennent un site de liaison AP1, alors que le promoteur de la gélatinase A ne le possède pas ainsi que d'autres éléments connus pour être régulés par des agonistes variés comme les cytokines et les facteurs de croissance qui sont impliqués dans l'inflammation et les dommages tissulaires [Fini M.E., Girard 1990; Huhtala *et al.* 1990; Harendza *et al.* 1995]]. La gélatinase B, en coordination avec la collagénase, pourrait agir en supprimant le matériel matriciel endommagé, au cours de la phase précoce de la formation de l'ulcère, préparant ainsi la zone endommagée pour le processus de réparation [Baragi *et al.* 1997].

De façon similaire une augmentation de l'expression des MMP a été décrite dans les ulcérations cutanées et intestinales. Des techniques immunohistologiques et d'hybridation *in situ* ont montré que l'expression des ARNm de MMP-1 dans les myofibroblastes des épithéliums lésés et de MMP-3 dans le tissu granuleux et de MMP-7 en bordure d'ulcère, est fortement augmentée [Saarialho-Kere U. K. *et al.* 1996b]. La MMP-7 est produite lorsque la barrière épithéliale est rompue, mettant ainsi en évidence son implication dans la réparation de l'épithélium au cours de la cicatrisation. Sa capacité à cliver l'entactine, la fibronectine et le collagène IV, lui permet de remodeler la membrane basale et l'associe à la migration des cellules épithéliales tandis que les MMP-1 et -3 sont quant à elles impliquées dans le processus de réparation stromal. Une augmentation de l'expression de MMP-12 dans les macrophages et de MMP-13 dans les polynucléaires neutrophiles, macrophages et myofibroblastes a été parallèlement décrite [Vaalamo *et al.* 1998].

Par ailleurs, lors de la formation d'ulcères générée par l'administration d'un inhibiteur de synthèse des prostaglandines comme l'indométhacine, on peut détecter dès 24 h après l'exposition, de la proMMP-9 dans les macrophages muqueux bordant l'ulcère. Durant la phase

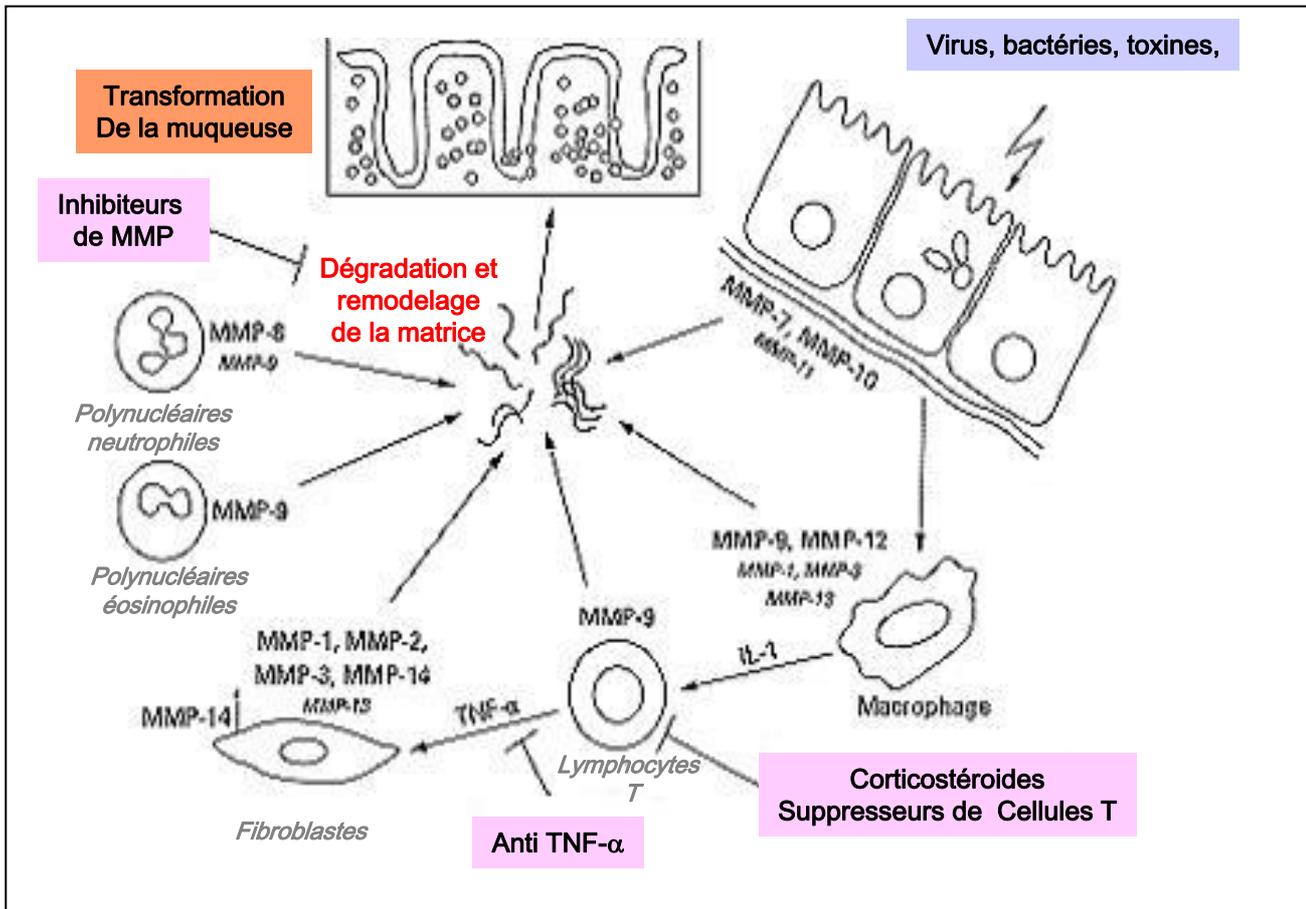


Figure 24 : Schéma proposé par Schuppan pour la régulation immunitaire de l'intégrité de la muqueuse dans les pathologies du tractus gastro-intestinal (2000), GUT 47, p 12-14.

de formation de l'ulcère, l'activité des formes latentes et actives de la MMP-2 provenant des myofibroblastes, augmente puis diminue pendant la phase de cicatrisation. La MMP-2 augmente peu en réalité par rapport à la MMP-9, cependant elle pourrait exercer une sorte de surveillance dans le maintien de l'homéostasie collagénique tissulaire et prendre part au remodelage du tissu cicatriciel [Lempinen *et al.* 2000].

Thomas T. Mac Donald et Sylvia L. F. Pender ont été les premiers à émettre une hypothèse sur la régulation immunitaire de l'intégrité de la muqueuse dans les pathologies du tractus gastro-intestinal (figure 24). Leurs travaux novateurs ont établi des liens entre les observations concernant les modifications des taux de MMP et les acteurs cellulaires retrouvés dans les biopsies analysées. Leur hypothèse met en avant le rôle joué par les cellules T dans la modification de l'expression des MMP, dans la physiopathologie de l'IBD. Celle-ci s'appuie sur leurs travaux et les observations effectuées entre autres par Bailey et Saarialho-Kere [Bailey *et al.* 1994; Saarialho-Kere U. K. *et al.* 1996b]. Ces observations mettaient en évidence une augmentation de la MMP-9, localisée dans les polynucléaires infiltrés dans les biopsies de colite ulcéreuse ou de Crohn, de la MMP-3 dans les cellules mononucléées infiltrées dans les biopsies montrant une pathologie digestive et de MMP-3 extracellulaire dans les zones lésées, ainsi qu'une augmentation de TIMP-1 dans le lit d'ulcères. Cette augmentation de la production de MMP-3 dans la muqueuse dans le cadre de la maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse en phase active a aussi été montrée par d'autres auteurs [Louis *et al.* 2000] qui l'ont corrélée à la concentration élevée en IL-6 et TNF- α . Par ailleurs, d'autres études ont montré que l'accumulation des cellules T dans la muqueuse inflammée de patients présentant une IBD, est associée à une augmentation de leur capacité à adhérer et à interagir avec les fibroblastes coliques de ces zones, et jouent certainement un rôle dans la physiopathologie de l'IBD [McVay *et al.* 1997]. Pender et Mac Donald ont montré que les cellules mésenchymateuses isolées de la muqueuse d'intestin grêle fœtal produisent des taux élevés de MMP-1, MMP-2 et MMP-3 lorsqu'elles sont stimulées par de l'IL-1 β ou du TNF- α . Ces résultats suggèrent que l'activation des cellules T dans la *lamina propria* engendre une augmentation de la production des MMP précitées, qui vont dégrader la matrice extracellulaire. Il semble que cela soit majoritairement

par cette voie que les cellules T exercent leur pouvoir délétère sur le tractus gastro-intestinal [Pender *et al.* 1997]. Pour confirmer cette hypothèse concernant les cellules T, les auteurs ont utilisé des cellules T de la *lamina propria* activées par la lectine PWM (PokeWeede Mitogen) sur leur modèle d'explants d'intestin grêle fœtal, et ont montré non seulement une augmentation de la synthèse et de la sécrétion de MMP, mais aussi une forte synthèse et sécrétion de TNF- α soluble, dans le surnageant des explants. L'utilisation d'une protéine de fusion IgG-p55TNFR diminue considérablement la production de MMP dans les conditions précédemment utilisées. Il semble donc que le TNF- α provenant des cellules T cause des lésions du tractus gastro-intestinal en stimulant la production et la sécrétion de MMP par les myofibroblastes [MacDonald T. T. *et al.* 1999] [Breese *et al.* 1994; Pender *et al.* 1997; Pender *et al.* 1998b], éléments cellulaires clef de la physiopathologie du tractus gastro-intestinal [Pender *et al.* 1998b; MacDonald T. T. *et al.* 1999]. La surface des myofibroblastes de la *lamina propria* localisés à proximité d'ulcères dans les cas d'IBD, est très riche en intégrine $\alpha 4\beta 1$, dont la liaison via VCAM-1 confère un phénotype migratoire à ces cellules, en entraînant la surexpression de MT1-MMP et la production de gélatinase A activée. Ce mécanisme, contrairement aux cytokines, ne module pas l'expression d'autres MMP que les MMP-2 et -14. Il est sans nul doute de première importance dans le processus de cicatrisation et met en avant le rôle fondamental joué par les MMP membranaires dans les processus de migration-cicatrisation [Pender *et al.* 2000b] [Quaranta 2000]. Des travaux portant sur la colite ulcéreuse ont mis en évidence que toute inflammation augmente localement, la concentration en cytokines et l'afflux de macrophages. Il en résulte l'augmentation de la production de KGF et de MMP par les myofibroblastes [Saarialho-Kere U. K. *et al.* 1996b; Bajaj-Elliott *et al.* 1997]. Des expérimentations concernant l'IL-10 étayent de précédents travaux sur le rôle joué par les cellules T dans la physiopathologie du tractus gastro-intestinal. Il a été mis en évidence que cette cytokine en diminuant l'activation des cellules T, diminue la production de MMP par les cellules mésenchymateuses et la perte de la matrice extracellulaire due à la solubilisation des protéoglycanes de la *lamina propria* [Pender *et al.* 1996; Pender *et al.* 1998a]. Des travaux

complémentaires portant sur des lésions duodénales et cutanées étayant elles aussi les travaux précité mettant en lumière l'association surexpression de la metalloelastase et réponse immune médiée par les lymphocytes T [Salmela *et al.* 2001].

Les travaux réalisés sur le fonctionnement biochimique des MMP, comme ceux plus cliniques révélant le rôle clef joué par ces enzymes et de leurs antagonistes tissulaires dans de nombreuses pathologies, ont mis en lumière, outre le rôle des différents acteurs cellulaires et des cytokines pro inflammatoires, un nouvel acteur moléculaire qui semble avoir une importance prépondérante dans la synthèse des MMP. Une étude récente montre le rôle joué par NF- κ B dans les complications fibrotiques tardives des IBD impliquant les MMP, les TFG- β et le TNF- α . Dans cette étude, l'administration prophylactique versus thérapeutique d'oligonucléotides anti sens de la sous unité p65 de NF- κ B, à des souris traitées au TNBS, met en évidence, que les fibroses tardives rencontrées entre autre dans les MICI sont conséquentielles à l'inflammation chronique générée dans ces pathologies et qu'elles peuvent être contrôlées via NF- κ B [Lawrance *et al.* 2003].

En résumé, les collagénases « nettoient » le tissu lésé [Baragi *et al.* 1997], les stromélysines sont responsables de l'ulcération précoce de la muqueuse alors que les gélatinases sont responsables du remodelage muqueux au cours du processus cicatriciel [MacDonald T.T., Pender 1998].

B. Affections tumorales digestives :

Les phénomènes d'invasion tumorale locale, de dissémination métastatique et de néovascularisation accompagnant l'extension tumorale nécessitent un remodelage de la MEC et de la lame basale par les MMP. Dans l'épithélium normal, l'expression des MMP est faible, la source étant les fibroblastes-myofibroblastes et les cellules inflammatoires. En revanche il existe une surexpression des MMP dans les tumeurs digestives [Zeng *et al.* 1995; Arii *et al.* 1996] qui le plus souvent sont sous leur forme activée. L'origine de ces MMP est source de débat mais un consensus semble établi sur une origine majoritairement stromale qui présuppose une coopération entre cellules tumorales et stromales dont les mécanismes sont

encore assez mal connus à ce jour [McKerrow *et al.* 2000]. Un début d'explication pourrait être fourni par l'étude des adénocarcinomes coliques dans lesquels l'ARNm codant pour la MMP-2 est exprimé par les cellules stromales fibroblastiques et dans le tissu conjonctif à distance de la tumeur alors que la protéine est immunolocalisée dans les cellules néoplasiques. La présence de la protéine dans les cellules tumorales pourrait s'expliquer par une potentielle liaison de la proMMP-2 d'origine fibroblastique à la MT1-MMP ancrée à la membrane des cellules tumorales [Newell *et al.* 1994; Okada A. *et al.* 1995]. Ce mécanisme a été aussi observé *in vitro* dans un modèle de coculture associant des cellules cancéreuses coliques (CaCo-2) et des myofibroblastes coliques (CCD-18Co). La MMP-2 était sécrétée par les CCD-18Co et activée par les CaCo-2 sans contact entre les deux lignées cellulaires mais via la MT1-MMP présente à la surface des cellules cancéreuses [Ko *et al.* 2000]. La présence de ces MMP dans les tumeurs ou à l'interface stroma-tumeur suggèrent assez bien le rôle important joué par ces enzymes dans le processus néoplasique, en aidant les cellules tumorales à s'insinuer dans le tissu adjacent puis à rompre la barrière vasculaire pour ensuite disséminer. On peut citer l'exemple de MMP-7 qui est ainsi impliquée dans la progression tumorale des cancers colorectaux [Yoshimoto *et al.* 1993; Mori *et al.* 1994], des MMP-3 et -14 qui seraient responsables de l'agressivité des tumeurs oesophagiennes [Etoh *et al.* 2000]. Une étude va plus loin et suggère que la tumeur primitive est capable d'induire à distance la synthèse de MMP qui feraient ainsi « le lit » des métastases. En effet MMP-2 et TIMP-2 sont surexprimés dans le foie de malades atteints de tumeur digestives sans métastases hépatiques alors qu'ils ne le sont pas dans le foie de malades présentant des métastases hépatiques et dont la tumeur primitive a été retirée [Theret *et al.* 1997]. A la coopération cellulaire cellules mésenchymateuses-cellules tumorales peuvent être adjointes les cellules inflammatoires et en particuliers les monocytes/macrophages. En effet une étude a mis en évidence que le lipopolysaccharide induit outre l'activation des monocytes, l'expression de MT1-MMP dans ces cellules, influant ainsi sur l'activation de la MMP-2 produite par d'autres cellules [Shankaravam *et al.* 2001].

La surexpression des TIMP dans le stroma peritumoral, bien qu'elle puisse paraître paradoxale à été décrite, dans l'estomac l'intensité de l'expression de TIMP-1 est corrélée avec le stade de la tumeur et la survie du patient, ce qui confère à cet antagoniste un caractère prédictif concernant l'agressivité des cancers gastriques [Joo *et al.* 2000]. TIMP-2 est dix fois plus exprimé par des cellules de mélanome faiblement invasives que par des cellules fortement invasives. Sachant que dans ces cellules TIMP-2 régule l'activation de la proMMP-2 via MT1-MMP, mais inhibe MMP-2 à forte concentration, on comprend que l'invasivité de ces cellules est inhibée par TIMP-2 [Kurschat *et al.* 1999]. Des corrélations positives significatives, de mauvais pronostic, ont été établies entre l'expression de MMP et d'indicateurs variés. C'est le cas de H-ras dont la surexpression est corrélée à celle de MMP-9 [Giambernardi *et al.* 1998]. Dans les cancers coliques la diminution de l'expression du collagène IV, conjointe à l'augmentation de celle de la MMP-9, forment un élément dont l'intensité est inversement proportionnelle au pronostic de survie [Seya *et al.* 2000], dans les tumeurs de l'œsophage l'intensité d'expression des MMP-3 et -13 est un élément pronostic de l'évolution de ces carcinomes [Etoh *et al.* 2000]. Les MMP des cellules stromales adjacentes aux cellules cancéreuses sont induites et commandées par ces dernières.

Même s'il semble que cela soit les cellules stromales qui synthétisent les MMP nécessaires aux tumeurs pour assurer leur dissémination, un certain nombre de lignées tumorales gastriques, pancréatiques et coliques surexpriment des MMP et notamment les MMP-2, -7 et -9 [Okada A. *et al.* 1995; Witty *et al.* 1996].

En plus des données liant la surexpression des MMP et des TIMP à l'agressivité et au mauvais pronostic clinique [Davidson *et al.* 1999], des données fortes montrent que les MMP contribuent activement à la progression tumorale [Dalberg *et al.* 2000]. Des cellules relativement bénignes acquièrent des propriétés malignes quand l'activité des MMP augmente ou quand celle des TIMP diminue. Certaines MMP comme la -1, la -2, la -3, la -9 et la -14, sont des agonistes clef impliqués dans l'invasion tumorale, la dissémination métastatique et l'angiogenèse [Kleiner, Stetler-Stevenson 1999; Miyagawa, Kawasaki 2000] [Chang, Werb 2001].

C. MMP et réponse à l'infection intestinale :

Une augmentation significative de l'expression et de l'activité des MMP a été rapportée dans la réponse de l'organisme aux agents infectieux. C'est le cas de la matrilysine, dont l'expression est fortement augmentée dans les cellules de Paneth, après exposition à des bactéries [Lopez-Bodao *et al.* 2000]. Cette MMP ne possède aucune activité antimicrobienne propre, mais active intracellulairement des propeptides cationiques antimicrobiens que sont les pro α -défensines ou procryptidines [Wilson CL. *et al.* 1999], qui sont spécifiquement synthétisés par les cellules de Paneth de l'intestin grêle. Ces cryptidines sont de par leur fonctions antimicrobiennes à activité Gram-, Gram+ [Harwig *et al.* 1995] mais aussi anti parasitaire [Aley *et al.* 1994], des éléments clef de l'immunité innée. En effet, suite à une surproduction de flore commensale, à l'invasion par des micro-organismes pathogènes, ou à la simple présence de LPS dans la lumière cryptique, les cellules de Paneth vont produire et sécréter dans des granules cytoplasmiques libérés dans la lumière cryptique, des défensines et du lysozyme, pour protéger l'intestin [Ouellette *et al.* 1989; Eisenhauer *et al.* 1992], cette sécrétion étant régulée par le système nerveux parasympathique [Qu *et al.* 1996].

VII. MMP-TIMP et irradiation :

L'étude des données de la littérature montre que les radiations ionisantes peuvent altérer, qualitativement et quantitativement, l'expression de certains gènes associés à la matrice extracellulaire, tant au niveau de sa production que de sa dégradation. L'expression des MMP et des TIMP dans les heures et les jours suivant une irradiation est mal connue, par rapport aux autres pathologies digestives, la majorité des travaux publiés à ce jour se penche sur l'implication potentielle de ces enzymes dans les effets tardifs de l'irradiation, et en particulier au cours de radiothérapies dans la pathogénèse des fibroses radioinduites.

Les radiothérapies préopératoires sont couramment utilisées en Europe pour permettre une réduction de volume tumoral préalable à l'exérèse chirurgicale. Ces radiothérapies sont globalement de deux types : 45 Gy en fractions de 2 Gy / jours et intervention chirurgicale six

semaines après la dernière fraction ou 25 Gy en 5 fractions et chirurgie 4 jours après la dernière fraction. L'utilisation de ce type de protocole (irradiation à des doses supérieures ou égales à 25 Gy) a montré une diminution significative des récurrences locales par rapport à la chirurgie seule [Marsh 1994; Anonymous 1997]. Ces résultats optimistes ne doivent cependant pas occulter le fait que des études ont montré que l'irradiation à la capacité d'induire des MMP dans différentes lignées cellulaires. Des travaux réalisés par le groupe de Mohanam ont montré que l'irradiation X de cellules endothéliales les empêchent de former des capillaires en culture et provoque une augmentation de la sécrétion des formes actives de MMP-2 et MMP-9 qui s'accompagne d'une augmentation des taux de l'ARNm et de la protéine TIMP-1 [Nirmala *et al.* 2000]. Dans le même groupe Sawaya et ses collaborateurs ont montré que l'irradiation d'astrocytes augmente d'un facteur quatre la concentration intracellulaire en t-PA 12 heures après l'exposition et d'un facteur six de la concentration en gélatinase de 72 kDa 48 heures après irradiation [Sawaya *et al.* 1994]. Pour de nombreux auteurs, cette radioinduction de MMP pourrait être responsable des récurrences locales observées dans les protocoles d'irradiations pelviennes préopératoires (11%). Siefert et collaborateurs ont étudié les activités gélatinolytiques et caséinolytiques dans des anastomoses coliques en cours de cicatrisation, après irradiation à 25 Gy. Leur étude montre une augmentation marquée des activités gélatinolytiques et caséinolytiques, qui se prolongent dans le temps, ce qui pourrait pour les auteurs, contribuer à réduire ou à retarder l'accumulation de collagène et d'autres constituants de la matrice extracellulaire, et suggèrent une présence prolongée des cellules poly et mononuclées infiltrées dans le tissu granuleux de l'intestin irradié [Seifert W. F. *et al.* 1997]. Les travaux de Kumar et collaborateurs montrent, dans le cadre des radiothérapies préopératoires (25 Gy en 5 fractions et 5 jours) de cancers du rectum précédemment décrites, une augmentation d'un facteur 6-7 de l'expression des ARN messagers codant pour la matrilysine dans le tissu cancéreux alors que ces messagers ne sont pas modulés dans la muqueuse normale [Kumar *et al.* 2002]. Des résultats semblables avaient été obtenus pour la MMP-2 et de la MMP-9 [Kumar *et al.* 2000] [Kumar *et al.* 1999]. Les travaux de Richter, ont quant à eux montré dans le même cadre thérapeutique, que l'irradiation diminue l'immunoréactivité d'u-PA

et de TGF- β [Richter *et al.* 1996]. Les études précitées ne s'intéressaient qu'au caractère pro-cancereux de la surexpression des MMP et assez peu aux acteurs moléculaires de type cytokines pouvant être impliqués, or les résultats d'une étude montrent que les cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α et l'IL-1 β , libérées après irradiation jouent certainement un rôle clef dans la régulation de la synthèse des MMP et TIMP, Cuvelier et collaborateurs ont montré qu'elles augmentent la synthèse des gélatinases de 72 et 92 kDa par les fibroblastes [Cuvelier *et al.* 1997]. Dans le cadre de l'irradiation, l'attention doit aussi être portée sur les conséquences matricielles, tissulaires, de la modulation de l'expression des MMP et des TIMP. C'est dans ce cadre qu'ont été menés les travaux de N. Hovdenack, qui a montré qu'au cours des radiothérapies pelviennes, la forte augmentation de sécrétion des MMP-2 et MMP-9 dans la muqueuse rectale des patients, 2 et 6 semaines après le début du traitement, était corrélée aux diarrhées radioinduites et à l'infiltration granulocytaire, suggérant que cet ensemble est sans doute un élément clef de la pathogénèse rectale postradique [Hovdenak *et al.* 2000b; Hovdenak *et al.* 2002]. Les travaux menés par Araya mettent quant à eux en avant le rôle joué après irradiation, par la MMP-2 produite par les cellules épithéliales pulmonaires, dans la fibrose pulmonaire [Araya *et al.* 2001]. Ils montrent par ailleurs que MMP-2 est radioinduite via p53, comme cela a aussi été montré par Wang dans d'autres types cellulaires [Wang J. L. *et al.* 2000a].

Malgré ces travaux, l'implication des MMP et des TIMP dans la pathogénèse des effets aigus d'une irradiation sur le tractus digestif est encore assez mal caractérisée, il en est de même vis à vis des effets tardifs et en particulier de l'accumulation des constituants matriciels. Le dépôt de matrice extracellulaire observé dans les fibroses post radiques peut être du à un défaut du remodelage matriciel, un déséquilibre de la balance qui existe physiologiquement entre synthèse et dégradation [Zhao *et al.* 2000]. Sur ce sujet, il existe actuellement une controverse. Le groupe de M Martin proposait dans un modèle de fibroblastes porcins issus de biopsies de fibrose cutanée radio-induite, un défaut de dégradation des constituants de la MEC due d'une part à la suppression radio-induite de l'expression de MMP-1 et d'autre part à l'augmentation de l'expression des TIMP [Lafuma *et al.* 1994]. Le groupe de M Robbins

propose un défaut de dégradation par altération du système plasmine/plasminogène/PAI dans les fibroses rénales qui conduirait à l'accumulation de composant matriciel [Zhao *et al.* 2000]. Zhao et collaborateurs ont déterminé la réponse de cellules épithéliales tubulaires et mésengiales à l'irradiation. Ils ont montré que l'irradiation augmente, dans leur modèle, la sécrétion de la forme active de MMP-2, moins de 24H après une irradiation de 10 Gy γ , et par opposition, l'absence de modification vis à vis de MMP-9 et de u-PA [Zhao *et al.* 1999; Zhao *et al.* 2000]. Il semble que cette sur-expression radio-induite soit spécifique de MMP-2, l'innaffection du taux de MMP-9 étant dû à un système de contrôle de l'expression génique différent [Fabumni *et al.* 1996]. En revanche, des études menées par le groupe de M Hauer-Jensen [Denham *et al.* 2001] ont montrés une production et une activité accrue des MMP dans les fibroses intestinales radio-induites.

Des travaux suggèrent que la balance entre synthèse matricielle et dégradation ne résultent pas simplement d'une production matricielle excessive ou d'une augmentation de la dégradation protéolytique des composants de la matrice extracellulaire [Stetler-stevenson 1996]. En effet, une augmentation du contenu en collagène et de l'activité MMP a été observée dans une cardiopathie idiopathique humaine [Gunja-Smith *et al.* 1996].

Des études fondamentales ont montré que les ROS sont des seconds messagers responsables de l'induction de MMP-1 via AP-1 [Wenk *et al.* 1999]. Les travaux précédemment cités mettaient en évidence une modulation de l'expression génique, protéique et enzymatique des MMP après exposition à des radiations ionisantes. Des résultats similaires ont été obtenus avec des radiations non ionisantes de type UV. En effet l'exposition de fibroblastes à des UVA induit l'augmentation de l'expression des génique et protéique de MMP-1, -2 et -3 mais pas celle de TIMP-1. Pour les auteurs cette synthèse pourrait contribuer au vieillissement cutané photo-induit [Hermann *et al.* 1993]. L'exposition de fibroblastes dermiques à des UVB, induit la synthèse de MMP-1 et MMP-3, via la protéine kinase p70 S6 [Brenneisen *et al.* 2000]. L'exposition de la peau à de tels rayonnements provoque l'accumulation de cellules mono et polynucléées et une surproduction des cytokines TNF- α et IL-8 qui sont impliquées dans la réponse inflammatoire radio-induite [Strickland *et al.* 1997].

Dans la plupart des travaux présentés, l'irradiation induit classiquement une augmentation génique et/ou protéique des MMP. Les travaux menés par Gu ont mis en évidence que l'irradiation diminue l'expression de la MMP-1 par les fibroblastes et les cellules endothéliales de la peau, cette diminution affectant la migration cellulaire, l'angiogenèse, le remodelage tissulaire, contribuant ainsi au retard de cicatrisation observé dans les premiers jours suivant la lésion. Plus tardivement l'augmentation de sécrétion de MMP-1 est responsable de la « surdégradation » matricielle observée, qui est à l'origine de la difficulté à former un tissu de granulation [Gu *et al.* 2002].

VIII. Stratégie expérimentale :

Les MMP semblant être des enzymes clefs dans de nombreux processus de cicatrisation physiologiques ou non, nous avons donc choisi de mettre en place une stratégie expérimentale nous permettant d'étudier l'implication des MMP et de leurs antagonistes tissulaires dans la cicatrisation post-radique précoce et tardive.

Pour évaluer cette participation nous avons dans un premier temps analysé les activités gélatinolytiques présentes dans l'intestin grêle et le côlon distal de rat, à des temps précoces c'est à dire compris entre 1 et 7 jours après une irradiation X abdominale de 10 Gy, par zymographie. Nous avons ensuite localisé au niveau tissulaire la présence des protéines par immunohistochimie et analysé leur expression génique par Macro Array et RT-PCR quantitative. L'expression génique ou protéique d'acteurs moléculaires impliqués dans la modulation de l'expression ou de l'activité des MMP et des TIMP, comme les cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-8, TGF- β , mais aussi le plasminogène, l'u-PA, le t-PA et PAI-1, a été mesurée. Les protagonistes cellulaires comme les lymphocytes T cytotoxiques et les polynucléaires neutrophiles ont été recherchés. Nous nous sommes attachés à rechercher si l'irradiation, entraîne l'expression préférentielle de certaines MMP plutôt que d'autres, si le profil d'expression radio-induit observé diffère de celui constaté dans les maladies inflammatoires

intestinales et quels sont les types cellulaires impliqués dans la sécrétion de ces enzymes et de leurs antagonistes tissulaires.

Les phénomènes tardifs ont été ensuite abordés chez des patients ayant subi une radiothérapie pelvienne. Nous nous sommes attachés à l'étude de l'implication des MMP et des TIMP dans la fibrose post-radique observée chez ces patients présentant des effets secondaires délétères.

Partie II : Travail expérimental

Préambule technique :

Choix du modèle animal : étant donné que le modèle rat est couramment utilisé dans les thématiques de physiologie digestive, que les effets de rayonnements ionisants sont connus sur cette espèce, que l'irradiation, les prélèvements d'échantillons et leurs traitements sont maîtrisés au laboratoire, nous avons choisi d'utiliser des rats mâles de souche Wistar.

Choix des sites tissulaires : au vu des spécificités anatomiques et fonctionnelles du colon distal et de l'iléon, mais aussi de l'implication de ces deux segments dans la pathogénèse radioinduite, qu'elle soit aiguë ou tardive, nous avons choisi d'étudier l'implication des MMP et des TIMP dans le remodelage post radique dans ces deux segments intestinaux.

Choix de la dose d'irradiation : Trois doses ont été testées : 8, 10 et 12 Gy. 12 Gy est une dose létale qui ne permet pas l'étude de temps supérieurs à 4 jours, 10 Gy est une dose sublétale qui provoque une atteinte intestinale qui se traduit par une perte de poids, une diminution de la prise alimentaire et des diarrhées, mais aussi un fort remaniement tissulaire. La dose de 8 Gy n'entraîne pas de diarrhées et ne provoque qu'un remaniement tissulaire modéré. Au vu de ces différents paramètres nous avons choisi la dose de 10 Gy.

Choix des temps : nous avons choisi d'étudier l'impact de l'irradiation 1, 3, et 7 jours après l'exposition. J1 est un temps considéré comme précoce, J3 correspond au temps où les lésions tissulaires sont les plus intenses et J7 au pic cicatriciel tissulaire, observés après une irradiation abdominale X de 10 Gy.

I. Analyse de l'expression génique différentielle iléale après irradiation, par la technique du Macro Array :

1. Objectif de l'approche :

Cette approche permet d'avoir une vue d'ensemble des modulations d'expressions géniques après irradiation. Comparativement aux approches classiques qui permettent d'examiner le profil d'expression de gène d'intérêt unique, l'utilisation des membranes de macro array permet l'analyse simultanée de l'expression de plusieurs centaines de gènes entre deux groupes expérimentaux. La caractérisation du profil transcriptionnel pourrait permettre une avancée significative dans la compréhension des voies moléculaires impliquées dans le remodelage post radique, le profil d'expression génique différentiel pouvant révéler ainsi l'implication de facteurs environnementaux ou génétiques impliqués dans la cicatrisation après irradiation.

L'utilisation d'une telle approche chez le rat, a permis l'analyse simultanée de 1186 gènes, mais s'avère moins fructueuse que celle que nous avons pu faire chez l'homme (voir article III). En effet le développement des membranes rat est moins spécialisé que celui des membranes humaines qui sont déclinées par groupe de gènes d'intérêt : oncologie, toxicologie, hématologie-immunologie, interactions cellulaires Et sur 1186 gènes seul un petit nombre présentait un intérêt direct dans le cadre du remodelage. Cependant l'utilisation d'une telle technique nous a permis d'explorer concomitamment plusieurs pistes et de cibler par la suite précisément les acteurs moléculaires clefs de la cicatrisation post radique.

2. Limite de la technique :

Le principal écueil de la technique est que les résultats, obtenus sur des tissus présentant de multiples types cellulaires, peuvent être dilués. En effet pour être détectable, un gène doit être exprimé par un grand nombre de cellules au sein du tissu ou être induit très

fortement dans un plus petit nombre ou encore réprimé fortement, pour être rendu visible par rapport à l'ensemble. Par ailleurs, comme toutes les techniques qui renseignent plus ou moins quantitativement sur l'expression génique, cette technique ne renseigne que sur l'expression des ARNm ce qui n'augure en rien de leur traduction.

3. Méthodologie :

Les membranes (80 x 120 mm) Atlas rat 1.2 (PT3564-3, Clontech, Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) présentent des doubles dépôts de 10 ± 2 ng de cDNA spécifiques de 1176 gènes, espacés de 2,25 mm. Elles ont été hybridées avec 20 μ g d'un mélange d'ARN messagers marqués au ^{33}P , provenant à parts égales de 6 animaux d'un même groupe, à savoir : les témoins J1, les irradiés J1, les témoins J3, les irradiés J3, les témoins J7 et les irradiés J7. Les membranes ainsi hybridées ont été exposées sur un écran intensificateur de phosphorimager pendant une période de 7 à 10 jours. Les niveaux d'expression des ARNm ont été analysés via la détection des spots imprimés sur les écrans grâce à l'utilisation d'un phosphorimager FLA-3000 (Fuji film photo, Kanagawa, Japan). Le signal est normalisé par rapport à des gènes de ménage. L'analyse différentielle des niveaux d'expression génique a été réalisée grâce au logiciel Atlas Image 1.5 software (Clontech).

La préparation des ARNm des membranes est présentée dans le paragraphe « matériels et méthodes » des articles I, II et III.

Ont été considérés comme :

- exprimés les gènes dont la valeur de l'expression est \geq valeur du bruit de fond + 50%
- induits les gènes dont l'expression passe de 0 chez les témoins à une valeur \geq valeur du bruit de fond + 50% chez les irradiés,
- éteints des gènes dont l'expression passe d'une valeur \geq valeur du bruit de fond + 50% chez les témoins à 0 chez les irradiés,
- sur-exprimés des gènes dont l'expression est au moins deux fois supérieure chez les irradiés à celle des témoins,

- réprimés des gènes dont l'expression chez les irradiés est au moins deux fois inférieure à celle rencontrée chez les témoins.

Les trois membranes témoins ont ensuite, parce qu'elles présentaient des résultats homogènes, été combinées en une membrane témoin globale, à laquelle ont été comparées les membranes des irradiés.

4. Résultats

Les résultats sont exprimés en unités arbitraires. Le bruit de fond des membranes est de 20. Chez les animaux témoins 378 gènes sont détectés. 24 h après irradiation, 389 gènes sont détectés, par rapport à la membrane témoin 17 gènes sont éteints, 2 gènes sont induits et 202 gènes sont considérés comme modulés (94 sont réprimés et 108 surexprimés). 3 jours après exposition, 401 gènes sont détectés, par rapport à la membrane témoin 33 gènes sont éteints, 21 gènes sont induits et 154 gènes sont considérés comme modulés (90 sont réprimés et 64 surexprimés). 7 jours après irradiation, par rapport à la membrane témoin 13 gènes sont éteints, 5 gènes sont induits et 89 gènes sont considérés comme modulés (61 sont réprimés et 28 surexprimés).

Les résultats concernant un échantillon choisi de gènes d'intérêt sont présentés dans le tableau ci-après :

Gènes d'intérêt	J0	J1	J3	J7
FAS	398	74	41	49
apo A1	881	540	432	576
apo AIV	179	41	97	82
IFABP	3223	1700	382	3824
LFABP	1936	1064	121	1893
MMP-2	12	81	236	103
MMP-3	18	20	5	0
MMP-7	22	49	121	7
MMP-14	15	17	16	16
t-PA	2	13	128	2
TIMP-1	41	72	382	82
TIMP-2	50	128	454	124

La répression spectaculaire de l'expression des ARNm de la fatty acid synthase témoigne de la diminution globale de l'activité métabolique de l'intestin grêle après irradiation.

L'apo A_I est synthétisée dans l'intestin par les entérocytes [Wu, Windmueller 1979]. La diminution du signal après irradiation est en relation avec la perte de ces cellules et la diminution de leur activité métabolique (résultats en accord avec ceux de C. Feurgard, thèse d'université 1998, Paris VI).

L'apo A_{IV} dont la synthèse est induite par les lipides alimentaires [Kalogeris *et al.* 1994], est spécifiquement produite par les entérocytes. Apo A_{IV} est un index de différenciation entérocytaire. La diminution de l'expression de ses ARNm est en accord avec la diminution de la prise alimentaire observée après l'irradiation (J1-J3) et la présence d'entérocytes moins différenciés que chez les animaux témoins (J7).

IFABP (Intestinal Fatty Acid Binding Protein) et LFABP (Liver Fatty Acid Binding Protein) sont des gènes qui codent pour des petites protéines de transport intra cellulaire des acides gras [Besnard *et al.* 2002]. La modulation de leur expression après irradiation témoigne à la fois de la présence entérocytaire et de la fonctionnalité de ces cellules. En effet dès J1 on peut noter une très forte diminution de l'expression des ARNm codant pour IFABP et LFABP, qui s'accroît encore à J3, tandis qu'à J7 l'expression de ces ARNm est équivalente à celle détectée chez les animaux témoins.

L'irradiation augmente significativement l'expression des ARNm codant pour MMP-2, MMP-7 et t-PA à J1 et J3, et de TIMP-1 et TIMP-2 de J1 à J7.

5. Conclusion :

Les résultats de ce travail préliminaire montrent que les temps choisis que sont J1, J3 et J7, sont des temps clefs témoignant de la lésion (J1-J3) et de la régénération tissulaire (J7). Cette étude confirme l'intérêt d'étudier la modulation de l'expression génique et protéique radio-induites des gènes codant pour les MMP, les TIMP et les acteurs associés que sont les gènes du système plasminogène/plasmine, au cours de la cicatrisation post radique.

II. Article I : MMPs and TIMPs expression increased in rat ileum after X-ray irradiation despite disappearance of CD8a T cells

C. STRUP-PERROT, MC. VOZENIN-BROTONS, M. VANDAMME, C. LINARD,
D. MATHE

Soumis électroniquement le 24/09/04 à "World Journal of Gastroenterology".

L'expression des MMP et des TIMP est augmentée dans l'iléon après une irradiation abdominale X malgré la disparition des lymphocytes T CD8a+.

1. But de ce travail :

Les rayonnements ionisants induisent des lésions tissulaires du tractus digestif, suivies d'une cicatrisation dans laquelle les MMP, les TIMP et les lymphocytes T sont probablement des facteurs clefs, nous avons étudié leur activité et leur expression dans l'iléon de rat un, trois et sept jours après une irradiation abdominale X de 10 Gy.

2. Méthodologie :

Les activités gélatinolytiques ont été mises en évidence par zymographie, et semi quantitativement estimées par densitométrie. La mise en œuvre de techniques immunohistochimiques nous a permis de mettre en évidence au niveau tissulaire les MMP et les TIMP d'intérêt, ainsi que les polynucléaires neutrophiles (myéloperoxydase) et les lymphocytes T cytotoxiques (CD8a). L'expression génique des MMP et des TIMP, des protagonistes du système plasminogène-plasmine ainsi que de facteurs inflammatoires (IL-1 β , TNF- α et IL-8) et fibrogéniques (TGF- β), a été

mesurée par RT-PCR quantitative en temps réel. La concentration tissulaire en cytokines pro-inflammatoires a été quantifiée par immuno-dosage.

3. Résultats :

L'exposition à une irradiation abdominale X de 10 Gy induit une profonde altération de la muqueuse trois jours après l'exposition qui semble être cicatrisée sept jours après l'irradiation. L'irradiation augmente l'expression et l'activité de la gélatinase A qui est exprimée par les cellules mésenchymateuses, inflammatoires et épithéliales. L'expression de la gélatinase B n'est pas modulée tandis que l'expression génique et protéique de la MMP-14 est augmentée après irradiation. L'exposition ne semble pas avoir d'effet sur l'expression protéique et l'immunolocalisation des MMP-1 et -7, alors qu'elle induit transitoirement l'expression de la MMP-3 dans de rares macrophages 24h après l'exposition. Cette dernière entraîne la disparition des lymphocytes T CD8a+ dès 24 h après irradiation, qui persiste encore à J7. L'irradiation entraîne une augmentation précoce des taux tissulaires d' IL-1 β et de TNF- α , ainsi qu'une discrète infiltration neutrophilique et une augmentation des ARNm codant pour l'IL-8 ainsi que pour les différentes isoformes du TGF- β . Les protagonistes du système plasminogène-plasmine sont modulés par l'irradiation qui induit une augmentation de l'expression des ARNm codant pour U-PA, t-PA concomitamment à l'augmentation de l'expression génique des inhibiteurs du remodelage que sont TIMP-1, TIMP-2 et PAI-1 .

4. Conclusion

Cette étude montre que l'irradiation induit un remodelage intense de l'iléon, associé à l'augmentation de l'expression des MMP et des TIMP, qui se distingue des pathologies inflammatoires intestinales par la disparition des lymphocytes T CD8a+ et la non participation des MMP-1, -3 et -9.

Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor metalloproteinases increases in X-irradiated rat ileum despite the disappearance of CD8a T cells

Carine Strup-Perrot, Marie-Catherine Vozenin-Brotons, Marie Vandamme, Christine Linard, Denis Mathé

Carine Strup-Perrot, Marie-Catherine Vozenin-Brotons, Marie Vandamme, Christine Linard, Laboratoire d'étude des pathologies Radio-induites, SRBE/DRPH, Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, Fontenay-aux-Roses 92262, France

Marie-Catherine Vozenin-Brotons, Denis Mathé, Laboratoire UPRES EA 27-10 'Radiosensibilité des tumeurs et tissus sains', Institut Gustave Roussy/Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, Villejuif Cedex 94805, France

Correspondence to: Carine Strup-Perrot, Laboratoire d'étude des pathologies Radio-induites, SRBE/DRPH, Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, Fontenay-aux-Roses 92262, France. carine.strup@irsn.fr

Telephone: +33-1-58357760

Received: 2004-10-12 Accepted: 2004-12-23

activator; TIMP-1, TIMP-2, and plasminogen activator-inhibitor-1) were found to be increased after abdominal irradiation.

CONCLUSION: This study showed that abdominal irradiation induces an acute remodeling of the ileum associated with an increased expression of MMPs and TIMPs that do not involve CD8+ T cells but involve mesenchymal and epithelial cells, although to a lesser extent, and probably even soluble inflammatory and fibrogenic mediators.

© 2005 The WJG Press and Elsevier Inc. All rights reserved.

Key words: Matrix metalloproteinases; Irradiation; Ileum; T cells; Cytokines

Strup-Perrot C, Vozenin-Brotons MC, Vandamme M, Linard C, Mathé D. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor metalloproteinases increases in X-irradiated rat ileum despite the disappearance of CD8a T cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11(40): 6312-6321

<http://www.wjgnet.com/1007-9327/11/6312.asp>

Abstract

AIM: To investigate their expression and activity in the rat ileum after exposure to ionizing radiation along with that of the cellular effectors and molecular mediators involved in the regulation of MMPs.

METHODS: Rats were exposed to a single 10-Gy dose of X-rays delivered to the abdomen. A combination of methods, such as zymography, immunohistochemistry and real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction, were used to localize and quantify MMPs and the molecules involved in MMP activating and inhibitory pathways (plasmin/plasminogen, TIMPs), CD8+, as well as inflammatory (interleukin (IL)-1 β , IL-8, tumor necrosis factor- α , TNF- α) and fibrogenic mediators (transforming growth factor- β 1-3) within ileal tissue at 1, 3, and 7 d after irradiation.

RESULTS: A marked increase in MMP-2 and -14 mRNA and protein levels associated with an increased activity of MMP-2 was observed in irradiated ileal tissue. MMP-2 and -14 expression was mainly observed in inflammatory, epithelial, and mesenchymal cells, whereas a slight increase in MMP-3 expression was detected in the few infiltrating macrophages at d 1 after irradiation. Conversely, MMP-1, -7, and -9 mRNA levels were not found to be affected by abdominal irradiation. Irradiation was found to induce disappearance of CD8+ cells. Furthermore, we observed that TNF- α and IL-1 β protein levels increased 6 h after irradiation, whereas those of IL-8 only increased after 3 d and was concomitant with neutrophil infiltration. In addition, the expressions of molecules involved in MMP activating and inhibitory pathways (urokinase-type plasminogen activator and tissue-type plasminogen

INTRODUCTION

Acute intestinal toxicity may occur in response to therapeutic or accidental exposure to ionizing radiation. At the histopathological level, it is characterized by a decrease in the depth of the intestinal crypts and the height of the villi. It is associated with basement membrane degradation, and ultimately leads to mucosal barrier breakdown and ulceration. Classical radiation-induced toxicity symptoms include diarrhea, malabsorption, and protein losing enteropathy^[1]. Depending on the delivered dose of radiation, a restoration phase involving desquamation and re-epithelialization may occur. This requires extracellular matrix (ECM) remodeling, a process in which proteases and especially matrix metalloproteinases (MMPs) play an essential role^[2], and which is associated with overexpression of inflammatory and fibrogenic cytokines, such as interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and transforming growth factor- β (TGF- β)^[3,4].

Cell adhesion, migration, proliferation, and differentiation are required for complete wound healing and rely on interactions between cells and the ECM. Normal wound-ECM interactions are therefore essential to wound healing. The rate, quality/effectiveness, and organization of this process are determined

by a dynamic balance between overall matrix synthesis, deposition, and degradation. Disruption of this balance likely induces abnormal matrix degradation or accumulation. MMPs are a large family of zinc-dependent matrix degrading enzymes, involved in the fine tuning of ECM homeostasis. MMPs are classified, based on their substrate specificity and structural features, into six categories: gelatinases (MMP-2 and -9), stromelysins (MMP-3, -10, and -11), elastases (MMP-12), collagenases (MMP-1, -8, -13, and -18), matrilysins (MMP-7 and -26) and membrane-type MMPs (MMP-14, -15, -16, and -17)^[2]. The primary regulatory mechanism of MMP activity occurs at the transcriptional level and consists of a variety of extracellular signals involving cytokines, growth factors, and cell–matrix interactions^[5,6]. MMPs are then secreted as zymogens, which require prior proteolytic activation. *In vivo* activation of pro-MMPs is mainly mediated through the plasminogen–plasmin system, but MMPs themselves may also be involved. The third level of regulation is ensured by physiological inhibitors of MMPs, which include tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). Four subtypes of TIMPs (TIMP 1-4) have been identified so far^[7]. TIMP-1 inhibits several MMPs, while TIMP-2 seems to specifically inhibit MMP-2.

Overexpression of MMPs has been known to occur in both physiological and pathological conditions and to involve tissue restoration and/or destruction. Many studies reported that alteration of ECM remodeling and MMP/TIMP expression occur in inflammatory bowel diseases^[8-12]. Furthermore, some studies showed that T cells play a central role in the activation of MMPs in inflammatory bowel diseases^[13,14]. However, few studies have examined the role of MMPs in radiation-induced gastrointestinal disorders. After intraoperative irradiation, Seifert *et al.*^[15], observed a prolonged gelatinolytic activity in rat colonic anastomoses. Two clinical studies conducted in patients reported controversial data. Hovdenak *et al.*^[16], observed increased MMP-2 and MMP-9 expression after irradiation, while Kumar *et al.*^[17], did not. In this study, we aimed at confirming that observations made on gelatinases also applied to other types of MMPs. We investigated expression of MMPs after abdominal X-irradiation and their activating and inhibitory systems (i.e., plasminogen/plasmin and TIMP-1 and -2). We simultaneously investigated the stimulatory signals and focused on the expression of pro-inflammatory (TNF- α , IL-1 β) and fibrogenic cytokines (TGF- β) in the ileum after irradiation. Finally, we investigated the involvement of CD8a+T cells in MMP activation after irradiation. The results presented in this study show that irradiation induces a moderate inflammatory state, a significantly increased expression of MMP-2, MMP-14, TIMP-1, and TIMP-2, and the disappearance of CD8a+T cells.

MATERIALS AND METHODS

Animals and irradiation conditions

Experiments were performed using male Wistar rats (Janvier, Le Genest Saint Isle, France), weighing initially between 225 and 250 g. Prior to irradiation, rats were anesthetized by groups of six with 2.5% isoflurane, administered at a rate of 0.4 L/min (Abbott, Rungis, France). A protective lead screen (5 mm thick) was placed over each animal to cover them from the top of the head to 1 cm below the ribs. The

given dose was 10 Gy at a rate of 0.62 Gy/min (Phillips, 250 MeV, 0.2-mm Cu filter). Sham-irradiated rats were placed within the apparatus and anesthetized, but were not exposed to X-rays. Animals were weighed and food intake was measured 10 d before exposure to radiation and daily during the week following irradiation. All experiments were conducted according to the French regulations on animal experimentation (Ministry of Agriculture, Act No. 87-848, October 19, 1987).

Tissue collection

One, three, and seven days after irradiation, rats were anesthetized with 2.5% isoflurane and the terminal ileum was removed before euthanasia (sodium pentobarbitone, 100 mg/kg, ip; Sanofi, La Ballastière, France) and rinsed with sterile physiological saline. The ileum was cut into three equal pieces immediately after resection: tissue samples were formalin-fixed for histology, frozen in liquid nitrogen, and crushed into powder for RNA and protein extraction.

Histology

Samples were fixed in 40 g/L formaldehyde (Carlo Erba, Rueil Malmaison, France) for 3 d at room temperature. They were then dehydrated, paraffin-embedded, and cut into 4- μ m-thick sections. Slides were stained with hematoxylin, eosin, and saffron for histological analysis.

Immunostaining

MMP and TIMP antibodies were purchased from Chemicon (Euromedex, Mundolshiem, France) and used as follows: anti-MMP-1 (41-1E5, 1:15 000), anti-MMP-2 (42-5D11, 1:200), anti-MMP-3 (SL-1 IIC4, 1:200), anti-MMP-7 (ID-2, 1:300), anti-MMP-14 (113-5B7, 1:500), anti-TIMP-1 (102B1, 1:50), and anti-TIMP-2 (67-4H11, 1:1 000). The anti-myeloperoxidase antibody was from Novocastra (Tébu, Le Perray en Yvelines, France; NCL MYELOp, 1:300) and the anti-CD8a antibody was from Cedarlane (Tébu; CL004AP, 1:600).

Following deparaffinization and rehydration, endogenous peroxidase activity was inhibited with 30 mL/L hydrogen peroxide in PBS. In order to detect MMP-3, MMP-7, and CD8a epitopes, sections were placed in 0.01 mol/L hot citrate buffer (pH 6.0). The protein block serum-free blocking solution (Dako, Trappes, France) was used to inhibit non-specific staining. Primary antibodies were diluted in antibody diluent (Dako). Antibodies against MMP-1, MMP-2, and TIMP-1 were detected using the LSAB2-HRP system (Dako), whereas antibodies against CD8a, MMP-3, MMP-7, MMP-14, and TIMP-2 were detected using the StrepABC-HRP system (Dako) for myeloperoxidase. Immunostaining was performed using the Vector NovaRED substrate kit for peroxidase (Biovalley, Conches, France, for Vector Laboratories, USA). Sections were counterstained with differentiated Mayer's hemalum (Merck for VWR, Fontenay-sous-bois, France). Slides were rinsed between each stage with Tris HCl-NaCl-Tween (50 mmol/L, 0.3 mol/L, 1 g/L). Control staining, without the primary antibody and using an irrelevant mouse IgG, was performed concomitantly with each immunostaining to ensure staining specificity. A semiquantitative analysis of MMP-2, MMP-3, MMP-14, TIMP-1, and TIMP-2 expression was performed. Mean

staining intensity scores, which reflected staining intensity in the epithelium, lamina propria, submucosa, blood vessels, and muscularis propria, were attributed. The following scoring system was used: no staining (-); weak staining intensity (+); moderate staining intensity (++); strong staining intensity (+++); and very strong staining intensity (++++).

Gelatin zymography

Crushed tissue samples were homogenized in 50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl₂, 10 g/L Triton X-100, and protease inhibitors (Sigma-reverse Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Protein concentration was determined using the Lowry method.

Zymography was performed as previously described^[18]. Briefly, samples (4 µg protein) and MMP-2/9 standards (CC073 Chemicon, Euromedex, Mundolsheim, France) were separated by electrophoresis on 80 g/L SDS-polyacrylamide gels copolymerized with 1 g/L gelatin (Type A from porcine skin; Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Gels were washed in 25 g/L Triton X-100, incubated in a buffer containing 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8), 5 mmol/L CaCl₂·2H₂O, 50 mmol/L NaCl, 0.1 g/L Brij 35, and 0.2 g/L NaN₃ at 37 °C, stained with 5 g/L Coomassie blue in 250 mL/L isopropanol/100 mL/L acetic acid, and destained in a 100 mL/L methanol/100 mL/L acetic acid solution. Gelatinolytic bands appeared as clear zones against the blue background. Gelatinases were identified by their molecular weight and after inhibition using 20 mmol/L EDTA or 1 mmol/L *o*-phenanthroline. Densitometric analyses were performed using an imaging workstation (Biocom, Les Ulis, France) interfaced with the Phoretix image analysis software (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK).

RNA extraction and quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from crushed tissue samples by homogenization in 4 mol/L guanidine isothiocyanate, purified using the method of Chomczynski and Sacchi and quantified by spectrophotometry (A_{260}/A_{280}). RNA was treated with RNase-free DNase (0.5 U/µL) to remove contaminating genomic DNA. RNA integrity was assessed by denaturing agarose-gel electrophoresis and staining with ethidium bromide.

Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to quantify the levels of MMP-2, -9, -14, TIMP-1, -2, plasminogen, urokinase-type plasminogen activator (u-PA), tissue-type plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator-inhibitor-1 (PAI-1), IL-8, TGF-β1, TGF-β2, and TGF-β3 RNA transcripts as previously described^[19]. Primers were generated with the Primer Express software (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and purchased from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France): MMP-2 5'-ACCGTCGCCCATCATCAA-3' (forward), 5'-CCITCAGCACAAAGAGGTTGC-3' (reverse); MMP-9 5'-TGTCAGACCAAGGGTACAGC-3' (forward), 5'-GAAGAATGATCTAAGCCCAGCG-3' (reverse); MMP-14 5'-GAGGGTCATGAGAAGCAGGC-3' (forward), 5'-TCAAAGGGTGTGCTGTCGC-3' (reverse); TIMP-1 5'-AGAAGGGCTACCAGAGCGATC-3' (forward), 5'-ATCGAGACCCCAAGGTATTGC-3' (reverse); TIMP-2

5'-CTACATCTCCTCCCCGGATGA-3' (forward), 5'-GGTGCCCATIGATGCTCTTC-3' (reverse); plasminogen 5'-CTGAGTATCTAAACAACAGAGTCAAATCC-3' (forward), 5'-TCGAAGCAAACCAGAGGTCC-3' (reverse); PAI-1 5'-ATGGCTCAGAACAACAAGTTCAAC-3' (forward), 5'-CAGTTCCAGGATGTCGTAAGTCCG-3' (reverse); t-PA 5'-GACGTGAAGCCCTGGTGC-3' (forward), 5'-CAAGCCGCGTGCTG-3' (reverse); u-PA 5'-GTTTGAGGTGGAGCAGCTCAT-3' (forward), 5'-GCTAATGTCATTATGGAAGGCCAG-3' (reverse); TNF-α 5'-ATCCGAGATGTGGAAGTGGC-3' (forward), 5'-CGATCACCCGAAGTTCAGTA-3' (reverse); TGF-β1 5'-AGTCCCAAACGTCGAGGTGA-3' (forward), 5'-CCATGAGGAGCAGGAAGGG-3' (reverse); TGF-β2 5'-TGCTGAGAACCTTTTGTCTCC-3' (forward), 5'-GTCGAGGGTGTGTCAGGTA-3' (reverse); TGF-β3 5'-CAAGCAGCGCTACATAGGTGG-3' (forward), 5'-CAGTGACATCGAAGGACAGCC-3' (reverse); IL-8 5'-GACTGTTGTGGCCCGTGAG-3' (forward), 5'-CCGTCAAGCTCTGGATGTTCT-3' (reverse), and IL-1β 5'-CAACAAAAATGCCTCGTGC-3' (forward), 5'-TGCTGATGTACCAGTTGGG-3' (reverse).

Cytokine immunoassays

Crushed tissue was weighed and homogenized in 10 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4) supplemented with protease inhibitors, such as 2 mmol/L PMSF, 10 µg/mL pepstatin A, 1 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin, and 0.5 mg/mL EDTA (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Protein concentration was measured using a modified version of the Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Marne-la-Coquette, France). Concentration of IL-1β and TNF-α was determined by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). All data were expressed in picogram per milligram of protein.

Statistical analysis

Each real-time RT-PCR and cytokine immunoassay was done in six animals and results were expressed as mean±SE. The ANOVA and Student-Newman-Keuls test were used to determine whether the difference between values obtained with the control group and the irradiated group was statistically significant. *P* value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Abdominal X-irradiation (10-Gy) induced inhibition of food intake and decrease in body weight. Diarrhea was observed between d 3 and 5 after irradiation.

Alteration of structure of ileal tissue by a single 10-Gy dose of X-rays

Histopathological changes after irradiation are shown in Figure 1. No significant histological changes were seen 24 h increase in the thickness of the mucosa of irradiated mice compared to controls (+14%, *P*<0.01), with an increase in the number of epithelial cells located in the villi. Some crypts were still dilated at this time.

Increase in expression and activity of gelatinase A by a single

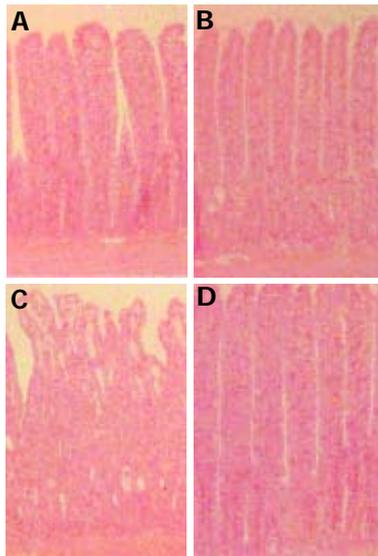


Figure 1 Histopathological study in ilea after X-irradiation with a single dose of 10 Gy. Ileal structure before (A) and one (B), three (C) and seven (D) days after abdominal X irradiation. Magnification x100.

after irradiation, whereas a marked alteration of the intestinal mucosa was observed 3 d after irradiation. A significant decrease in the thickness of the mucosa (-15%, $P < 0.01$), the sloughing of epithelial cells at the top of the villi, associated with an atrophy of the villi, dilation of the crypts, and absence of mucus secretion were observed. Muscle layers, on the other hand, appeared normal. Seven days after irradiation, the ileal epithelium seemed to be regenerated. We observed a significant

10-Gy dose of X-rays

Gelatin zymography allowed detection of both active and pro-forms of gelatinases (Figure 2A). Equal amounts of pro- (72 ku) and active (62 ku) MMP-2 were detected in control ileal tissues (Figure 2B). The pro-MMP-2 band significantly increased from d 1-7 ($\times 3.8$ on d 1; $\times 5.0$ on d 3; $\times 4.0$ on d 7, all $P < 0.01$) after irradiation. Induction of active MMP-2 peaked on d 1 ($\times 2.9$, $P < 0.01$) and was still higher than control values on d 3 ($\times 1.5$, $P < 0.05$) and 7 ($\times 1.8$, $P < 0.01$). We observed a weak gelatinolytic band with a molecular weight, which corresponded to that of pro-MMP-9, but as it was not inhibited by EDTA, it could not be attributed to MMP-9. The high molecular weight bands (125 and 200-220 ku) were, on the other hand, completely inhibited by EDTA and phenanthroline. These gelatinolytic activities, which might have MMP-9 dimers or an MMP-9-lipocalin complex, were equivalent on d 1 and 7 after irradiation, but weaker on d 3 (Figure 2B).

Irradiation-induced transcriptional activation of MMP-2 was confirmed by real-time RT-PCR. MMP-9 mRNA levels, however, were not significantly altered (Figure 2C). Since MMP-14 is involved in the activation of MMP-2, we studied the alterations in MMP-14 mRNA levels. We found that MMP-14 was induced 3 and 7 d after irradiation (Figure 2C).

Tissue localization of gelatinase A and other MMPs after X-irradiation with a single dose of 10 Gy

Immunohistochemistry was used to investigate the cell

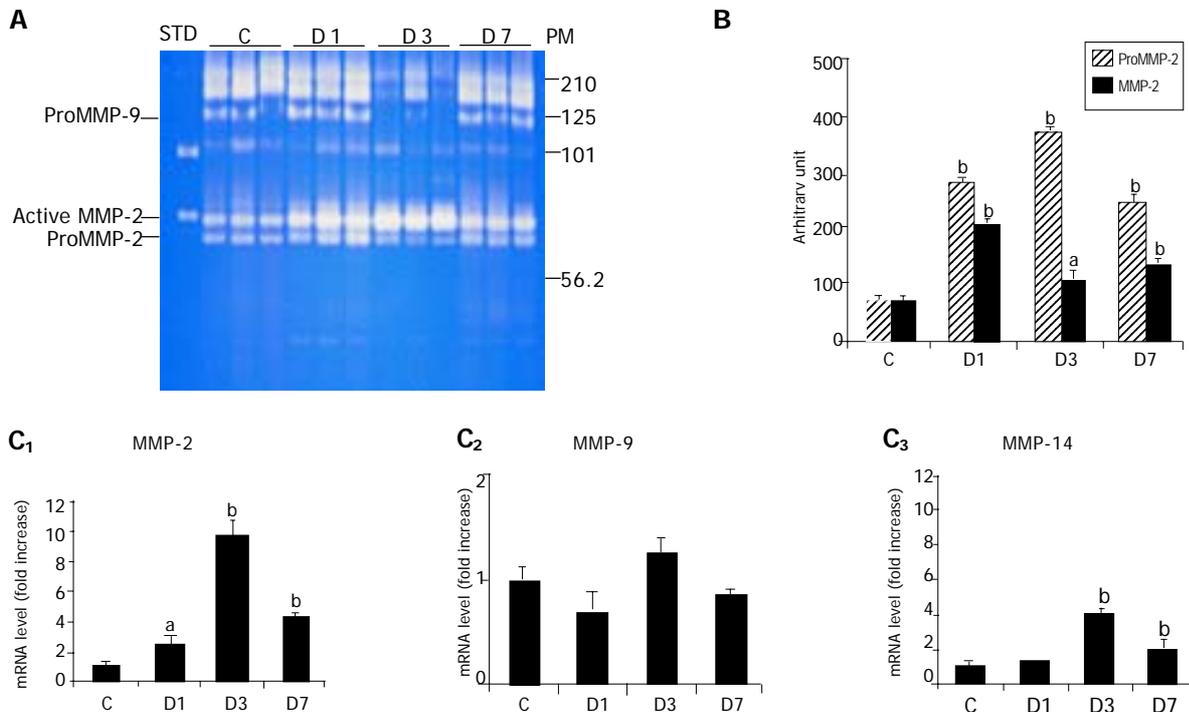


Figure 2 Gelatinases activities in ilea after X-irradiation with a single dose of 10 Gy. A: Study of gelatinases activities by zymography. Lane STD shows MMP-2 and MMP-9 standards, lane 2-4, 5-7; 8-10; 11-13 shows gelatinase activities in ilea from control rats (C) and one (D1), three (D3) and seven (D7) days after X-irradiation respectively; B: Densitometric analysis of zymography. Results

are mean \pm SE, significantly different from controls: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ VSC. C₁₋₃: Analysis of MMP-2, MMP-9 and MMP-14 gene expression. mRNA levels were measured by real time RT-PCR in control ilea from control rats (C) or one (D1), three (D3) and seven (D7) days after X-irradiation respectively. Results are mean \pm SE, significantly different from controls: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ VSC.

types that expressed gelatinase after irradiation. A weak MMP-2 staining restricted to the pericryptal sheath myofibroblasts, inflammatory cells, and smooth muscle cells was observed in control ileal tissues (Figures 3A and B). A significant transmural increase in MMP-2 staining was, however, found on d 1 after irradiation in smooth muscle and epithelial cells, and on d 3 in smooth muscle cells, epithelial cells of the villi, and in pericryptal sheath myofibroblasts. MMP-2 staining decreased on d 7.

In control samples, MMP-14 staining was observed in epithelial cells at the top of the villi, inflammatory cells in the lamina propria, and smooth muscle cells. As for mRNA, in irradiated samples, MMP-14 staining was unchanged on d 1, but had increased on d 3 and had spread to the whole tissue. On d 7, however, MMP-14 staining in irradiated and control samples was equivalent except in epithelial cells at the top of the villi, which exhibited weak MMP-14 staining (Figures 3A and B).

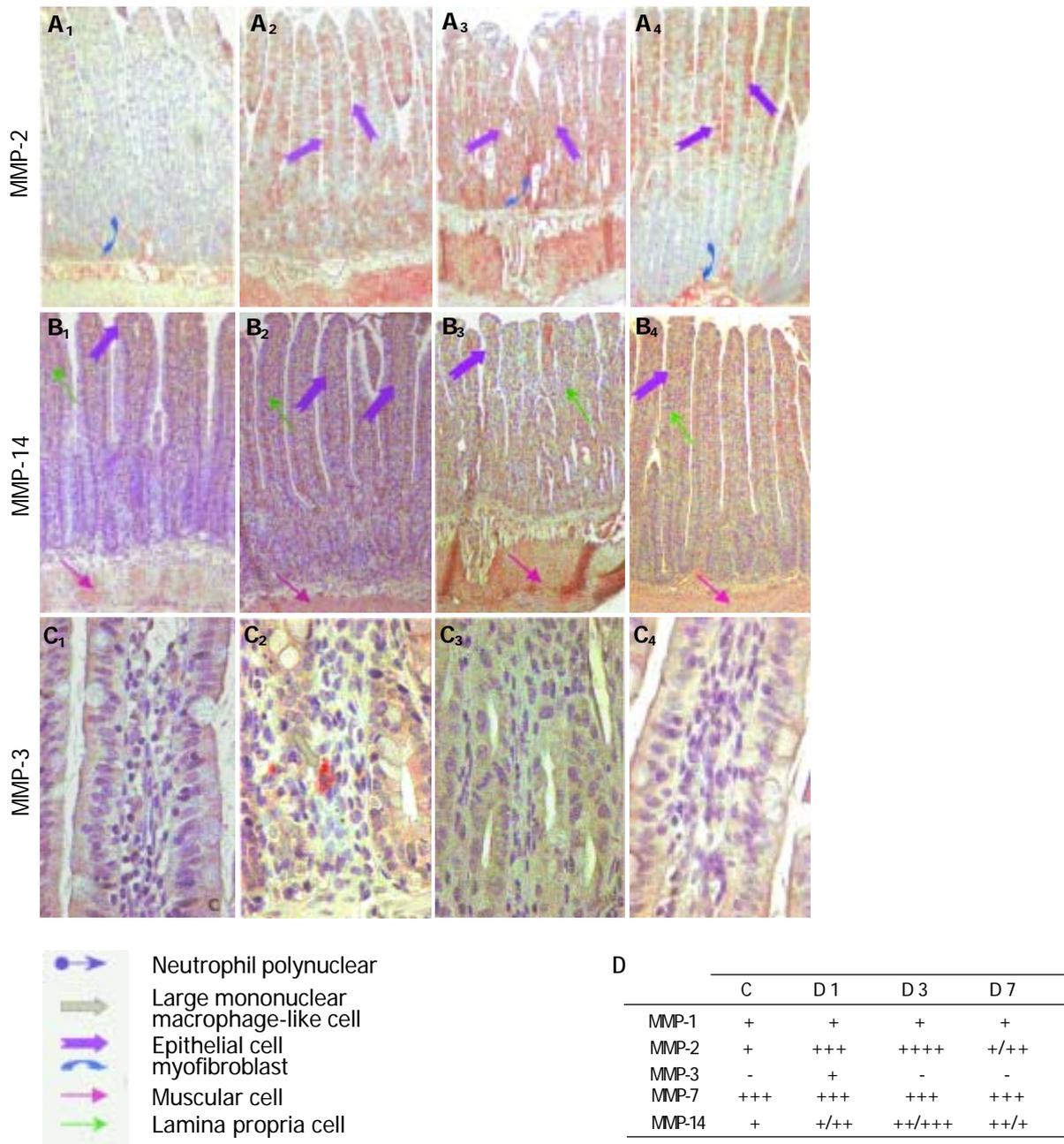


Figure 3 Tissue localization of gelatinase A and other MMPs in ilea after X-irradiation with a single dose of 10 Gy. **A₂**: MMP-2, MMP-14 and MMP-3 immunostaining. In control ilea, MMP-2 staining was observed in the pericryptal myofibroblast sheath, inflammatory cells and smooth muscle cells (**A₁**, x100). On day one and three (**A₂**; **A₃**, x100), increased MMP-2 staining was found in all of the layer of the bowel particularly in smooth muscle cells and in epithelial cells. On day seven (**A₄**, x100) MMP-2 staining was weaker and found in smooth muscle cells, epithelial cells of the villus only and pericryptal myofibroblast sheath. In control ilea, MMP-14 staining was observed in the inflammatory cells of the lamina propria, smooth muscle cells and some epithelial cells of the top of the villi (**B₁**, x100). No significant modification in MMP-14 staining was found in irradiated ilea on day one (**B₂**; x100), whereas on day three MMP-14 staining spread to the whole tissue (**B₃**, x100). On day seven (**B₄**, x100), MMP-14 staining return to control level except in the epithelial cells of the top of the villus. In control ilea, no MMP-3 staining was observed (**C₁**, x400), but a staining was observed in mononuclear infiltrated cells day one after X-irradiation (**C₂**, x400); **D**: MMPs immunostaining scoring. (-) represent no staining, (+) weak staining, (++) moderate staining, (+++) important and (++++) strong staining.

Furthermore, we focused on the expression and immunolocalization of MMP-1, -3, and -7. MMP-1 and -7 were found to be expressed in control ileal tissue, and no changes were observed after irradiation (Figure 3B). MMP-3 was not detected in control samples, but staining was observed at d 1 in some infiltrating mononuclear cells, which were morphologically similar to macrophages (Figures 3A and B).

Disappearance of CD8+ T lymphocytes from the ileum after X-irradiation with a single dose of 10 Gy

To investigate whether T cells could be involved in MMP activation after X-irradiation, a subset of peripheral T cells, the majority of natural killer (NK) cells, and granular intraepithelial leukocytes of the small intestine were stained with an antibody directed against an antigen present on the surface of thymocytes. This antigen is the rat homolog of the human CD8. Figure 4 shows that X-irradiation of the abdomen with a dose of 10 Gy caused a marked decrease in the number of CD8+ cells as early as 1 d after exposure, which was also observed on d 3 and 7.

Increase in the number of polynuclear neutrophils and expression of inflammatory and fibrogenic factors after irradiation with a single dose of 10 Gy

Neutrophil infiltration after abdominal X-irradiation was quantified based on myeloperoxidase staining. While we observed a slight increase in myeloperoxidase staining at d 1 and 3 after irradiation, the number of positive cells returned to control values at d 7 (Figure 5A).

Pro-inflammatory cytokines and fibrogenic growth factors are potent inducers of MMPs expression and activity. Thus, expressions of TNF- α , IL-1 β , IL-8, and TGF- β 1, -2, and -3 were assessed after X-irradiation. Tissue concentration of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β significantly increased 6 h after irradiation (2.3-fold and 2.3-fold, respectively, $P < 0.01$) as shown in Figure 5B. This early increase was followed by an increase in IL-8 at d 3 (6.4-fold, $P < 0.01$) as shown in Figure 5B.

TGF- β 1 and -3 mRNA levels increased 3 d after

irradiation (2.5-fold and 1.5-fold, respectively, $P < 0.01$). Furthermore, an increase in TGF- β 1 and -3 mRNA levels was also seen on d 7 (2.8-fold, $P < 0.01$; and 1.6-fold, $P < 0.05$, respectively). TGF- β 2 mRNA level, on the other hand, increased at d 1 and remained significantly high thereafter (2.1-fold on d 1, 3.2-fold on d 3, and 1.8 fold on d 7, all $P < 0.01$) as shown in Figure 5C.

Expression of MMP activating factors after X-irradiation with a single dose of 10 Gy

Because the plasminogen system is known to regulate MMP activation, we investigated variations in the mRNA levels of plasminogen, t-PA, u-PA, and PAI-1 after irradiation (Figure 6). Irradiation induced a significant decrease in plasminogen mRNA level on d 7, and a marked increase in u-PA (6.1-fold, $P < 0.01$), t-PA (21-fold, $P < 0.01$), and PAI-1 (19-fold, $P < 0.01$) on d 3, which was also observed on d 7.

Expression of gelatinase inhibitors after X-irradiation with a single dose of 10 Gy

We investigated TIMP-1 and -2 expression, i.e., intensity and localization, in the sections of X-irradiated rat ileum. In control ileal tissue, a moderate TIMP-1 staining was observed in only a few epithelial cells, in inflammatory cells in the lamina propria, and in smooth muscle cells (Figure 7A). TIMP-1 staining increased in all of the layers of the bowel 1 d after irradiation; the most intense staining was observed in epithelial cells. Staining intensity peaked on d 3 after irradiation (Figure 7A). TIMP-1 expression pattern after irradiation was confirmed by the analysis of mRNA level (Figure 7A).

A weak TIMP-2 staining was observed in control ileal tissues (Figure 7B). A slight increase in TIMP-2 staining intensity was observed in epithelial, inflammatory, and smooth muscle cells 1 d after irradiation and could still be observed on d 3 and 7 (Figure 7B). This increase in TIMP-2 mRNA level only reached significance 3 d after irradiation (fourfold increase, $P < 0.01$, Figure 7B).

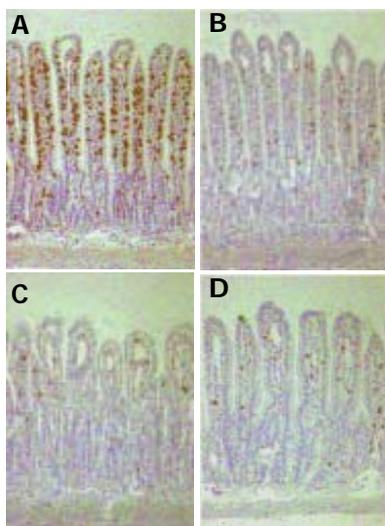


Figure 4 CD8a positive T-cells after X-irradiation with a single dose of 10 Gy. Immunostaining for CD8a positive cells in control ilea (A) and one (B), three (C) and seven (D) days after X-irradiation. Magnification x100.

DISCUSSION

In this study, we have shown that abdominal X-irradiation with a dose of 10 Gy simultaneously enhances synthesis and activity of MMP-2 and -14. This enhancement is concomitant with an induction of pro-inflammatory cytokines, fibrogenic growth factors, and plasminogen system, which suggests that a complex interplay of factors actually controls radiation-induced activation of MMPs in the intestine. Inhibitory pathways are simultaneously activated as expression of TIMP-1 and -2 increases, which is suggestive of an irradiation-induced alteration of ECM remodeling. Finally, we observed a decrease in the number of T cells after abdominal irradiation. Our data on radiation-induced induction of gelatinase are in agreement with a previous report by Seifert *et al.*^[15], who observed a prolonged gelatinolytic activity in rat colonic anastomoses after intraoperative irradiation. Our results concerning the absence of T cells during radiation-induced ECM remodeling, however, markedly differ from those obtained in models of inflammatory bowel diseases. Our study shows that T lymphocytes are not directly involved in

radiation-induced mucosal injuries, suggesting that radiation-induced mucosal breakdown may be promoted by specific cellular pathways and specific molecular signals, which have been investigated further in this study.

Direct evidence of an important T cell-mediated process in the pathogenesis of mucosal lesions has been shown in *in vivo* and *ex vivo* models, in which T cells are activated by pokeweed mitogen or anti-CD3 and IL-12 in explants of human fetal intestine^[13]. In these models, a severe tissue injury occurs following a massive increase in MMP synthesis (mainly MMP-3 and -9). De Winter *et al.*^[22], provided evidence of a cross-talk between lymphocytes and epithelial cells *in vivo*. This cross-talk is mediated through cytokines that are locally produced by epithelial cells, which regulate immune responses in the intestine. Using the MRC OX8 antibody, specific for T cytotoxic/suppressor cells, granular intraepithelial leukocytes, and NK cells^[23], we sought to determine whether T cells were present in the ileal wall. We observed that CD8+ staining completely disappeared 24 h after irradiation, possibly due to radiation-induced apoptosis. Specific target cells are activated after abdominal irradiation, and neutrophils, epithelial, and mesenchymal cells are responsible for the increased expression of MMPs.

Molecular mediators potentially involved in this radiation-induced enhancement of MMP expression were therefore investigated. We focused on the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α as they are seemingly the mediators that are the most frequently reported to be involved in bowel inflammatory diseases^[24]. In agreement with a previous study^[4], levels of IL-1 β and TNF- α increased as soon as 6 h after irradiation, and were returned to control values on d 1, 3, and 7 after irradiation (data not shown). The early increase in IL-1 β and TNF- α may be due to radiation-induced mast-cell degranulation^[25]. This increase likely promotes IL-8 induction, leading to leukocyte recruitment and granulocyte infiltration. The radiation-induced inflammatory status, however, appeared to be moderate (twofold increase in TNF- α and IL-1 β protein levels)^[4] in comparison to what was reported in Crohn's disease by Louis *et al.*^[11], (10- and 8-fold increase, respectively). This weak inflammatory status may account for the weak MMP-3 stimulation observed in the irradiated ileum. This hypothesis is supported by Mengshol *et al.*^[26], who reported that high levels of pro-inflammatory cytokines are required to stimulate MMP-3 secretion by subepithelial

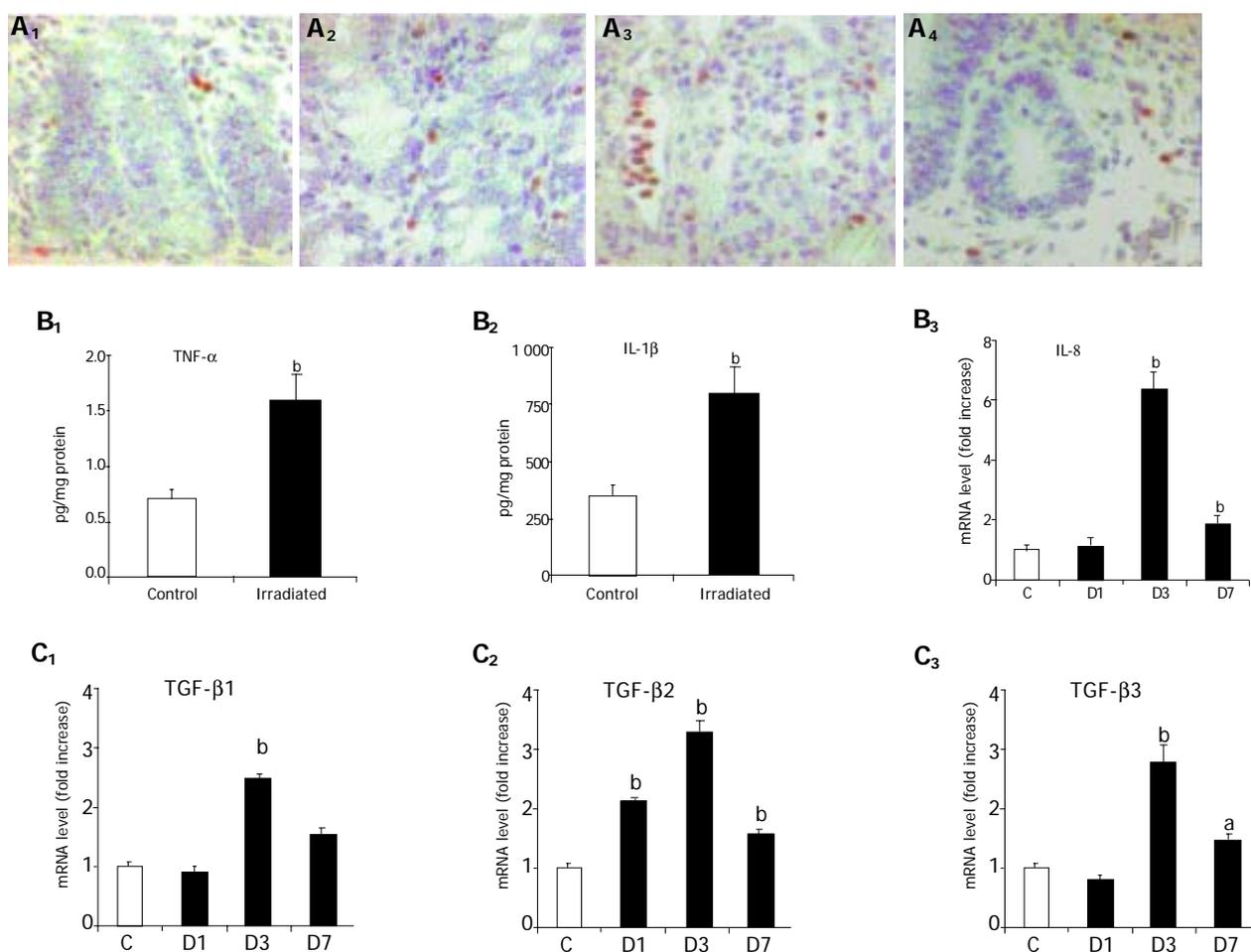


Figure 5 Radiation-induced inflammation. **A:** Myeloperoxidase positive cells in X-irradiated ilea. Immunostaining for myeloperoxidase positive cells in control ilea (A₁) and one (A₂), three (A₃) and seven (A₄) days after X-irradiation respectively. Magnification x 400; **B**_{1,3}: Concentration of TNF- α and IL-1 β six hours, and IL-8 mRNA level one to seven days, after X-irradiation with a single dose of 10 Gy. Results are mean \pm SE, significantly different from controls: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs others; **C**_{1,3}: TGF- β 1, β 2 and β 3 mRNA level after X-irradiation with a single dose of 10 Gy. Gene expression of TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3, was determined by real time RT-PCR in control ilea (C) one (D1), three (D3) and seven (D7) days after X-irradiation respectively. Results are mean \pm SE, significantly different from controls: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs others.

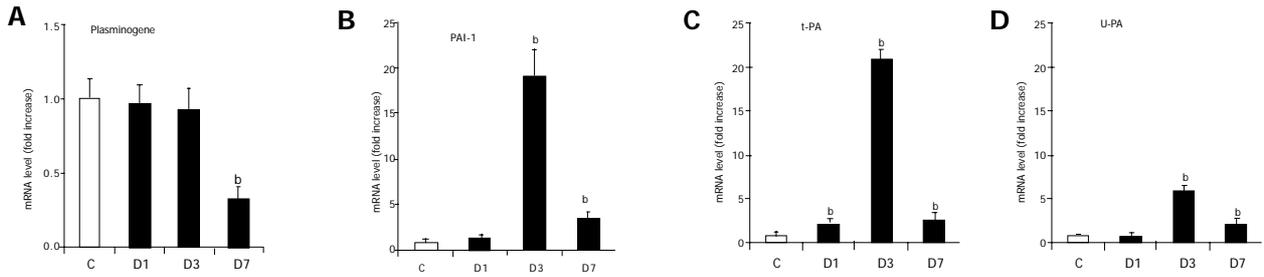


Figure 6 Plasminogen, U-PA, t-PA and PAI-1 mRNA level after X-irradiation with a single dose of 10 Gy. Gene expressions of plasminogen, U-PA, t-PA and PAI-1 were determined by real time RT-PCR measured in control ilea (C) and

one day (D1), three day (D3) and seven days (D7) after X-irradiation Results are mean±SE, significantly different from controls: ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 VS others (A-D).

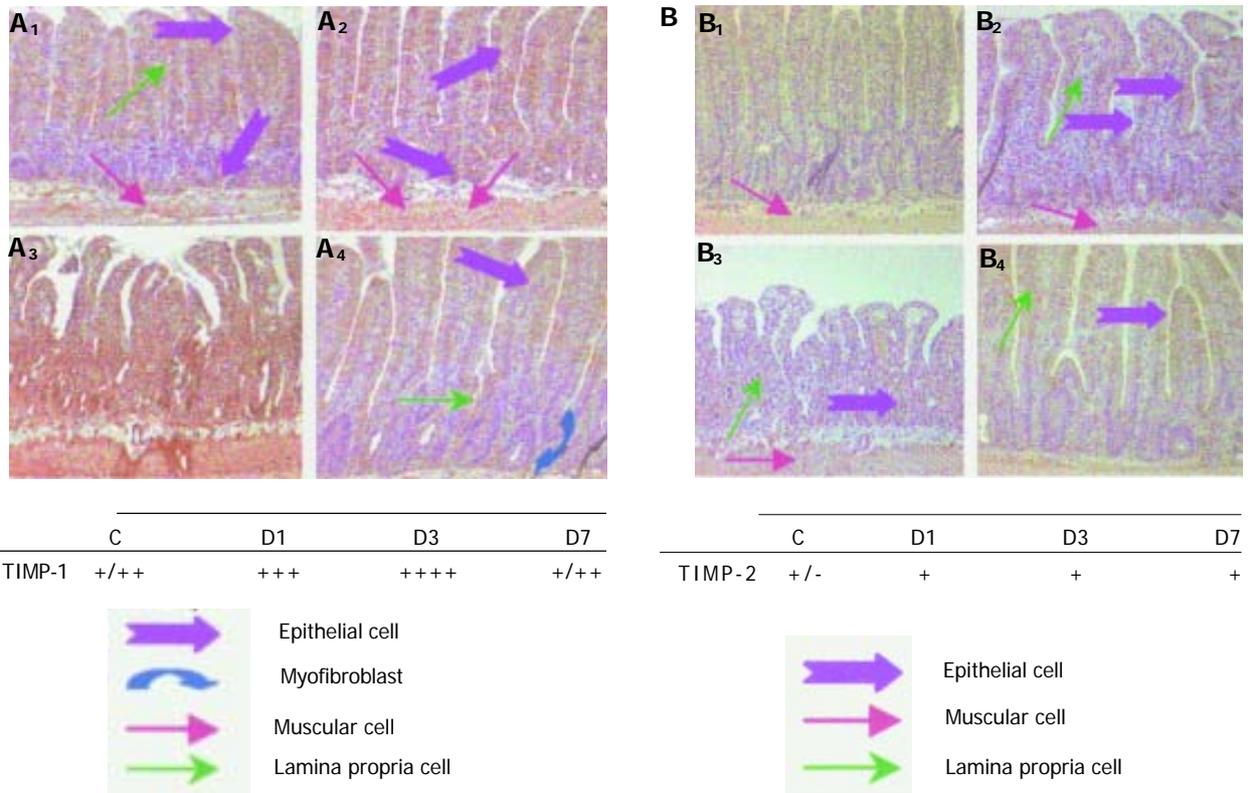


Figure 7 TIMP expression after X-irradiation with a single dose of 10 Gy. **A:** In control ilea, TIMP-1 staining was observed in the inflammatory cells of the lamina propria, smooth muscle cells and some rare epithelial cells of the crypt and of the top of the villus (A₁, x100). On day one (A₂, x100), TIMP-1 staining was found in all layers of the bowel and particularly in epithelial cells and in smooth muscle cells. On day three (A₃, x100), the staining spread to the whole tissue. On day seven (A₄, x100), TIMP-1 staining was found in smooth muscle cells, epithelial cells of the villus only, in pericryptal myofibroblast sheath and in inflammatory cells of the lamina propria. Gene expression of TIMP-1, determined by real time RT-PCR was measured in control ilea (C) one (D1), three (D3) and seven (D7) days after X-irradiation respectively. Results are mean±SE, significantly different from controls: ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01. **B:** In control ilea, weak TIMP-2 staining was observed in smooth muscle cells (B₁, x100). On day one (B₂, x100) and day three (B₃, x100) after X-irradiation, a slight TIMP-2 increase was found in smooth muscle cells, in epithelial cells and in inflammatory cells of the lamina propria. On day seven (B₄, x100), (C,D) TIMP-2 staining was observed in epithelial cells on the top of the villus, inflammatory cells of the lamina propria. Gene expression of TIMP-2, determined by real time RT-PCR was measured in control ilea (C) one (D1), three (D3) and seven (D7) days after X-irradiation respectively. Results are mean±SE, significantly different from controls: ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 VS others.

myofibroblasts *in vitro*. Fibrogenic growth factors, such as TGF- β , are also involved in the regulation of cell proliferation, inflammation, immune response, and ECM deposition, which are important parts of the healing process [27,28]. Furthermore, previous studies have suggested that all three TGF- β isoforms are overexpressed during the early phase of radiation-induced injury, while TGF- β 1 appears to be predominant in the late phase [29,30]. In this study, we observed an early peak of TGF- β 2 induction at d 1, while the other two isoforms (TGF- β 1 and TGF- β 3) were overexpressed after 3 d, at the onset of the restoration phase. We also observed that induction of MMP-2 mRNA synthesis was concomitant with that of the two TGF- β isoforms. The modulation of MMP-2 expression by TGF- β has already been reported in other models [31,32], and the present results likewise support the hypothesis that the TGF- β family is involved in the regulation of MMP-2 expression after radiation-induced injury.

We investigated the plasminogen-plasmin system, another activating pathway that is known to regulate MMP activity [2]. This system is a key regulator of fibrinolysis and ECM degradation [33]. Generation of plasmin from plasminogen is regulated by complex interactions between various activators and inhibitors. Classically, plasminogen is known to be activated by u-PA and t-PA. In this study, both u-PA and t-PA were found to be overexpressed 1 d after irradiation, suggesting that the plasmin system is acutely activated after abdominal irradiation. These results are in accordance with previous reports [34-36] that showed an increase in the fibrinolytic activity in the intestinal mucosa after irradiation. At d 3 and 7, however, the increased expressions of u-PA and t-PA were associated to an increased expression of the inhibitor PAI-1, which may limit plasminogen activation.

Furthermore, we studied the expression of TIMP-1 and TIMP-2, the physiological inhibitors of MMPs. The involvement of TIMPs in inflammatory bowel diseases is still controversial. Heuschkel *et al.* [10], have shown that MMP-3 is overexpressed while TIMP-1 is not. von Lampe *et al.* [37], observed an increase in the level of TIMP-1 mRNA and no modification of the level of TIMP-2 mRNA, suggesting a net increase in the proteolytic activity in inflamed mucosa. Our observations seem consistent with these data obtained in human beings. Induction of TIMP-1 was observed after 1, 3, and 7 d of irradiation, whereas an upregulation of TIMP-2 was seen on d 3 after irradiation. MMP induction rates, however, significantly exceeded TIMP-1 induction. TIMP-2 has been reported to have a bimodal function and to promote activation of MMP-2 when associated with molecules, such as pro-MMP-2 and MMP-14, into large molecular complexes [38]. In this case, synthesis of MMP-14 seems to be the major rate-limiting factor of MMP-2 activation [39]. In this study, expression of both MMP-14 and TIMP-2 was increased after irradiation. Furthermore, MMP-14/TIMP-2 and MMP-2/TIMP-2 mRNA ratios suggested that activation of pro-MMP-2 must have occurred, since a marked increase in the level of active MMP-2 was observed at d 1 after exposure.

In conclusion, the molecular cascades induced by ionizing radiation are complex and are likely to involve more molecules than those studied here. These observations,

however, bring new insights on radiation-induced ECM remodeling in the intestine. The fact that CD8a+ cells disappear after abdominal irradiation suggests that specific cellular effectors are involved in radiation-induced activation of MMPs.

REFERENCES

- 1 **Becciolini A**, Balzi M, Potten CS. Radiation effects on proliferation and differentiation in the rat small intestine. In: Potten CS, Hendry JH, eds. *Radiation and Gut*. Amsterdam: Elsevier 1995: 85-143
- 2 **Sternlicht MD**, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; **17**: 463-516
- 3 **Burger A**, Loffler H, Bamberg M, Rodemann HP. Molecular and cellular basis of radiation fibrosis. *Int J Radiat Biol* 1998; **73**: 401-408
- 4 **Linard C**, Ropenga A, Vozenin-Brotans 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**: G556-565
- 5 **Nagase H**, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; **274**: 21491-21494
- 6 **Pender SL**, Salmela MT, Monteleone G, Schnapp D, McKenzie C, Spencer J, Fong S, Saarialho-Kere U, MacDonald TT. Ligation of alpha4ss1 integrin on human intestinal mucosal mesenchymal cells selectively Up-regulates membrane type-1 matrix metalloproteinase and confers a migratory phenotype. *Am J Pathol* 2000; **157**: 1955-1962
- 7 **Baker AH**, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002; **115**: 3719-3727
- 8 **Bailey CJ**, Hembry RM, Alexander A, Irving MH, Grant ME, Shuttleworth CA. Distribution of the matrix metalloproteinases stromelysin, gelatinases A and B, and collagenase in Crohn's disease and normal intestine. *J Clin Pathol* 1994; **47**: 113-116
- 9 **Baugh MD**, Perry MJ, Hollander AP, Davies DR, Cross SS, Lobo AJ, Taylor CJ, Evans GS. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1999; **117**: 814-822
- 10 **Heuschkel RB**, MacDonald TT, Monteleone G, Bajaj-Elliott M, Smith JA, Pender SL. Imbalance of stromelysin-1 and TIMP-1 in the mucosal lesions of children with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000; **47**: 57-62
- 11 **Louis E**, Ribbens C, Godon A, Franchimont D, De Groot D, Hardy N, Boniver J, Belaiche J, Malaise M. Increased production of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by inflamed mucosa in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2000; **120**: 241-246
- 12 **Saarialho-Kere UK**, Vaalamo M, Puolakkainen P, Airola K, Parks WC, Karjalainen-Lindsberg ML. Enhanced expression of matrilysin, collagenase, and stromelysin-1 in gastrointestinal ulcers. *Am J Pathol* 1996; **148**: 519-526
- 13 **Salmela MT**, MacDonald TT, Black D, Irvine B, Zhuma T, Saarialho-Kere U, Pender SL. Upregulation of matrix metalloproteinases in a model of T cell mediated tissue injury in the gut: analysis by gene array and *in situ* hybridisation. *Gut* 2002; **51**: 540-547
- 14 **Pender SL**, Tickle SP, Docherty AJ, Howie D, Wathen NC, MacDonald TT. A major role for matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. *J Immunol* 1997; **158**: 1582-1590
- 15 **Seifert WF**, Wobbles T, Hoogenhout J, de Man BM, Hendriks T. Intra-operative irradiation prolongs the presence of matrix metalloproteinase activity in large bowel anastomoses of the rat. *Radiat Res* 1997; **147**: 354-361
- 16 **Hovdenak N**, Wang J, Sung CC, Kelly T, Fajardo LF, Hauer-Jensen M. Clinical significance of increased gelatinolytic activity in the rectal mucosa during external beam radiation

- therapy of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; **53**: 919-927
- 17 **Kumar A**, Collins HM, Scholefield JH, Watson SA. Increased type-IV collagenase (MMP-2 and MMP-9) activity following preoperative radiotherapy in rectal cancer. *Br J Cancer* 2000; **82**: 960-965
 - 18 **Kleiner DE**, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994; **218**: 325-329
 - 19 **Strup-Perrot C**, Mathe D, Linard C, Violot D, Milliat F, Francois A, Bourhis J, Vozenin-Brotons MC. Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs and TIMPs in late radiation enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; **287**: G875-885
 - 20 **MacDonald TT**, Spencer J. Evidence that activated mucosal T cells play a role in the pathogenesis of enteropathy in human small intestine. *J Exp Med* 1988; **167**: 1341-1349
 - 21 **Pender SL**, Lionetti P, Murch SH, Wathan N, MacDonald TT. Proteolytic degradation of intestinal mucosal extracellular matrix after lamina propria T cell activation. *Gut* 1996; **39**: 284-290
 - 22 **De Winter H**, Elewaut D, Turovskaya O, Huflejt M, Shimeld C, Hagenbaugh A, Binder S, Takahashi I, Kronenberg M, Cheroutre H. Regulation of mucosal immune responses by recombinant interleukin 10 produced by intestinal epithelial cells in mice. *Gastroenterology* 2002; **122**: 1829-1841
 - 23 **Lyscom N**, Brueton MJ. Intraepithelial, lamina propria and Peyer's patch lymphocytes of the rat small intestine: isolation and characterization in terms of immunoglobulin markers and receptors for monoclonal antibodies. *Immunology* 1982; **45**: 775-783
 - 24 **Schuppan D**, Hahn EG. MMPs in the gut: inflammation hits the matrix. *Gut* 2000; **47**: 12-14
 - 25 **MacNaughton WK**, Leach KE, Prud'homme-Lalonde L, Ho W, Sharkey KA. Ionizing radiation reduces neurally evoked electrolyte transport in rat ileum through a mast cell-dependent mechanism. *Gastroenterology* 1994; **106**: 324-335
 - 26 **Mengshol JA**, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum* 2000; **43**: 801-811
 - 27 **Dignass AU**, Podolsky DK. Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta. *Gastroenterology* 1993; **105**: 1323-1332
 - 28 **Beck PL**, Rosenberg IM, Xavier RJ, Koh T, Wong JF, Podolsky DK. Transforming growth factor-beta mediates intestinal healing and susceptibility to injury *in vitro* and *in vivo* through epithelial cells. *Am J Pathol* 2003; **162**: 597-608
 - 29 **Ruifrok AC**, Mason KA, Lozano G, Thames HD. Spatial and temporal patterns of expression of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha and transforming growth factor beta 1-3 and their receptors in mouse jejunum after radiation treatment. *Radiat Res* 1997; **147**: 1-12
 - 30 **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
 - 31 **Edwards DR**, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJ, Angel P, Heath JK. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *Embo J* 1987; **6**: 1899-1904
 - 32 **Overall CM**, Wrana JL, Sodek J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem* 1991; **266**: 14064-14071
 - 33 **Vassalli JD**, Sappino AP, Belin D. The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest* 1991; **88**: 1067-1072
 - 34 **Rao JS**, Rayford A, Yamamoto M, Ang KK, Tofilon P, Sawaya R. Modulation of fibrinolysis by ionizing radiation. *J Neurooncol* 1994; **22**: 161-171
 - 35 **Boothman DA**, Wang M, Lee SW. Induction of tissue-type plasminogen activator by ionizing radiation in human malignant melanoma cells. *Cancer Res* 1991; **51**: 5587-5595
 - 36 **Sawaya R**, Rayford A, Kono S, Ang KK, Feng Y, Stephens LC, Rao JS. Elevated levels of plasminogen activators in the pathogenesis of delayed radiation damage in rat cervical spinal cord *in vivo*. *Radiat Res* 1994; **138**: 386-391
 - 37 **von Lampe B**, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000; **47**: 63-73
 - 38 **Wang Z**, Juttermann R, Soloway PD. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 *in vivo*. *J Biol Chem* 2000; **275**: 26411-26415
 - 39 **Werb Z**. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 1997; **91**: 439-442

III. Etude des effets d'un inhibiteur des métalloprotéases matricielles sur le remodelage post-radique de l'iléon.

1. Objectif de l'étude :

L'homéostasie tissulaire est régie de façon spatio-temporelle par deux grandes balances physiologiquement en équilibre, que sont les équilibres existant entre prolifération cellulaire et mortalité et entre les processus anaboliques et cataboliques affectant les constituants de la matrice extracellulaire. Les différentes phases conduisant au renouvellement physiologique complet de la muqueuse intestinale, réalisé en deux à trois jours chez les rongeurs, impliquent un remodelage permanent dont les MMP sont des enzymes clefs. Nos travaux présentés dans les articles I et II montrent que l'exposition de rats à une irradiation abdominale X de 10 Gy, provoque des lésions tissulaires matérialisées entre autre par la perte de cellules et la diminution de la hauteur de la muqueuse et plus particulièrement de la hauteur des villosités. Cette atrophie villositaire est aussi observable dans les maladies inflammatoires intestinales [Cuenod-Jabri *et al.* 1997]. L'exposition aux rayonnements ionisants conduit par ailleurs à la modification de l'équilibre existant entre MMP et TIMP, impliquant ces enzymes dans la cicatrisation post-radique intestinale.

L'utilisation d'un inhibiteur de MMP (ortho phénantroline) a montré un effet protecteur de la muqueuse dans des modèles d'inflammation intestinale [Medina *et al.* 2001]. Cette protection s'exercerait-elle dans le cadre de l'irradiation ? Pour répondre à cette question, nous avons mis en place une stratégie expérimentale combinant l'irradiation et l'inhibition de l'activité des MMP.

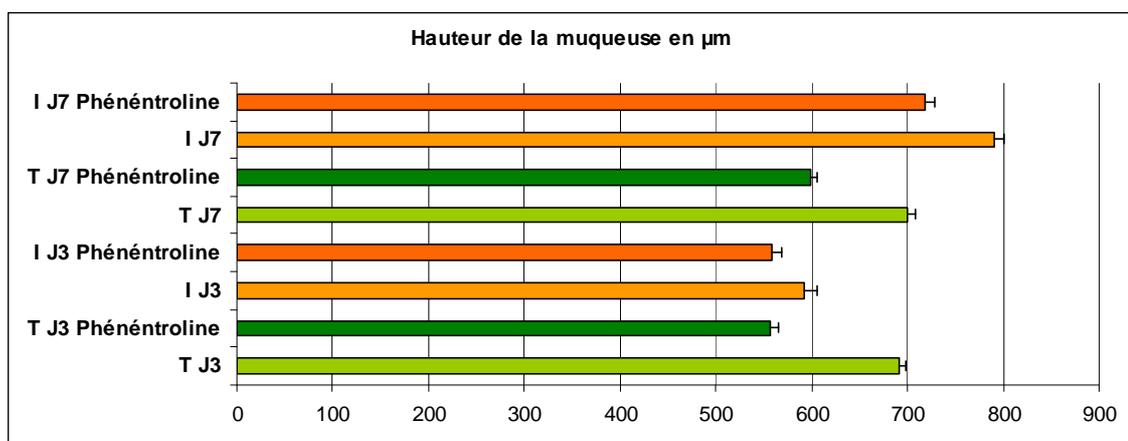
2. Limite de l'étude :

Le principal écueil de cette étude est la faible spécificité de l'inhibiteur choisi. Les autres inhibiteurs disponibles sont certes plus spécifiques des MMP mais présentent une toxicité non négligeable qui, certainement exacerbée par l'irradiation, aurait rendu les résultats obtenus difficilement exploitables.

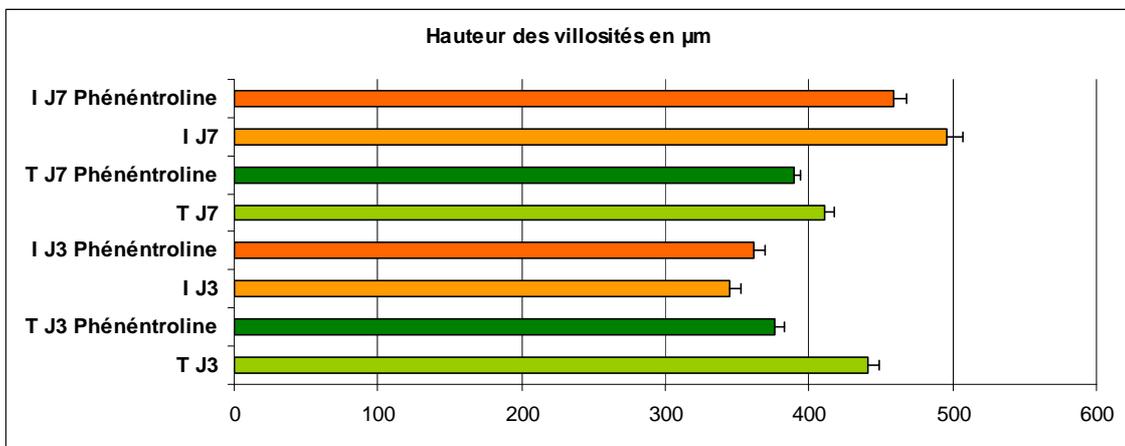
3. Méthodologie :

Inhibiteur choisi : l'ortho phénanthroline (Sigma®) administrée par gavage oral à raison de 20mg/kg/prise/jour/ml d'eau. L'ortho phénanthroline est un composé chélateur du zinc, qui se lie au site catalytique des MMP, inhibant ainsi leur activité enzymatique. Le prélèvement des tissus et leur traitement histologique sont présentés dans le paragraphe « matériels et méthodes » de l'article I. L'analyse morphométrique a été réalisée sur des coupes paraffine d'iléon distal de 4 µm, après coloration HES, en utilisant le logiciel d'analyse d'images visiol@b™ 2000 (Biocom SA, Les Ulis, France), à l'objectif x 10. Vingt mesures de hauteur de la muqueuse, de hauteur de villosités et de profondeur de cryptes, sont réalisées par animal. Les données présentées correspondent à la moyenne calculée par groupe (n= 6 animaux) ± SEM.

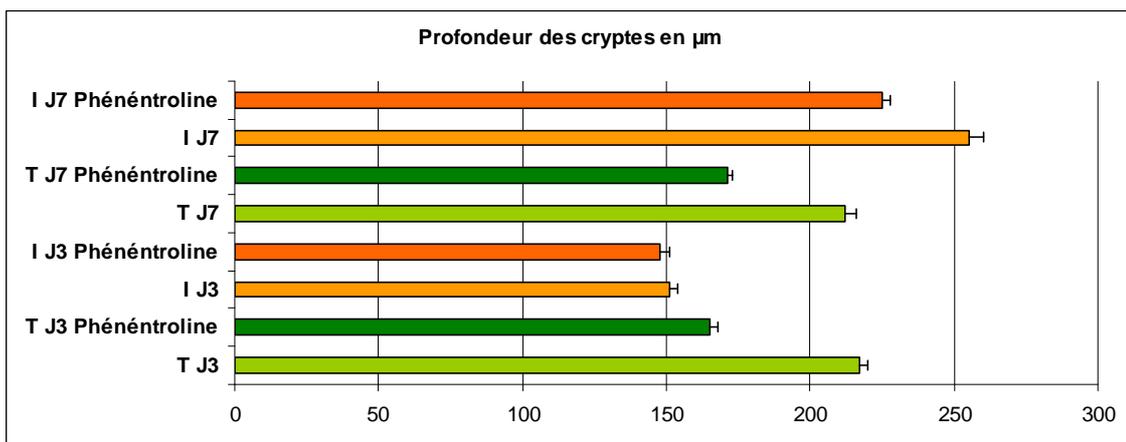
4. Résultats



La mesure de la hauteur de la muqueuse montre que l'exposition à une irradiation abdominale X de 10 Gy induit une diminution de la hauteur muqueuse à J3 de -14 % ($P < 0.001$) et une augmentation de cette dernière à J7 de +13 % ($P < 0.001$). L'administration d'o-phénanthroline (traitement) induit chez les animaux contrôles une diminution significative de la hauteur muqueuse de -20% à J3 et -14% à J7 ($P < 0.001$). Chez les animaux irradiés traités par rapport aux animaux irradiés non traités une diminution de la hauteur de la muqueuse à été observée à J3 comme à J7 (respectivement -6% $P = 0.076$ et - 9 % $P = 0.002$).



La mesure de la hauteur des villosités montre que l'exposition à une irradiation abdominale X de 10 Gy induit une diminution de la hauteur à J3 de -22 % ($P < 0.001$) et une augmentation de cette dernière à J7 de +21 % ($P < 0.001$). Le traitement induit chez les animaux contrôles une diminution significative de la hauteur villositaire de -15% à J3 et -5% à J7 (avec respectivement $P < 0.001$ et $P < 0.05$). Chez les animaux irradiés traités par rapport aux animaux irradiés non traités une modulation de la hauteur villositaire est observée avec une augmentation non significative à J3 (+ 5% $p = 0.154$) et une diminution significative à J7 de -7.5% ($P < 0.05$).



La mesure de la profondeur cryptique montre que l'exposition à une irradiation abdominale X de 10 Gy induit une diminution de la profondeur à J3 de -30 % ($P < 0.001$) et une augmentation de cette dernière à J7 de +20 % ($P < 0.001$). Le traitement induit chez les animaux contrôles une diminution significative de la profondeur des cryptes à J3 comme à J7 (-24% $P < 0.001$ et -19% $P < 0.001$). Chez les animaux irradiés traités par rapport aux animaux irradiés non traités une modulation de la hauteur cryptique est notable. On observe pas de variation à J3 et une diminution significative à J7 (-10%, $P < 0.001$).

5. Discussion

Nous avons montré que l'irradiation diminue à J3 de 14% la hauteur de la muqueuse et le traitement de 6% soit un différentiel de 8%, à J7 l'irradiation augmente de 13 % la hauteur muqueuse alors que le traitement la réduit de 9% soit une différence de 22%. L'exposition aux rayonnements ionisants réduisant à J3 de 22% la hauteur des villosités et le traitement l'augmentant de 5% soit un différentiel de 17%, à J7 l'irradiation augmente de 21% la hauteur villositaire alors que le traitement la réduit de 7,5% soit une différence de 28,5%. L'irradiation diminue à J3 de 30% la profondeur des cryptes et le traitement de 2% soit un différentiel de 28%, à J7 l'irradiation augmente de 20% la profondeur cryptique alors que le traitement la réduit de 10% soit une différence de 30%. Il apparaît que l'utilisation de l'ortho-phénanthroline diminue bien la hauteur des villosités et la profondeur des cryptes, confirmant ainsi le rôle joué par les MMP dans le renouvellement et la migration entérocytaire. L'analyse morphométrique montre par ailleurs qu'il n'y a pas d'effet additionnel de l'irradiation chez les animaux traités et que l'inhibition des MMP n'altère que partiellement la restauration tissulaire. Plusieurs hypothèses expliquant que l'impact de l'inhibition des MMP sur la cicatrisation ne soit que partielle, sont envisageables. La première met en avant la faible spécificité de l'ortho phénanthroline, la seconde s'oriente vers une utilisation non optimale de cet inhibiteur, la troisième met en évidence que la part prise

par les MMP dans le remodelage n'est pas de 100% et donc que ces enzymes ne sont pas les seules impliquées dans le remodelage, la quatrième et dernière tend à mettre en lumière qu'inhiber l'activité des MMP ne suffisant pas à empêcher la progression des entérocytes le long de l'axe crypto-villositaire et que la production des constituants matriciels et plus précisément de ceux de la lame basale est certainement un point clef de la restauration tissulaire.

Cet inhibiteur a été utilisé dans d'autres modèles. Les travaux menés par C. Medina et collaborateurs, ont montré que l'administration à des rats d'ortho phénanthroline par gavage à une dose de 20 mg/kg/j n'induit pas d'effet neurotoxique comme cela avait pu être le cas chez la souris pour des administrations intra péritonéales [Medina *et al.* 2001]. Par ailleurs cette étude montre que l'utilisation de l'ortho phénanthroline à des fins thérapeutiques, sur deux modèles de rats présentant une IBD, diminue significativement le score lésionnel. Pour le modèle TNBS, une réduction des strictures coliques est observée, tandis que pour le modèle DSS, une diminution de l'extension et de la sévérité des lésions muqueuses est mesurée. Ces travaux suggèrent que l'effet bénéfique du traitement à l'ortho phénanthroline n'est pas dû à l'inhibition directe de l'infiltration par des cellules inflammatoires ou la libération de médiateurs inflammatoires, en effet les taux tissulaires en éicosanoïdes et en MPO restent inchangés par le traitement, mais repose sur l'inhibition du remodelage pathologique entraîné par l'inflammation. L'amélioration des scores lésionnels observés dans les IBD, présentée dans l'étude précitée, s'opèrerait-elle dans le cadre des fibroses radio-induites? Cette hypothèse sera abordée dans la discussion et les perspectives de ce travail de thèse.

6. Conclusion :

Les résultats de notre étude montrent que l'inhibition des MMP, via l'administration d'ortho phénanthroline, à des conséquences mesurables sur le remodelage tissulaire après irradiation qui se traduisent par une diminution des

hauteurs muqueuses, villositaires et cryptiques marquées. Il apparaît alors clairement que les MMP sont des enzymes clef du remodelage post radique.

IV. Article II : Abdominal X-ray irradiation in rat colon induced the expression of MMP subtypes specialized in basement membrane degradation.

C. STRUP-PERROT, MC. VOZENIN-BROTONS, M. VANDAMME, M. BENDERITTER, D. MATHE

Soumis électroniquement le 30/09/04 à "International Journal of Radiation Biology".

L'irradiation abdominale X induit dans le colon de rats l'expression de MMP spécialisées dans la dégradation de la membrane basale.

1. But de ce travail :

La réponse colique aux lésions induites par une irradiation à dose unique est caractérisée par une dénudation épithéliale trois jours après l'exposition, suivie par une restauration à sept jours, ces deux phases impliquant le remodelage de la matrice extra-cellulaire. Le but de cette étude est de caractériser la contribution des MMP dans le remodelage colique radio-induit.

2. Méthodologie :

Les techniques de zymographie, d'immunohistochimie et de RT-PCR quantitative en temps réel ont été utilisées pour mettre en évidence l'expression et l'activité des MMP et des TIMP d'intérêt, au cours des processus lésionnels et cicatriciels faisant suite à une irradiation abdominale X de 10 Gy.

3. Résultats :

Le résultat le plus intéressant de cette étude est certainement que l'altération radio-induite de la structure de la muqueuse colique est concomitante à l'induction locale des MMP impliquées dans la dégradation de la membrane basale (MMP-2, -3 et -9). Nous avons mis en évidence l'activation transcriptionnelle et protéolytique de la MMP-2. Au vu de ces résultats nous avons étudié les voies pouvant mener à son activation et avons mis en évidence une augmentation précoce de l'expression génique de médiateurs inflammatoires solubles (TNF- α , IL-1 β et IL-8). Par ailleurs, nous avons montré que l'expression des molécules pouvant activer les MMP, comme la MMP-14 et les membres de la cascade plasminogène/plasmine, est augmentée pendant la phase de dénudation. De façon intéressante, l'induction des inhibiteurs de MMP que sont TIMP-1 et PAI-1 est observée surtout pendant la phase de restauration tissulaire et pourrait alors mettre fin au processus lésionnel tissulaire par l'inhibition directe de la dégradation de la matrice extracellulaire

4. Conclusion

Cette étude apporte un nouvel aperçu du remodelage matriciel colique intervenant après irradiation et y met en lumière le rôle joué par les différentes MMP spécialisées dans la dégradation de la membrane basale.

ORIGINAL ARTICLE

Expression and activation of MMP -2, -3, -9, -14 are induced in rat colon after abdominal X-irradiation

CARINE STRUP-PERROT¹, MARIE-CATHERINE VOZENIN-BROTONS^{1,2}, MARIE VANDAMME¹, MARC BENDERITTER¹ & DENIS MATHE²

¹Laboratoire de Radiopathologie, SRBE/DRPH, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Fontenay-aux-Roses, France, ²Laboratoire UPRES EA, Radiosensibilité des tumeurs et tissus sains, Institut Gustave Roussy Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Villejuif, France

Abstract

Objective. Colonic response to single-dose irradiation is characterized by epithelial denudation followed by restitution. Extracellular matrix (ECM) remodeling is involved in both of these phases. The aim of this study was to characterize the contribution of matrix metalloproteinases (MMPs) and of their stimulatory and inhibitory pathways in radiation-induced ECM remodeling in colonic tissue. **Material and methods.** Rats were irradiated with single-dose 10 Gy X-rays to the abdomen. Activity, localization, and mRNA levels of MMPs and molecules involved in their activation and inhibition (plasmin/plasminogen; TIMPs), of inflammatory mediators (IL-1 β , TNF- α) in the distal colon, 1, 3, and 7 days after irradiation were analyzed using a combination of approaches including zymography, immunohistochemistry, and real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results.** The main finding of this study is that radiation-induced alteration of the mucosal structure is concomitant with local increased expression and activation of MMP subtypes involved in basement membrane degradation (MMP-2, -3, and -9). We investigated MMP-2 activation pathways and found an early increase in mRNA levels of soluble inflammatory mediators (TNF- α and IL-1 β). Furthermore, transcription and activity of MMP-2 activating molecules, such as MMP-14, and molecules involved in the plasminogen/plasmin system were found to increase during the denudation phase. Interestingly, induction of MMP inhibitors TIMP-1 and PAI-1 was observed during the restitution phase. MMP inhibitors may be able to stop acute wound healing response by inhibiting ECM degradation. **Conclusions.** This study brings new insights into ECM remodeling in the colon after exposure to ionizing radiation and highlights the role of MMP subtypes specialized in basement membrane degradation.

Key Words: Colon, cytokines, irradiation, matrix metalloproteinases

Introduction

Radiation proctitis and colitis may be considered as serious side effects of rectal cancer treatment with external beam radiotherapy [1,2]. Around 80% of colon cancer patients actually experience gastrointestinal problems, referred to as acute complications, during their course of radiotherapy, with symptoms ranging from abdominal pain to major hemorrhage, diarrhea, urgency, fecal incontinence, and gastrointestinal perforation. Acute complications associated with alteration of colonic tissue in humans have not been fully characterized but are thought to involve such processes as mucosal barrier break-

down, ulceration, and inflammation [3]. Although these symptoms are usually transient and cease shortly after completion of radiation therapy, changes in the treatment plan may be necessary, which may affect treatment effectiveness. Furthermore, severe acute reactions seem to contribute to the development of chronic radiation toxicity that impairs the patient's quality of life because of its progressive nature and associated long-term morbidity and mortality.

Colon response to radiation injury may be compared to a stress-induced wound healing response as it is primarily characterized by epithelial denudation associated with the remodeling of the extra-

cellular matrix (ECM) and basement membrane. Matrix metalloproteinases (MMPs) have been known to be involved in various pathological conditions and as their main function is the selective degradation of ECM components [4], they have been recognized as key factors in ECM remodeling. These Zn^{2+}/Ca^{2+} -dependent endopeptidases are classified according to their substrate specificity and structural features into gelatinases (MMP-2, -9), stromelysins (MMP-3, -10, -11), elastases (MMP-12), collagenases (MMP-1, -8, -13, -18), matrilysins (MMP-7, -26), and membrane-type MMPs (MMP-14, -15, -16, -17) [4]. MMPs can be transcriptionally activated by soluble mediators. In addition, most MMPs are secreted as zymogens and require proteolytic activation [5]. *In vivo* activation of most pro-MMPs is mediated through the plasminogen-plasmin system or MMPs themselves, with the exception of pro-MMP-2, which is activated mainly by membrane-type MMP-1 (MMP-14) [6]. Lastly, the activity of MMPs is regulated by TIMPs, a family of specific inhibitors which includes four subtypes with intrinsic specificities [7].

Despite their crucial role in the resolution of an acute injury, the involvement of MMPs in the physiopathology of colonic radiation injury has only been partially investigated, and so far most of the studies have focused on gelatinase activation after radiation exposure. Siefert et al. found a prolonged gelatinolytic activity in rat colonic anastomoses after intra-operative irradiation [8]. Two clinical studies reported opposite results concerning gelatinase activity in the rectum after irradiation. Hovdenak et al. observed increased expression of MMP-2 and MMP-9 in the rectal mucosa after completion of radiation therapy [9], while Kumar et al. did not [10].

The aim of this study was to investigate the expression and activity of a broad range of MMP subtypes and those of their stimulators and inhibitors during the acute radiation-induced injury and healing processes. Various approaches, e.g. zymography, immunohistochemistry, and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), were used. Overall, our results show that radiation-induced enhanced expression of MMP-2, -3, -9, and -14 in colonic tissue occurs at a time which coincides with alteration of the mucosal structure. This increased expression is associated with a moderate inflammatory cell infiltration, increased expression of IL-8, a chemokine involved in polynuclear neutrophil infiltration [11], and transient transcriptional induction of the pro-inflammatory mediators TNF- α and IL-1 β , which may be involved in the transcriptional activation of MMPs [12]. Expression of the molecular inhibitors of MMPs, TIMP-1 and PAI-1,

was found to increase some time later, suggesting the presence of an alternate pathway which puts an end to the healing process.

Material and methods

Animals and irradiation conditions

Experiments were performed using male Wistar rats (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) initially weighing between 225 and 250 g. The rats were housed under controlled temperature and lighting conditions, with standard rat chow (Usine d'Alimentation Rationnelle, Epinay-sur-Orge, France) and water provided *ad libitum*. Prior to irradiation, the rats were anesthetized with 2.5% isoflurane administered at a rate of 0.4 l/min (Abbott, Rungis, France). A protective lead screen (5 mm thick) was placed over each animal to cover them from the top of the head to 1 cm below the ribs. The given dose was 10 Gy at a rate of 0.62 Gy/min (Phillips, 250 MeV, 0.2 mm Cu filter). Sham-irradiated rats were placed within the apparatus and anesthetized but not exposed to X-rays. The animals were weighed and food intake was measured 10 days before exposure to radiation and daily during the week following irradiation. All experiments were conducted according to the French regulations on animal experimentation (Ministry of Agriculture, Act N° 87-848, 19 October 1987).

Tissue collection

One, 3 and 7 days after irradiation, the rats were anesthetized and the distal half of the colon was removed before euthanasia and rinsed with sterile physiological saline. The distal colon was cut into equal pieces immediately after resection: tissue samples were formalin-fixed for histology or frozen in liquid nitrogen and crushed to powder for RNA and protein extraction.

Histology

Samples were fixed in 4% formaldehyde solution (Carlo Erba, Rueil Malmaison, France) for 3 days at room temperature. They were then dehydrated, paraffin-embedded, and cut into 4- μ m-thick sections. Slides were stained with hematoxylin, eosin and saffron (HES) for histological analysis.

Immunostaining

MMP and TIMP antibodies were purchased from Chemicon (Euromedex, Mundolschheim, France) and used as follows: anti-MMP-2 (42-5D11, 1:200), anti-MMP-3 (SL-1 IIC4, 1:200), anti-

MMP-14 (113-5B7, 1:500), anti-TIMP-1 (102B1, 1:50), anti-TIMP-2 (67-4H11, 1:1000). The anti-myeloperoxidase antibody was obtained from Novocastra (Tébu, Le Perray en Yvelines, France; NCL MYELOp,1:300).

Following deparaffinization and rehydration, endogenous peroxidase activity was inhibited with 3% hydrogen peroxide in phosphate buffered saline (PBS). In order to detect MMP-3, sections were placed in 0.01 mol/l hot citrate buffer pH 6.0. The protein block serum-free blocking solution from DAKO (DAKO, Trappes, France) was used to inhibit non-specific staining. Primary antibodies were diluted in antibody diluent (DAKO). Antibodies against MMP-2, and TIMP-1 were detected using the LSAB2-HRP system (Dako), whereas antibodies against MMP-3, MMP-14, TIMP-2 and myeloperoxidase were detected using the StrepABC-HRP system (Dako). Immunostaining was revealed using the Vector NovaRED substrate kit for peroxidase (Biovalley, Conches, France, for Vector laboratories, USA). Sections were counterstained with differentiated Mayer's Hemalum (Merck for VWR, Fontenay-sous-bois, France). Slides were rinsed between each stage with Tris HCl-NaCl-Tween (50 mM, 0.3 M, 0.1%). Control staining, without the primary antibody and using an irrelevant mouse IgG, was done concomitantly with each immunostaining to ensure staining specificity. A semiquantitative analysis of MMP-2, MMP-3, MMP-14, TIMP-1, and TIMP-2 expression was performed. Mean staining intensity scores, which reflected staining intensity in the epithelium, lamina propria, submucosa, blood vessels, and muscularis propria, were attributed. The following scoring system was used: (−) no staining, (+) weak staining intensity, (++) moderate staining intensity, (+++) strong staining intensity.

Gelatin zymography

Crushed tissue samples were homogenized in a 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 1% Triton X-100, and protease inhibitors (Sigma-reverse Aldrich, St Quentin Fallavier, France), and centrifuged at 10,000 rpm, at 4°C for 10 min. Supernatants were collected and protein concentrations were determined according to the Lowry method.

Zymography was performed as previously described [13]. Briefly, samples (4 µg protein) and MMP-2/9 standards (CC073 Chemicon, Euromedex, Mundolsheim, France) were separated by electrophoresis on 8% SDS-polyacrylamide gel copolymerized with 1 mg/ml gelatin (Type A from porcine skin; Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier,

France). Gels were washed in 2.5% Triton X-100, incubated in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 5 mM CaCl₂ 2H₂O, 50 mM NaCl, 0.01% Brij 35, and 0.02% NaN₃ at 37°C, stained with 0.5% Coomassie blue in 25% isopropanol/10% acetic acid and destained in a 10% methanol and 10% acetic acid solution. Gelatinolytic bands appeared as clear zones against the blue background. Gelatinases were identified by their molecular weight and by their inhibition using 20 mM EDTA or 1 mM o-phenanthroline. Densitometric analyses were performed using an imaging workstation from Biocom (Les Ulis, France) interfaced with the Phoretix image analysis software (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK).

RNA extraction and quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from crushed tissue samples by homogenization in 4 M guanidine isothiocyanate, purified using the method of Chomczynski and Sacchi and quantified by spectrophotometry (A260/A280). RNA was treated with RNase-free DNase (0.5 unit/µl) to remove contaminating genomic DNA. RNA integrity was assessed by denaturing agarose gel electrophoresis and staining with ethidium bromide.

Real-time RT-PCR was used to quantify levels of MMP-2, -3, -9, -14, TIMP-1, -2, plasminogen, U-PA, t-PA, PAI-1, IL-8, IL1-β and TNF-α RNA transcripts, as already described. Primers were generated with the Primer Express software (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and purchased from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France) (Table I). The purity of each PCR product was checked by analyzing the amplification plot and dissociation curve. 18 S was used as endogenous control and relative mRNA quantitation was performed by using the comparative $\Delta\Delta^{CT}$ [14].

Statistical analysis

Each real-time RT-PCR was done in 6 animals and results were expressed as means of 6 values \pm SEM, for 6 animals. An ANOVA and the Student-Newman-Keuls test were used to determine whether the difference between values obtained with the control group and the irradiated group was statistically significant.

Results

Abdominal 10-Gy X-irradiation was found to induce inhibition of food intake and subsequent decrease in body-weight. Diarrhea was observed between day 3 and day 5 after irradiation.

Table I. Primers used for real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).

MMP-2 forward primer	5'-ACCGTCGCCATCATCAA-3'
MMP-2 reverse primer	5'-CCTTCAGCACAAAGAGGTTGC-3'
MMP-3 forward primer	not communicated by Applied biosystems
MMP-3 reverse primer	not communicated by Applied biosystems
MMP-9 forward primer	5'-TGTCCAGACCAAGGGTACAGC-3'
MMP-9 reverse primer	5'-GAAGAATGATCTAAGCCCAGCG-3'
MMP-14 forward primer	5'-GAGGGTCATGAGAAGCAGGC-3'
MMP-14 reverse primer	5'-TCAAAGGGTGTGCTGTTCG-3'
TIMP-1 forward primer	5'-AGAAGGGCTACCAGAGCGATC-3'
TIMP-1 reverse primer	5'-ATCGAGACCCCAAGGTATTGC-3'
TIMP-2 forward primer	5'-CTACATCTCCTCCCCGATGA-3'
TIMP-2 reverse primer	5'-GGTGCCCATTTGATGCTCTTC-3'
Plasminogen forward primer	5'-CTGAGTATCTAAACAACAGAGTCAAATCC-3'
Plasminogen reverse primer	5'-TCGAAGCAAACCAGAGGTCC-3'
PAI-1 forward primer	5'-ATGGCTCAGAACAACAAGTTCAAC-3'
PAI-1 reverse primer	5'-CAGTTCAGGATGTCGTACTCG-3'
t-PA forward primer	5'-GACGTGAAGCCCTGGTGC-3'
t-PA reverse primer	5'-CAAGCCGGCGTGCTG-3'
U-PA forward primer	5'-GTTTGAGGTGGAGCAGCTCAT-3'
U-PA reverse primer	5'-GCTATGTCATTATGGAAGGCCAG-3'
TNF- α forward primer	5'-ATCCGAGATGTGGAAGTGGC-3'
TNF- α reverse primer	5'-CGATCACCCCGAAGTTCAGTA-3'
IL-8 forward primer	5'-GACTGTTGTGGCCCGTGAG-3'
IL-8 reverse primer	5'-CCGTCAAGCTCTGGATGTTCT-3'
IL-1 β forward primer	5'-CAACAAAATGCCTCGTGC-3'
IL-1 β reverse primer	5'-TGCTGATGTACCAGTTGGG-3'

Irradiation alters the structure of colonic tissue

Histopathological findings showed alterations in the distal colon wall after irradiation (Figure 1) which were consistent with those reported in previous studies. No marked changes in the tissue structure were observed one day after irradiation, while microphotographs showed a marked dilation of the crypts, as well as an absence of mucus secretion 3 days after radiation exposure. The muscle layers appeared normal compared with those of controls. Seven days after irradiation, a global regeneration of the colonic epithelium was observed along with an important increase in the thickness of the mucosa, the number of epithelial cells had increased, and some crypts were still dilated.

Irradiation increases neutrophil infiltration and expression of inflammatory factors

Abdominal irradiation induced an inflammatory response, which was characterized by increased expression of TNF- α and IL-1 β on day 3 after irradiation, a 5-fold ($p < 0.01$) and 3-fold ($p < 0.05$)

increase, respectively (Figure 2a). mRNA levels of IL-8, a major chemoattractant for PNN, were unchanged at day 1, but a 15-fold ($p < 0.01$) increase and a 4-fold ($p < 0.01$) increase were found at day 3 and day 7 after irradiation, respectively. Neutrophil infiltration was increased at day 1 as shown by myeloperoxidase staining, although moderately (Figure 2b).

Irradiation increases expression and activity of MMPs

Gelatin zymography allowed detection of both active and proforms of gelatinases (Figure 3a). In the distal colon of control rats, both the proform (72 kDa) and the active form (62 kDa) of MMP-2 were detected; the active form of MMP-2 accounted for 21% of the detected MMP-2. A marked increase in the level of total MMP-2, i.e. 315%, 390%, and 259%, was observed on day 1, 3, and 7 after radiation exposure, respectively. Levels of the active form of MMP-2 were found to increase by 234% at day 1, 545% at day 3, and 326% at day 7 (Figure 3b). MMP-9 (92 kDa) could not be detected in control colon, but increased MMP-9 levels were observed in most rats (4/6) on day 1 (Figure 3a). Gelatinolytic

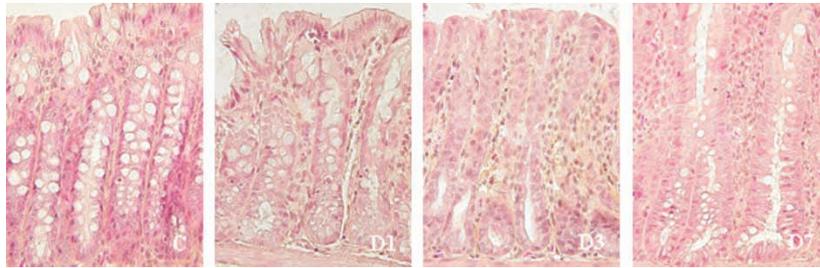


Figure 1. Effect of a 10-Gy abdominal X-irradiation on colonic histology. Colonic structure before and after 1 (D1), 3 (D3), and 7 (D7) days lower hemi-body X-irradiation. Magnification $\times 400$.

activities at high molecular weights, which were completely inhibited by EDTA or phenanthroline, may correspond to MMP-9 dimers or MMP-9 complexed with lipocalin.

A significant increase in MMP-2 mRNA levels was likewise induced by abdominal X-irradiation

at days 1, 3, and 7 (4-fold, $p < 0.001$, 3.5-fold, $p < 0.001$, and 1.6-fold increase, $p < 0.01$, respectively). MMP-9 levels, however, were unchanged at day 1, and increased at days 3 and day 7 (3-fold, $p < 0.05$, and 5.6-fold increase, $p < 0.001$, respectively). MMP-14 mRNA levels were moderately increased

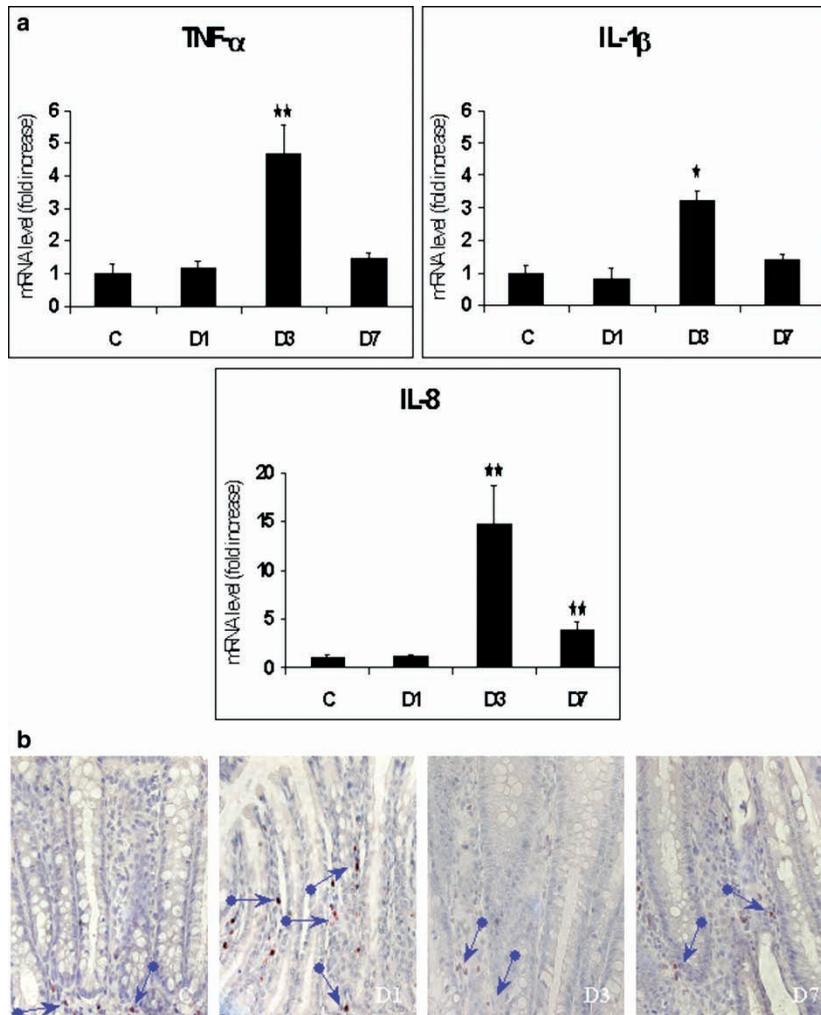


Figure 2. Radiation-induced inflammation. (a) IL- β TNF- α and IL-8 mRNA levels in colons from control rats (C) or from rat 1 (D1), 3 (D3), and 7 (D7) days after irradiation. Results are expressed as means \pm SEM (standard error of the mean); $n = 6$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (b) Immunostaining for myeloperoxidase-positive cells in the colon from control rats (C) or from rats 1 (D1), 3 (D3), and 7 (D7) days after irradiation. Magnification $\times 400$.

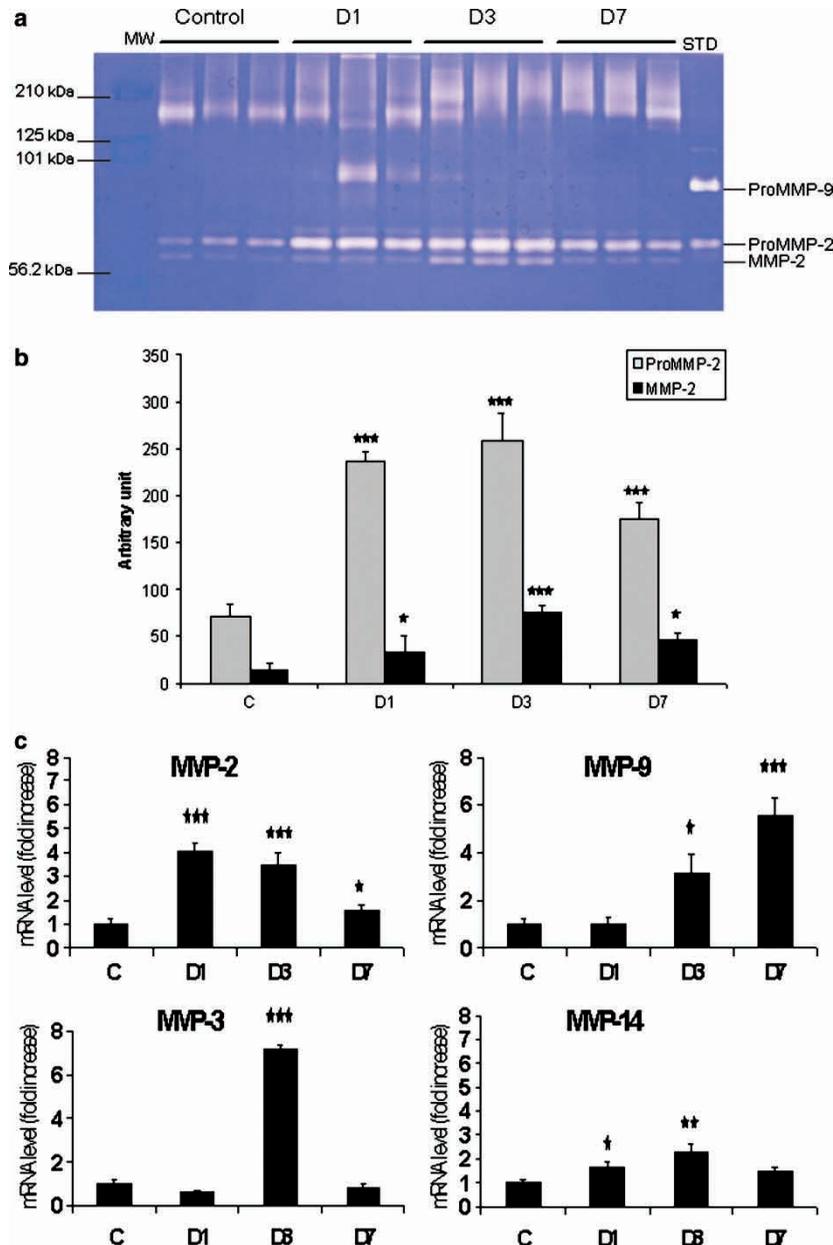


Figure 3. Effect of a 10-Gy abdominal X-irradiation on colonic matrix metalloproteinase (MMP) activities. (a) Study of gelatinase activities by zymography. Lane STD shows MMP-2 and MMP-9 standards, lanes 2–4 show basal activities in distal colon of control rats (C), lanes 5–7 show activities from rats 1 (D1), lane 8–10 show activities from rats 3 (D3), lanes 11–13 show activities from rats 7 (D7) days after irradiation. (b) Densitometric analysis of zymography. Results are expressed as means \pm SEM (standard error of the mean); ($n=6$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (c) Analysis of MMP-2, MMP-3, MMP-9, and MMP-14 gene expression. mRNA levels were measured by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in distal colon from control rats (C) or from rats 1 (D1), 3 (D3), and 7 (D7) days after irradiation. Results are expressed as means \pm SEM; ($n=6$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

on day 1 after irradiation (1.7-fold, $p < 0.05$), and enhanced by 2.3-fold, $p < 0.01$ on day 3, whereas MMP-3 expression was increased (7-fold) only on day 3. (Figure 3c).

Localization of MMPs after irradiation

Representative immunohistochemical staining patterns of MMP-2, -3, and -14 in control and irradiated samples are shown in Figure 4a and the

labeling score is presented in Figure 4b. In control colon samples, MMP-2 staining was observed in some smooth muscle cells and in the cells at the neck of the crypts (Figure 4a). One day after irradiation, staining intensity increased, particularly in smooth muscle and epithelial cells. On day 3, MMP-2 staining was even more intense and localized to the myofibroblasts of the pericryptal sheath and to the lamina propria. At day 7, MMP-2 staining was less intense than at day 3 but still stronger than in control

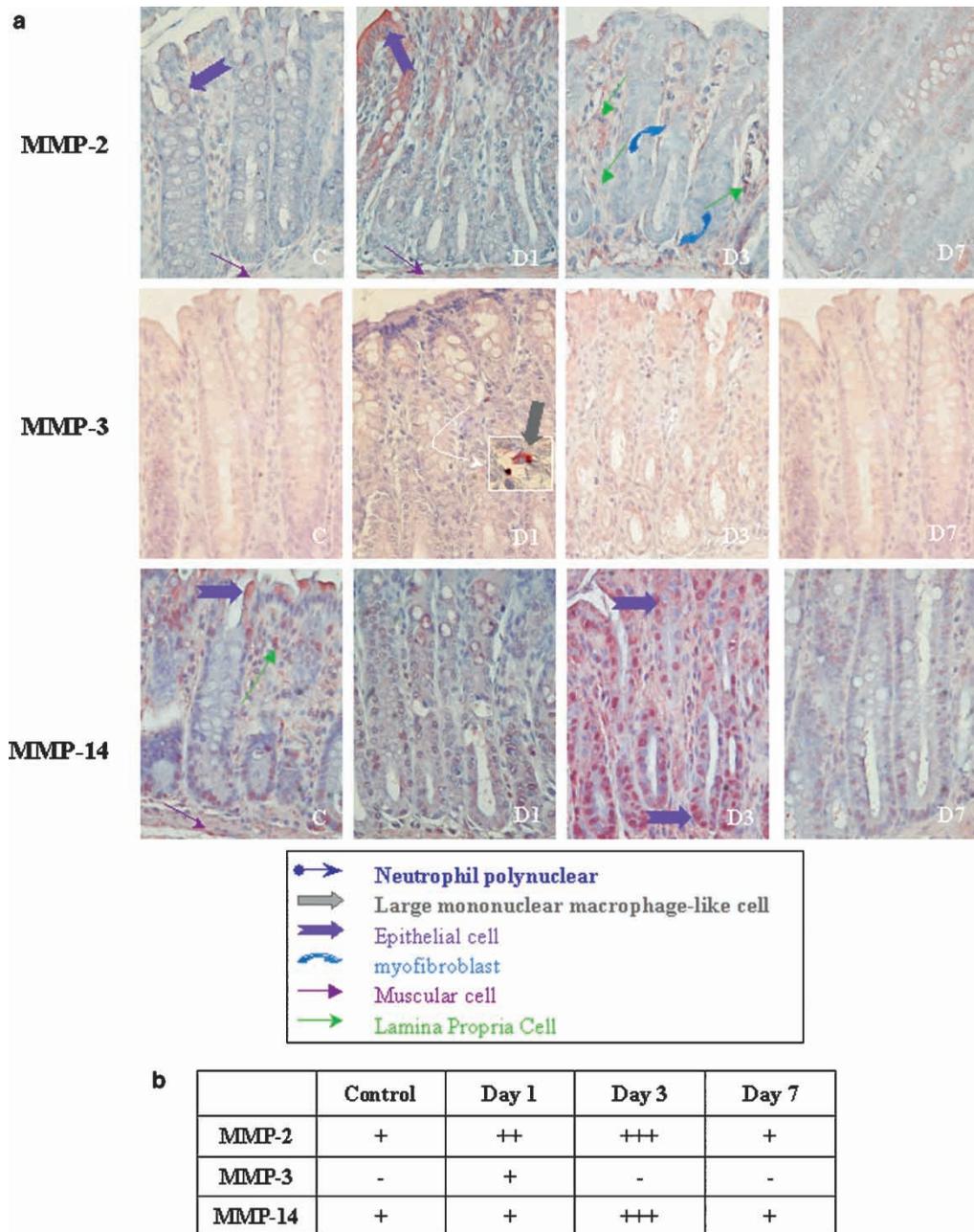


Figure 4. Effect of a 10-Gy abdominal X-irradiation on colonic expression of gelatinase A and other metalloproteinases (MMPs). (a) MMP-2, MMP-3, and MMP-14 immunostaining: MMP-2 staining was seen in control rats (C, $\times 400$), especially in cells at the neck of the crypts and in smooth muscle cells. At day 1 (D1, $\times 400$), MMP-2 staining intensity was relatively increased in smooth muscle cells and in epithelial cells. At day 3 (D3, $\times 400$), staining was more intense and localized to the myofibroblasts of the pericryptal sheath and cells of the lamina propria. At day 7 (D7, $\times 400$), staining was slightly more intense than that observed with control samples and found in smooth muscle cells and epithelial cells in the crypts. No MMP-3 staining was observed in the colon of control rats (C, $\times 400$); however, large mononuclear macrophage-like cells were stained at day 1 after exposure (D1, $\times 400$ and $\times 1000$). There was no staining at days 3 and 7. MMP-14 staining in inflammatory cells of the lamina propria, smooth muscle cells, and epithelial cells at the neck of the crypts was observed in control rats (C, $\times 400$). No significant modification in the MMP-14 staining pattern was found in the bowel of irradiated rats at day 1 (D1, $\times 400$), and at day 3, all tissue layers were stained (D3, $\times 400$). At day 7 (D7, $\times 400$), staining was equivalent to that of control samples. (b) Labeling score for MMP-2, MMP-3 and MMP-14 immunostaining: (-) no staining, (+) weak staining intensity, (++) moderate staining intensity, (+++) strong staining intensity.

samples. No MMP-3 immunostaining was observed in colon samples from control rats, but intense staining was observed in only a few mononuclear infiltrating cells with a macrophage morphology on

day 1 after exposure (Figure 4a). No staining was observed at day 3, and at day 7. In control distal colon, moderate MMP-14 staining was observed in smooth muscle cells, in a few inflammatory cells of

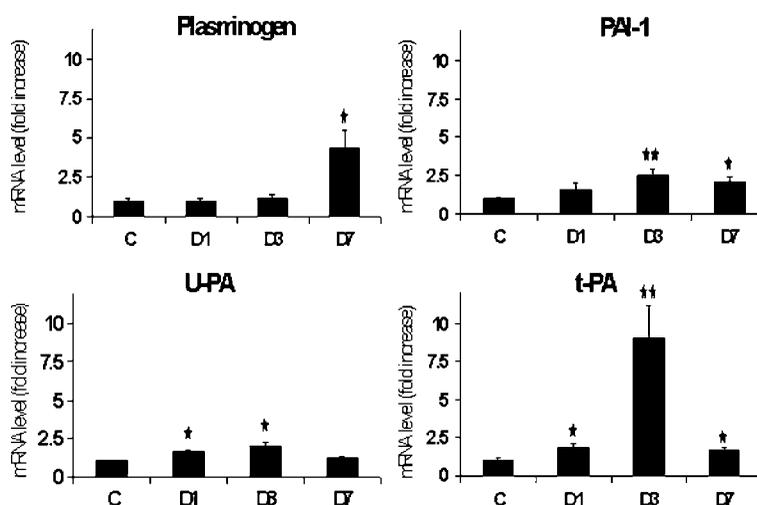


Figure 5. Effect of a 10-Gy abdominal X-irradiation on the colonic levels of plasminogen, U-PA, t-PA, and PAI-1 mRNA. Gene expressions of plasminogen U-PA, t-PA, and PAI-1 were determined by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in the distal colon from control rats (C), or from rat 1 (D1), 3 (D3), and 7 (D7) days after irradiation. Results are expressed as means \pm SEM (standard error of the mean); ($n=6$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

the lamina propria, and in cells at the neck of the crypts (Figure 4a). No significant change in MMP-14 staining was observed after irradiation at day 1, but at day 3, staining increased and was detected in all tissue layers. Staining pattern on day 7 was similar to that in control samples.

Expression of activators and inhibitors of MMPs

The plasmin-plasminogen system is a primary activator of MMPs. Irradiation induced a significant increase in plasminogen mRNA at day 7 only (4.3-fold increase, $p < 0.05$) (Figure 5). Expression of the urokinase-type plasminogen activator (U-PA) was moderately increased at days 1 and 3 (1.7-fold, $p < 0.01$, and 2-fold increase, $p < 0.05$, respectively) (Figure 5), while the tissue-type plasminogen activator (t-PA) increased from day 1 (1.9-fold increase, $p < 0.05$) to day 7 (1.7-fold increase, $p < 0.05$) with a peak at day 3 (9.1-fold increase, $p < 0.01$) (Figure 5). A smaller increase was observed with the inhibitor PAI-1: 2.5-fold increase ($p < 0.01$) at day 3, and 2.1-fold increase ($p < 0.05$) at day 7 (Figure 5).

Regulation of MMP activity is affected by TIMPs. TIMP-1 mRNA levels were found to increase from day 1 to day 7, i.e. a 2-fold increase was seen at day 1 ($p < 0.05$), a 3-fold increase ($p < 0.01$) at day 3, and a 1.5-fold increase at day 7 ($p < 0.05$) (Figure 6a). Levels of TIMP-2 mRNA, on the other hand, remained almost unchanged after irradiation (Figure 6a). Changes in the expression of TIMP-1 and TIMP-2 were confirmed by immunological studies (Figure 6b and 6c). In control distal colon, weak TIMP-1 staining was localized to smooth muscle cells and a few epithelial cells in the crypts. One day

after irradiation, TIMP-1 staining increased in epithelial and smooth muscle cells, while at day 3, staining was observed in all tissue layers. At day 7, the staining was similar to that observed in control colon. Very weak TIMP-2 staining was found in colonic smooth muscle cells. A slight increase in TIMP-2 staining, mainly in smooth muscle cells and colonocytes, was detected on day 1 and day 3 after irradiation, while at day 7, staining was the same as that in control samples.

Discussion

ECM remodeling activated after intestinal exposure to radiation has only been partially investigated. However, a better understanding of the molecular balance between matrix synthesis and degradation is warranted to define new prophylactic measures against acute intestinal toxicity after radiation therapy. For ethical reasons, human studies could never be completed. The development of animal models is therefore necessary. We used an experimental model of single-dose abdominal irradiation and the aim was to characterize the contribution of MMPs to ECM remodeling, which is acutely activated after radiation injury to the colon. Our results show that radiation-induced ECM remodeling is restricted to the colonic mucosa. This is consistent with the fact that a subgroup of MMPs, able to promote basement membrane degradation (gelatinases, MMP-14 and MMP-3), was mainly activated after irradiation. This activation was associated with an increase in the mRNA levels of pro-inflammatory cytokines and molecules involved in

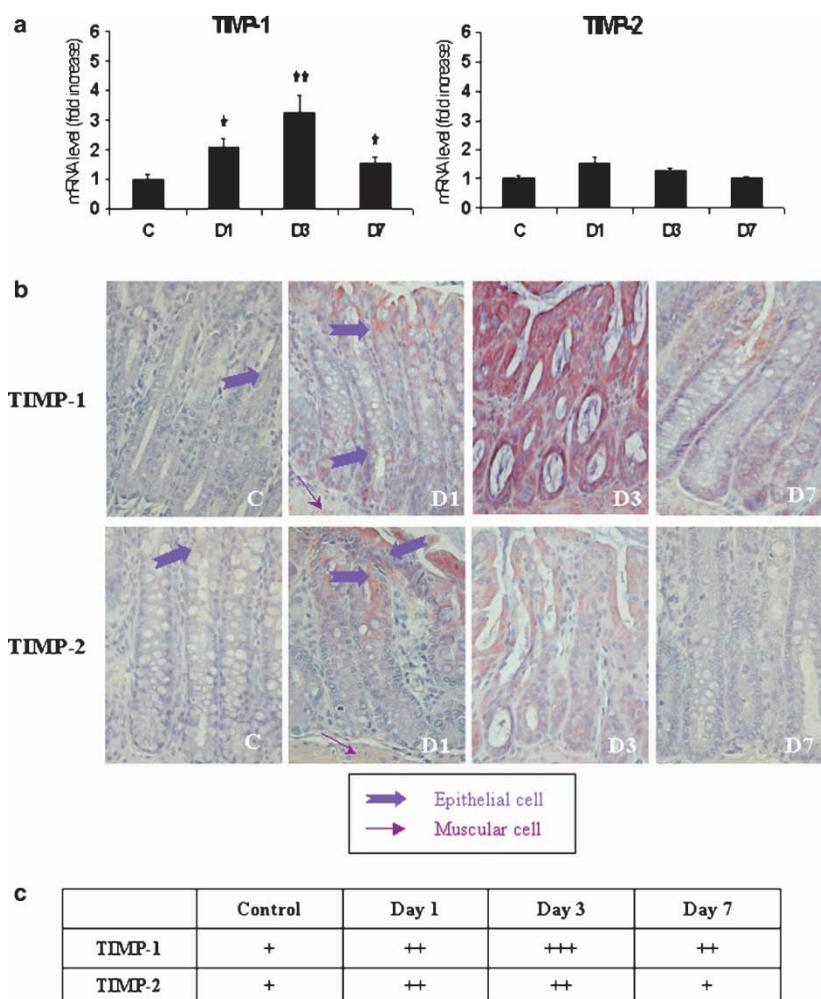


Figure 6. Effect of 10-Gy abdominal X-irradiation on TIMP-1 and TIMP-2 expression in the colon. (a) TIMP-1 and TIMP-2 mRNA levels. Gene expressions of TIMP-1 and TIMP-2 were determined by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in the distal colon from control rats (C), or from rat 1 (D1), 3 (D3), and 7 (D7) days after irradiation. Results are expressed as means \pm SEM (standard error of the mean); ($n = 6$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (b) TIMP-1 and TIMP-2 immunostaining and labeling score: weak staining in the inflammatory cells of the lamina propria, smooth muscle cells, and some rare epithelial cells of the crypt was seen in control rats (C, $\times 400$). At day 1 (D1, $\times 400$), TIMP-1 staining was found in epithelial cells and in smooth muscle cells. At day 3 (D3, $\times 400$), staining spread over the tissue layers. At day 7 (D7, $\times 400$), staining was equivalent to that observed in control colons. Very weak TIMP-2 staining was seen in smooth muscle cells in control colons (C, $\times 400$). At day 1 (D1, $\times 400$), a slight increase in the staining of smooth muscle cells and a weak staining of epithelial cells were observed in the colons of irradiated rats at day 3 (D3, $\times 400$). At day 7 (D7, $\times 400$), the staining pattern was equivalent to that of controls. (c) Labeling score for TIMP-1 and TIMP-2 immunostaining: (–) no staining, (+) weak staining intensity, (++) moderate staining intensity, (+++) strong staining intensity.

the plasmin-plasminogen system. Basement membrane degradation inhibitors (TIMP-1, PAI-1) were, on the other hand, activated later.

Our results show that ionizing radiation induces a deep alteration of the colonic mucosa 3 days after irradiation and an increase in the level of MMPs involved in basement membrane degradation, which occurs earlier. Irradiation actually induces both a transcriptional and a proteolytic activation of MMP-2, mainly observed in subepithelial myofibroblasts and epithelial cells. Some of the molecular factors involved in MMP-2 activation were therefore investigated. We found an increase in TNF- α and IL-1 β mRNA 3 days after irradiation. The acute peak in

MMP-2 mRNA levels observed at day 1 is independent of the delayed increase in TNF- α and IL-1 β mRNA but may be related to an early release of pro-inflammatory cytokines, as previously described in the irradiated ileum [15], owing to degranulation of mast cells, for instance [16]. This second inflammatory response may, however, contribute to the sustained activation of MMP-2. Other activators of MMP-2, i.e. the plasminogen-plasmin system and MMP-14 [4,6], were then investigated. Expression of both activators was found to increase in the irradiated colon. Activation of the plasminogen-plasmin system is consistent with the previous findings of Rao et al. [17], Boothman et al. [18],

and Sawaya et al. [19], who showed a radiation-induced increase in fibrinolysis in the intestinal mucosa. MMP-14 has been reported to mediate MMP-2 activation in cooperation with TIMP-2 [6]. Although TIMP-2 induction was not observed, we found an early increase in MMP-14 one day after irradiation. Furthermore, MMP-14:TIMP-2 and MMP-2:TIMP-2 ratios were still in favor of pro-MMP-2 activation. This suggests that the MMP-14/TIMP-2/proMMP-2 complex is involved in this early increase in the active form of MMP-2, as assessed by gelatin substrate zymography.

Increased MMP-3 expression was transiently and specifically observed in infiltrating macrophages in the mucosa one day after irradiation, as already reported in inflamed gut samples from Crohn's disease or inflammatory bowel disease [20–24]. Increased amounts (day 1) and increased mRNA levels (days 3 and 7) of MMP-9 could result, respectively, from neutrophil infiltration and actions of IL-1 β and TNF- α [25], of which the mRNA levels were increased at the same times. The activation of MMP-9 in irradiated rat colon is in agreement with previous observations in chemically inflamed rat colon [26] or in irradiated human rectum [9,10].

In order to have a complete view of ECM remodeling in the irradiated colon, we investigated the expression of physiological inhibitors of MMPs, i.e. TIMP-1, TIMP-2, and PAI-1. We found a slight increase in TIMP-1 and PAI-1 expression 3 and 7 days after irradiation, while TIMP-2 expression was not modified. This delayed induction suggests that tissue response to single-dose ionizing radiation follows a scheme similar to that of wound healing, with an acute response at day 1, which promotes ECM degradation, and a restitution phase at day 7, in which ECM degradation is inhibited. Altering the balance between ECM synthesis and degradation could thereby lead to normal wound healing or the development of fibrosis.

In conclusion, the reported observations bring new insights into the process of acute radiation-induced ECM remodeling in the colon. We showed that colonic response to ionizing radiation relies mainly on MMPs that are able to degrade basement membrane. The molecular cascades induced by ionizing radiation are, however, complex and involve more molecules than those studied here.

References

[1] Hauer-Jensen M, Wang J, Denham JW. Bowel injury: current and evolving management strategies. *Semin Radiat Oncol* 2003;13:357–71.

[2] Denton AS, Andreyev HJ, Forbes A, Maher EJ. Systematic review for non-surgical interventions for the management of late radiation proctitis. *Br J Cancer* 2002;87:134–43.

[3] Hovdenak N, Fajardo LF, Hauer-Jensen M. Acute radiation proctitis: a sequential clinicopathologic study during pelvic radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:1111–7.

[4] Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463–516.

[5] Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491–4.

[6] Wang Z, Juttermann R, Soloway PD. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 *in vivo*. *J Biol Chem* 2000;275:26411–5.

[7] Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002;115:3719–27.

[8] Seifert WF, Wobbles T, Hoogenhout J, de Man BM, Hendriks T. Intra-operative irradiation prolongs the presence of matrix metalloproteinase activity in large bowel anastomoses of the rat. *Radiat Res* 1997;147:354–61.

[9] Hovdenak N, Wang J, Sung CC, Kelly T, Fajardo LF, Hauer-Jensen M. Clinical significance of increased gelatinolytic activity in the rectal mucosa during external beam radiation therapy of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;53:919–27.

[10] Kumar A, Collins HM, Scholefield JH, Watson SA. Increased type-IV collagenase (MMP-2 and MMP-9) activity following preoperative radiotherapy in rectal cancer. *Br J Cancer* 2000;82:960–5.

[11] Raab Y, Gerdin B, Ahlstedt S, Hallgren R. Neutrophil mucosal involvement is accompanied by enhanced local production of interleukin-8 in ulcerative colitis. *Gut* 1993;34:1203–6.

[12] Rogler G, Gelbmann CM, Vogl D, Brunner M, Scholmerich J, Falk W, et al. Differential activation of cytokine secretion in primary human colonic fibroblast/myofibroblast cultures. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:389–98.

[13] Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994;218:325–9.

[14] Strup-Perrot C, Mathe D, Linard C, Violot D, Milliat F, Francois A, et al. Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G875–85.

[15] Linard C, Ropenga A, Vozenin-Brottons MC, Chapel A, Mathe D. Abdominal irradiation increases inflammatory cytokine expression and activates NF- κ B in rat ileal muscularis layer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G556–65.

[16] MacNaughton WK, Leach KE, Prud'homme-Lalonde L, Ho W, Sharkey KA. Ionizing radiation reduces neurally evoked electrolyte transport in rat ileum through a mast cell-dependent mechanism. *Gastroenterology* 1994;106:324–35.

[17] Rao JS, Rayford A, Yamamoto M, Ang KK, Tofilon P, Sawaya R. Modulation of fibrinolysis by ionizing radiation. *J Neurooncol* 1994;22:161–71.

[18] Boothman DA, Wang M, Lee SW. Induction of tissue-type plasminogen activator by ionizing radiation in human malignant melanoma cells. *Cancer Res* 1991;51:5587–95.

[19] Sawaya R, Rayford A, Kono S, Ang KK, Feng Y, Stephens LC, et al. Elevated levels of plasminogen activators in the pathogenesis of delayed radiation damage in rat cervical spinal cord *in vivo*. *Radiat Res* 1994;138:386–91.

[20] Bailey CJ, Hembry RM, Alexander A, Irving MH, Grant ME, Shuttleworth CA. Distribution of the matrix metalloproteinases stromelysin, gelatinases A and B, collagenase

- in Crohn's disease and normal intestine. *J Clin Pathol* 1994; 47:113–6.
- [21] Baugh MD, Perry MJ, Hollander AP, Davies DR, Cross SS, Lobo AJ, et al. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1999;117: 814–22.
- [22] Heuschkel RB, MacDonald TT, Monteleone G, Bajaj-Elliott M, Smith JA, Pender SL. Imbalance of stromelysin-1 and TIMP-1 in the mucosal lesions of children with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000;47:57–62.
- [23] Louis E, Ribbens C, Godon A, Franchimont D, De Groote D, Hardy N, et al. Increased production of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by inflamed mucosa in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2000;120:241–6.
- [24] Saarialho-Kere UK, Vaalamo M, Puolakkainen P, Airola K, Parks WC, Karjalainen-Lindsberg ML. Enhanced expression of matrilysin, collagenase, and stromelysin-1 in gastrointestinal ulcers. *Am J Pathol* 1996;148:519–26.
- [25] Eberhardt W, Huwiler A, Beck KF, Walpen S, Pfeilschifter J. Amplification of IL-1 eta-induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF-kappa B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways. *J Immunol* 2000;165: 5788–97.
- [26] Medina C, Videla S, Radomski A, Radomski MW, Antolin M, Guarner F, et al. Increased activity and expression of matrix metalloproteinase-9 in a rat model of distal colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G116–22.

Les résultats des travaux que nous avons menés et qui ont été présentés, montrent que l'exposition aux rayonnements ionisants, concomitamment à l'apparition de lésions tissulaires, module l'expression génique et protéique des gènes codant pour les MMP, les TIMP et les acteurs associés au remodelage que sont les gènes du système plasminogène/plasmine. Ils indiquent en outre que la résultante nette de la balance existant entre dégradation de la matrice extracellulaire et accumulation des constituants matriciels est en faveur de la dégradation un et trois jours après irradiation, facilitant ainsi le remodelage et la restitution tissulaire, et tendrait à revenir à l'équilibre sept jours après l'exposition, mettant ainsi un terme à la restauration tissulaire. Nos études montrent par ailleurs la participation des cellules épithéliales, inflammatoires et mésenchymateuses au processus de remodelage post radique. L'utilisation d'un inhibiteur de MMP a permis de mettre en évidence que ces enzymes sont des acteurs clef du remodelage post radique.

Par contre, nos observations ont mis en lumière des différences significatives par rapport à celles qui ont été réalisées par différents groupes sur les maladies inflammatoires intestinales. En effet nous avons montré que les MMP-1, -3 et -9 ne semblent pas être les MMP clefs du remodelage postradique aigu alors que leur implication dans les lésions tissulaires observées dans les maladies digestives inflammatoires est clairement démontrée. Nos travaux montrant la disparition radio-induite des lymphocytes CD8 disculpent de la même manière ces cellules de toute implication directe dans les lésions tissulaires radio-induites observées, alors qu'il est maintenant établi que le lymphocyte T est la cellule clef responsable des lésions muqueuses observées dans les pathologies inflammatoires intestinales.

Si l'exposition à une dose unique de 10 Gy du compartiment intestinal ne semble pas avoir de conséquences tissulaires et fonctionnelles tardives, ce n'est pas le cas des expositions radio thérapeutiques abdomino-pelviennes. En effets ces expositions peuvent donner lieu à des effets aigus immédiats mais aussi à des effets tardifs, cliniquement très importants à cause de leur chronicité, de la morbidité et de la

mortalité qu'ils engendrent. La complication tardive la plus fréquente est l'entérite radique, caractérisée par une fibrose transmurale sévère associée à une activation des cellules mésenchymateuses, une désorganisation tissulaire et un dépôt de collagène fibrillaire. Cette fibrose incrimine dans sa genèse et de façon dogmatique les MMP et les cellules mésenchymateuses. Pour étudier les mécanismes impliqués dans l'accumulation pathologique de matrice extracellulaire, nous avons analysé l'expression génique *in situ* des composants matriciels et des gènes impliqués dans le remodelage matriciel que sont les MMP et les TIMP, à partir de prélèvements provenant de patients présentant une entérite radique. Des travaux antérieurs ont montrés qu'au cours du processus fibrogénique, les fonctions intestinales sont fortement altérées en raison d'une dysmotilité [Husebye *et al.* 1994] à laquelle s'ajoute un dépôt transmurale excessif de collagène sécrété par les myofibroblastes subépithéliaux de fibrose et les cellules musculaires lisses [Vozenin-Brotons *et al.* 2003]]. Des travaux récents menés au laboratoire ayant montré que le phénotype de ces cellules musculaires lisses, agents clefs du renouvellement matriciel, est altéré dans l'entérite radique [Bourgier *et al.*], nous avons mis en place une stratégie expérimentale visant à analyser leur capacité de production de MMP et de TIMP.

V. Article III : Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs and TIMPs in late radiation enteritis.

Carine Strup-Perrot, Denis Mathé, Christine Linard, Dominique Violot, Fabien Millat, Agnès François, Jean Bourhis, et Marie-Catherine Vozenin-Brotons.

Le profil d'expression génique globale révèle une augmentation des taux des ARNm codant pour les collagènes, les MMP et les TIMP dans l'entérite radique.

1. But de ce travail :

L'entérite radique, une complication tardive des radiothérapies des cancers abdomino-pelviens, est caractérisée par une fibrose transmurale sévère associée à une activation des cellules mésenchymateuses, une désorganisation tissulaire et un dépôt de collagène fibrillaire. Pour étudier les mécanismes impliqués dans l'accumulation pathologique de matrice extracellulaire, nous avons analysé l'expression génique des composants matriciels et des gènes impliqués dans le remodelage matriciel que sont les MMP et les TIMP.

2. Méthodologie :

Les techniques de Macro Array, de RT-PCR quantitative en temps réel, de zymographie gélatine et d'immunohistochimie ont été mises en œuvre pour caractériser le profil d'expression génique *in situ*, l'activité et la localisation tissulaire des gènes liés à la matrice extracellulaire, dans les iléons provenant de patients présentant une entérite radique par rapport à des iléons sains.

3. Résultats :

L'analyse du macro array révèle une forte induction des gènes codant pour les *collagènes I, III, IV, VI et VIII, SPARC* et la *tenascine-C*, les enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire (*MMP-1, -2, -3, -14, -18+19*), les inhibiteurs de ces metalloprotéases (*TIMP-1, -2 et PAI-1*) dans l'entérite radique. Cette augmentation est positivement corrélée au degré d'infiltration de la muqueuse par des cellules inflammatoires, et à la présence de cellules mésenchymateuses différenciées dans sous-muqueuse et la musculature. Malgré l'augmentation simultanée de l'expression des collagènes, des MMP et des TIMP, la quantification du dépôt de collagène montre une accumulation globale de collagène.

4. Conclusion

Nos résultats indiquent que les tissus provenant d'entérites radiques tardives, sont soumis à un processus actif de fibrogénèse mais aussi de fibrolyse, mais dont le résultat net est en faveur de la fibrogénèse. Ces travaux démontrent que les tissus fibrotiques sont soumis à un renouvellement constant et non pas figés comme ils l'ont été longtemps considérés.

Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis

Carine Strup-Perrot,^{1,2} Denis Mathé,^{1,2} Christine Linard,² Dominique Violot,¹ Fabien Milliat,^{1,2} Agnès François,^{1,2} Jean Bourhis,^{1,3} and Marie-Catherine Vozenin-Brotans^{1,2}

¹Laboratoire UPRES EA 27-10 "Radiosensibilité des tumeurs et tissus sains," Institut Gustave Roussy/ Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, 94805 Villejuif; ²Laboratoire d'étude des pathologies radio-induites, Service de Radioprotection Radiobiologie et Epidémiologie, Direction de la Radioprotection de l'Homme, Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, 92265 Fontenay-aux-Roses; and ³Radiation Oncology Department, Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France

Submitted 25 February 2004; accepted in final form 1 June 2004

Strup-Perrot, Carine, Denis Mathé, Christine Linard, Dominique Violot, Fabien Milliat, Agnès François, Jean Bourhis and Marie-Catherine Vozenin-Brotans. Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G875–G885, 2004. First published June 3, 2004; 10.1152/ajpgi.00088.2004.—Radiation enteritis, a common complication of radiation therapy for abdominal and pelvic cancers, is characterized by severe transmural fibrosis associated with mesenchymal cell activation, tissue disorganization, and deposition of fibrillar collagen. To investigate the mechanisms involved in this pathological accumulation of extracellular matrix, we studied gene expression of matrix components along with that of genes involved in matrix remodeling, matrix metalloproteinases (MMPs), and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). Hybrid selection on high-density cDNA array, real-time RT-PCR, gelatin zymography and immunohistochemistry were used to characterize the mRNA expression profile, activity, and tissue location of extracellular matrix-related genes in radiation enteritis compared with healthy ileum. cDNA array analysis revealed a strong induction of genes coding for collagens I, III, IV, VI, and VIII, SPARC, and tenascin-C, extracellular-matrix degrading enzymes (MMP-1, -2, -3, -14, -18+19), and metalloproteinase inhibitors (TIMP-1, -2, plasminogen activator inhibitor-1) in radiation enteritis. This increase was correlated with the degree of infiltration of the mucosa by inflammatory cells, and the presence of differentiated mesenchymal cells in the submucosa and muscularis propria. Despite the fact that expression of collagens, MMPs, and TIMPs simultaneously increase, quantification of net collagen deposition shows an overall accumulation of collagen. Our results indicate that late radiation enteritis tissues are subjected to active process of fibrogenesis as well as fibrolysis, with a balance toward fibrogenesis. This demonstrates that established fibrotic tissue is not scarred fixed tissue but is subjected to a dynamic remodeling process.

fibrosis; radiation therapy; ileum; cDNA array; extracellular matrix

PELVIC RADIATION THERAPY IS frequently associated with normal intestinal tissue toxicity, which may result in the development of progressive fibrosis. During fibrogenesis, the compliant relationship between the mucosa and the submucosa is lost, which contributes to stricture formation, subsequent intestinal obstruction, and ultimate organ failure. The main feature of tissue fibrosis is excessive accumulation of abnormal and cross-linked collagen mainly composed of fibrillar and imma-

ture ECM components (8). The precise mechanisms underlying the dramatic deposition of connective tissue observed in tissue fibrosis remain unclear. However, failure to maintain homeostasis of the ECM and upsetting the balance between synthesis and degradation of ECM components may play an important role.

The synthesis of ECM components is regulated at the transcriptional, posttranscriptional, translational, and posttranslational levels. Collagen lysis is regulated by the balance between the activity of matrix metalloproteinases (MMPs) and that of their tissue inhibitors (TIMPs). MMPs consist of a family of at least 25 zinc-dependent proteases (3, 19, 40). The latter are classified according to their substrate specificity and structural features into gelatinases (MMP-2, -9), stromelysins (MMP-3, -7, -10, -11), elastases (MMP-12), collagenases (MMP-1, -8, -13, -18), and membrane-type MMPs (MMP-14, -15, -16, -17). MMP activity is tightly controlled both at the transcriptional and the translational levels (19). Analysis of the control elements of the promoter region of MMP genes revealed common arrangements of the transcription factor binding sites. This specific promoter structure is thought to be required for the control of the tissue-specific expression of MMPs and to involve a functional cooperation between transcription factors of the AP-1 and Ets family (5). Most MMPs are secreted as zymogens and require proteolytic activation. In vivo activation of pro-MMPs is mostly mediated through the plasminogen-plasmin cascade and by MMPs themselves (18, 30). Another type of MMP activation, which has been reported for MMP-2, is through the membrane-type MMP-1 (MMP-14) (28). This process may be associated to fibrogenesis as MMP-2 degrades basement membrane type IV collagen (4), which is thought to facilitate the deposition of fibril-forming collagen. The third level of control of MMP activity is ensured by TIMPs, which are known to inhibit active MMPs at a stoichiometric ratio of 1:1 (38). Four subtypes of TIMPs (TIMP-1 to -4) have been identified so far (2). Whereas TIMP-1 inhibits a broad range of MMPs, TIMP-2 seems to specifically inhibit MMP-2.

The control of the ECM turnover during the wound healing process and fibrosis depends on a sharp balance between ECM synthesis and degradation, and involves cooperation among three groups of genes: ECM components, proteases, and pro-

Address for reprint requests and other correspondence: M. C. Vozenin-Brotans. Laboratoire UPRES EA 27-10 "Radiosensibilité des tumeurs et tissus sains," PR1, 39, rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif CEDEX (E-mail: vozenin@igr.fr).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

tease inhibitors. Recent global approaches, such as gene array analysis, allow an overall and integrated view of the regulation of ECM remodeling. This approach has been successfully applied to intestinal inflammatory and fibrotic disorders (34). In experimental models of T-cell-mediated intestinal injury, overexpression of MMPs (MMP-1, -3, -9) was found to be associated with a decrease in TIMP expression (26), whereas concomitant overexpression of MMPs (MMP-1, -2, -3, -14) and TIMP-1 was observed in inflamed mucosa of inflammatory bowel disease (IBD) samples (34). Overexpression of MMPs, however, globally exceeded that of TIMP-1, which led to a net increase in proteolytic activity in the inflamed mucosa. There are very little data on MMPs in relation to intestinal fibrosis and even less in relation to radiation-induced fibrosis, with most studies focusing on the relationship between MMPs and mucosal ulceration (11). However, conflicting theories have been proposed. The excessive accumulation of collagen may be the consequence of increased ECM synthesis associated with decreased ECM degradation. In skin radiation-induced fibrosis, Lafuma et al. (10) reported decreased activity of gelatinases associated with increased TIMP activity. Zhao et al. (42) likely reported that the increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) after exposure to ionizing radiation led to decreased ECM degradation and to collagen accumulation.

This study aimed at investigating the balance between fibrogenesis and fibrolysis during intestinal radiation-induced fibrosis. cDNA array analysis is a global approach that enabled us to simultaneously quantitate mRNA expression of ECM components, MMPs, TIMPs, and PAI-1 in bowel biopsies from patients with radiation enteritis. Changes in expression levels of MMPs and TIMPs were confirmed by real-time RT-PCR, and immunolocalization was used to characterize the cell types involved in the control of ECM remodeling.

MATERIALS AND METHODS

Tissue sampling. Twenty-two patients treated by surgery for intestinal occlusion caused by delayed radiation-induced enteritis entered the study. The patients characteristics are shown in Table 1. Histological and immunohistological studies were performed in 22 patients and tissue samples from six patients were frozen for subsequent mRNA and gelatin zymography studies. In most cases, the severity of the affliction did not allow resection of healthy intestine. Healthy ileum samples obtained from six patients without radiation enteritis, who underwent colon surgery, were used as controls. These control

samples were free of malignancy and showed regular histology after hematoxylin and eosin staining. Collagen deposition was detected by Sirius Red staining. Procurement of tissue samples received prior approval from our institution's Ethics Committee and was performed according to the French Medical Research Council guidelines.

Gene array analysis. Total RNA was extracted from frozen tissue by the method of Chomczynski as already described (35), and quantified by absorption spectrometry. RNA was treated with RNase-free DNase (0.5 U/ μ l) to remove contaminating genomic DNA. RNA integrity was checked and PolyA RNA was purified from 20 μ g of total RNA using the RNA Atlas Pur kit (Clontech, Ozyme, St. Quentin en Yveline, France). Radiolabeled cDNA was prepared according to Clontech's instructions and hybridized with the Cell Interaction and Atlas Human 1.2 arrays. A list of all the genes included in these two arrays as well as their functions can be found at www.clontech.com/atlas and is deposited into the Gene Expression Omnibus database (www.ncbi.nih.gov/geo) under GEO accession nos. GPL127 and GPL135. Phosphorimager intensifying screens were exposed to membranes and mRNA expression levels were determined by scanning the screen with a phosphorimager (Raytest; Fuji, Courbevoie, France). Analysis of differential mRNA expression was carried out by using the Atlas Image 1.5 software, and data were normalized with selected housekeeping genes (*HPRT*, *GAPDH*, *TUBA1*, *RPL13A*, *40S ribosomal protein S9*) as already described (35). Signal intensities had to be significantly above background (i.e., 50% or more) to be considered. Only changes in the expression level greater than twofold the average control level were considered significant.

Determination of net collagen deposition in radiation enteritis. We used the method recently proposed by Sandler et al. (27) to assess net collagen deposition. Briefly, relative change in MMP activity in radiation enteritis was expressed as the ratio of the fold change in MMP mRNA to TIMP mRNA expression. The fold change in collagen mRNA in radiation enteritis was divided by this relative MMP activity: fold change in collagen/(fold change in MMP/fold change in TIMP). Values thus obtained reflected a tendency toward collagen deposition relative to steady state when >1 and toward matrix degradation when <1 . Example: Type III collagen is a substrate for MMP-1, -3, and -14. MMP-1 and -3 are both inhibited by TIMP-1, and MMP-14 is inhibited by TIMP-2. The fold change of COL3A1 mRNA in radiation enteritis is 3.9; the fold changes of MMP-1, -3, and -14 mRNA in radiation enteritis are, respectively, 11.7, 19.8, and 2.3; the fold changes of TIMP-1 and -2 mRNA in radiation enteritis are, respectively, 5.4 and 2.5. Relative expressions of MMP-1/TIMP-1, MMP-3/TIMP-1, and MMP-14/TIMP-2 were, respectively, 2.1, 3.6, and 0.92. Collagen type 3 alpha 1 (COL3A1)/MMP-1:TIMP-1 = 1.8, COL3A1/MMP-3:TIMP-1 = 1.08, and COL3A1/MMP-14:TIMP-2 = 4.2.

Confirmation of differential gene expression. Two micrograms of total RNA were reverse transcribed with SuperScript II reverse tran-

Table 1. Characteristics of the patient population

Time after RT, mo	Tumor Site	Age, yr	Sex	Treatment
Radiation enteritis (22 with ileal stricture)				
1-52	Rectum cancer (9)	44-69	5M/4F	RT 45 Gy/S/CT (7)
4-28	Gynecological cancer (12)	27-71	12F	RT 34-35 Gy/S/RT 15-25 Gy (2) S/RT 45 Gy/CT (4) S/RT 45 Gy/CT/BT 10-15 Gy (4) S/BT 60 Gy (2) BT 60 Gy/S/RT 45 Gy (1)
75	Hodgkin's disease (1)	51	M	RT 65 Gy (1) RT 40 Gy/CT
Healthy bowel (6)				
0	Colon adenocarcinoma	29-81	3M/3F	Nonirradiated Right hemicolectomy

RT, pelvic radiotherapy; BT, brachytherapy; CT, chemotherapy; S, surgery; Gy, gray; M, male; F, female. Number in parentheses is number of patients.

scriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) using random hexamers. Primers were generated with the Primer Express software (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and were purchased from Invitrogen: collagen type 1 alpha 2 (*COL1A2*), 5'-CGCGGACTTTGTTGCTGCTTG-3' (Forward); 5'-GGAAACCTTGAGGGCCTGGG-3' (Reverse); *MMP-2*, 5'-CGCTCAGATCCGTGGTGAG-3' (Forward); 5'-TTGTCACGTGGCGTCACAG-3' (Reverse); *MMP-3*, 5'-CAAGCCCAGGTGTGGAGTTC-3' (Forward); 5'-GGGTTTTGCTCCACTTCGG-3' (Reverse); *MMP-14*, 5'-TGGACACG-GAGAATTTTGTGC-3' (Forward); 5'-ACCCCATAAAGTTGCTGGAT-3' (Reverse); *TIMP-1*, 5'-CACCCACAGACGGCCTTCT-3' (Forward); 5'-CTTCTGGTGTCCGCACGAA-3' (Reverse); *TIMP-2*, 5'-TGACTTCATCGTGCCTGGG-3' (Forward); 5'-CTGGAC-CAGTCGAAACCCTTGG-3' (Reverse). Optimized PCR used the ABI PRISM 7700 detection system in the presence of 135 nM specific forward and reverse primers for *COL1A2*, *MMP-2* and *-3*, *TIMP-2*, and 45 nM specific forward and reverse primers for *MMP-14* and *TIMP-1*. Both water and genomic DNA controls were included to ensure specificity. The purity of each PCR product was checked by analyzing the amplification plot and dissociation curves. Relative mRNA quantitation was performed by using the comparative $\Delta\Delta C_T$ method. Relative quantification in radiation enteritis = $2^{-\Delta\Delta C_T}$, where $\Delta\Delta C_T$ is defined as the difference between the mean $\Delta C_{T(\text{radiation enteritis})}$ and the mean $\Delta C_{T(\text{healthy bowel})}$, and ΔC_T , the difference between the mean $C_{T(\text{COL1A2, MMPs, TIMPs})}$ and $C_{T(18S)-18S}$ was used as endogenous control. Each sample was monitored for fluorescent dyes, and signals were regarded as significant if the fluorescence intensity exceeded

10-fold of the standard deviation of the baseline fluorescence, defined as threshold cycles (C_T). C_T were selected in the line in which all samples were in logarithmic phase.

Gelatin zymography. Frozen tissue samples were crushed to powder in liquid nitrogen, homogenized in a 50 mM Tris·HCl buffer (pH 7.6), containing 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 1% Triton X-100, and protease inhibitors (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Supernatants were collected, and protein concentration was determined by using the Lowry method. Gelatinase activity was assessed as follows: 1 mg/ml type A gelatin from porcine skin (Sigma-Aldrich) was copolymerized in 8% SDS-polyacrylamide gel, and was used as substrate. The samples were diluted 1:1 in sample buffer consisting of 62.5 mM Tris·HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS, and 0.05% bromophenol blue. Four micrograms of each protein sample were separated by electrophoresis at a constant voltage of 100 V for 1–2 h at 4°C. The gel was then washed twice in 2.5% Triton X-100 and incubated overnight at 37°C in a buffer containing 50 mM Tris·HCl (pH 7.8), 5 mM CaCl₂·2H₂O, 50 mM NaCl, 0.01% Brij 35, and 0.02% NaN₃. Gels were stained with 0.5% Coomassie blue in 25% isopropanol and 10% acetic acid for 60 min, and destained in a mixture containing 10% methanol and 10% acetic acid until the stacking gel was destained. Bands of gelatin lysis appear as clear zones countering a blue background. Densitometric analyses were performed by using an image analyzer (Biocom, Les Ulis, France) interfaced with the Phoretix image analysis software (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK).

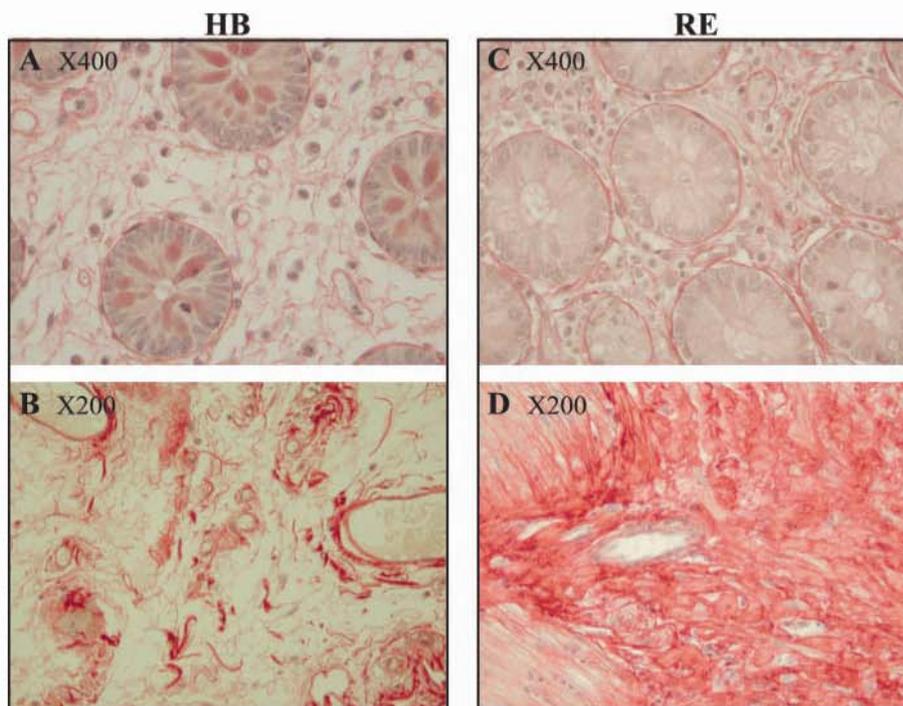
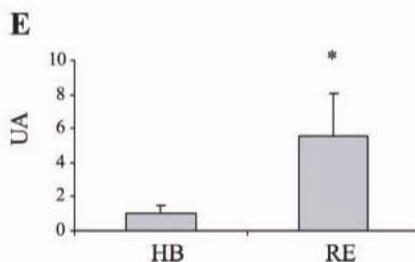


Fig. 1. Collagen staining by Sirius red in the mucosa (A) and the submucosa (B) of a healthy bowel (HB) sample and in the mucosa (C) and the submucosa (D) of a radiation enteritis sample. Gene expression of collagen type 1 alpha 2 chain (*COL1A2*), determined by real-time RT-PCR, was measured in radiation enteritis (RE) samples ($n = 6$) and compared with the expression in HB samples ($n = 6$). Values were normalized to 18S RNA and are means \pm SE (* $P < 0.05$). UA, arbitrary unit.



Immunostaining. Four-micrometer-thick acid formaldehyde alcohol or Bouin-fixed paraffin-embedded sections were used to immunolocalize MMP-2 (1:150, 42-5D11), MMP-3 (1:75, SL-1 IIIC4), MMP-9 (1:3,000, 56-2A4), MMP-14 (1:5,000, 113-5B7), TIMP-1 (1:100, 102D1), and TIMP-2 (1:1,500, 67-4H11). Antibodies were purchased from Chemicon (Euromedex, Mundolsheim, France). These antibodies were described to recognize pro- and active forms of MMP without crossreacting with other MMPs and TIMPs. After dewaxing and rehydration, endogenous peroxidase activity was eliminated with 3% hydrogen peroxide in PBS. MMP-3 and TIMP-1 epitopes were unmasked in 10 mM citrate buffer (pH 6.0). To inhibit nonspecific staining, slides were incubated 10 min at room temperature with serum-free DAKO (Trappes, France) Protein Block and incubated overnight at 4°C with the primary antibody, diluted in DAKO Antibody Diluent. Slides were then rinsed in Tris-HCl/NaCl/Tween 20 (50 mM, 0.3 M, 0.1%, respectively). The primary antibody was detected by using the EnVision⁺ anti-mouse horseradish peroxidase (DAKO) revealed by Vector NovaRED substrate kit (BioValley) and counterstained with IMeyer's hemalun. Known positive cases and negative controls (omission of the primary antibody and irrelevant mouse IgG1 incubation) were included in each run and were shown to be positive and negative, respectively. A semiquantitative analysis of MMP-2, -3, -9, and -14, and TIMP-1 and 2 was performed by using the following scoring system. Intensities of staining in epithelium, lamina propria, submucosa, vessels, muscularis propria, and serosa were assigned a score, where - represents no staining; +, weak staining; ++, mild staining; and +++, strong staining. Total score was the mean value obtained for each bowel layer.

Statistical analysis. For real-time RT-PCR and zymography, statistical differences between means of control group and radiation enteritis group were evaluated by using Student's *t*-test.

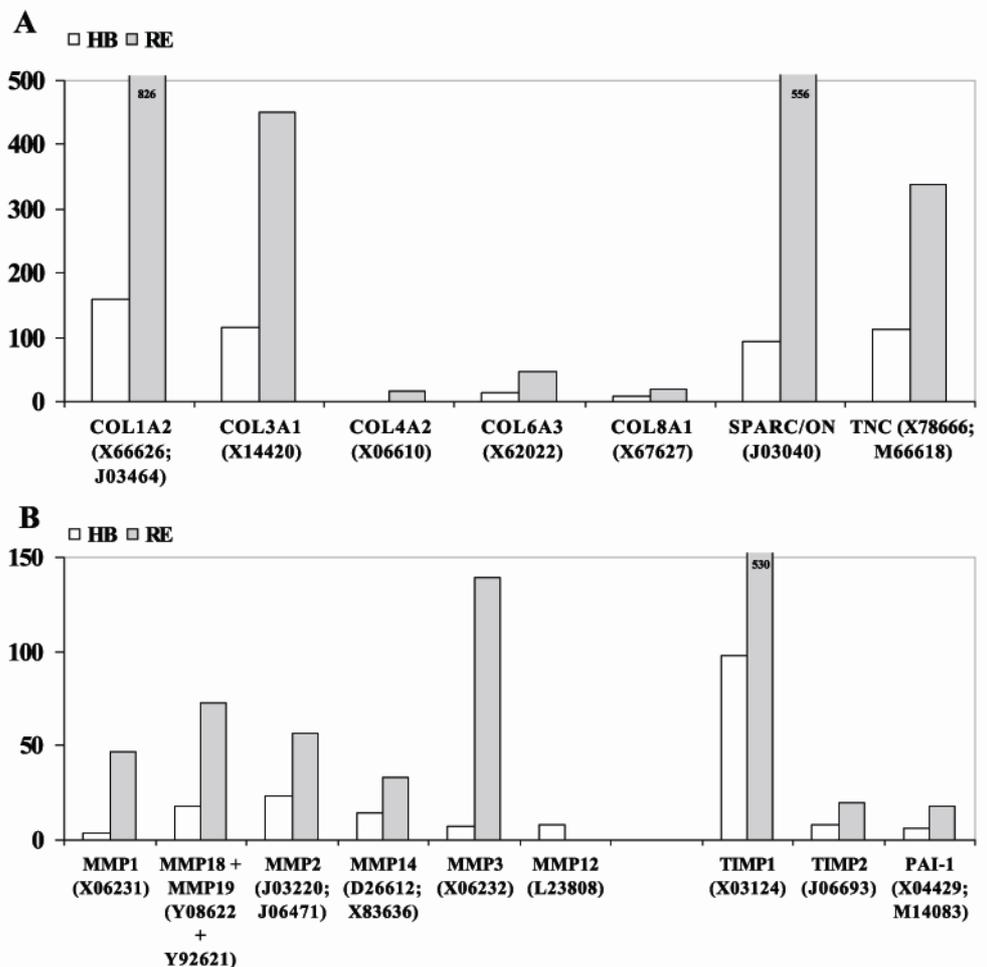
RESULTS

Histopathological study. Examination of hematoxylin and eosin-stained and Sirius Red-stained sections (Fig. 1, A-D) revealed common histological features in all radiation enteritis samples. Severe fibrosis affected the whole intestinal wall; transmural collagen accumulation was observed in the mucosa, submucosa, and muscularis propria. Real-time RT-PCR analysis showed that COL1A2 mRNA level increased in radiation enteritis (Fig. 1E).

Gene array analysis. A "normal" composite membrane, which included mRNAs expressed in all six control samples was generated and compared with membranes established for each radiation enteritis sample. Genes were selected when their expression level was altered by more than twofold compared with controls.

Levels of mRNA coding for the fibrillar collagen type I alpha 2 (COL1A2) and COL3A1 were increased by 3.8- and 5-fold in radiation enteritis (Fig. 2A; notice that collagen type I alpha 1 was not spotted on the array). Furthermore, the collagen I-to-collagen III ratio increased from 1.3 in control samples to 1.8 in radiation enteritis. The level of mRNA coding

Fig. 2. Gene array analysis of extracellular components (A), matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitors of MMP (TIMPs), and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) genes (B) in HB samples (n = 6) and RE samples (n = 6). Hybridization intensities were obtained by using the Atlas Image 1.5 software, converted into ratios, and adjusted for background and housekeeping genes expression (Gene X intensity background)/(average intensity for all 6 housekeeping gene backgrounds). Y-axis includes name and accession no. of genes.



for the microfibrillar type VI alpha 3 collagen was increased by threefold, whereas mRNA coding for the alpha 1 and alpha 2 chains were, respectively, increased by 1.8 and 1.7 and were not included in the Fig. 2A, because they did not reach the cut-off value. The level of mRNA coding for the stromal component tenascin-C was also increased by threefold in radiation enteritis (Fig. 2A). These observations are consistent with the development of tensile ECM, which characterizes late radiation-induced fibrosis. Compositions of vascular and basement membrane ECM were also found to be altered in radiation enteritis. We observed two- and sixfold increases in type VIII alpha 1 collagen and Sparc mRNA levels, respectively. Collagen type IV alpha 2 (COL4A2) hybridization signal was below the background signal in healthy bowel sample, but was detectable in radiation enteritis samples (notice that COL4A3 and COL4A6 were also slightly increased but did not reach the cut-off value). Composition of basement membrane cDNA array analysis further showed that the expression level of interstitial collagenases (MMP-1 and MMP-18+19), gelatinase (MMP-2), membrane-type MMP (MMP-14), and stromelysin (MMP-3) increased by 2- to 19-fold in radiation enteritis (Fig. 2B), whereas hybridization signal of the macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) was below the background signal in radiation enteritis but was detectable in healthy bowel samples. Both MMP-9 and -7 were not found to be differentially expressed. Levels of MMP inhibitors, TIMP-1, TIMP-2, and PAI-1 increased by five-, two-, and threefold in radiation enteritis, respectively (Fig. 2B).

Because the balance among collagen synthesis, collagen degradation by MMPs, and inhibition of MMPs by TIMPs regulates collagen deposition, we assessed net collagen deposition in radiation enteritis samples using the method developed by Sandler et al. (27). It is assumed that no net collagen deposition or degradation occurs in control samples. Thus the collagen/MMP:TIMP value was set to 1 for controls and used as a reference. Each collagen mRNA expression value was divided by the fold change value for the relevant MMP and TIMP (Fig. 3) and values above 1 are in favor of net collagen deposition. Results thus obtained suggest that net collagen deposition occurs in radiation enteritis despite the increase in MMP mRNA. Both the Sandler method (27) and Sirius Red spectrophotometric collagen assay (36) revealed a similar trend to net collagen deposition.

Gelatinase expression. Real-time RT-PCR analysis confirmed that MMP-2 and -14 (Fig. 4I) mRNA level increased in radiation enteritis. As regards MMPs, protein levels are thought to be well correlated with mRNA expression. Thus to investigate whether mRNA levels correlated with MMP activity, gelatin zymography was performed on whole tissue extracts. We found a strong MMP-2 activity (Fig. 4II) in radiation enteritis samples. Furthermore, despite the fact that MMP-9 mRNA induction did not reach the twofold cut-off value in the cDNA array analysis, we observed an increase in MMP-9 activity in zymography experiments although statistically non-significant due to interindividual variability (Fig. 4II), whereas real-time RT-PCR showed a fivefold increase of MMP-9 mRNA level (Fig. 4I).

Cellular localization of MMP-2, -9, and -14 was assessed by immunostaining. Representative immunohistochemical staining patterns in control and radiation enteritis samples are shown in Fig. 5. A strong increase in MMP-2 staining was

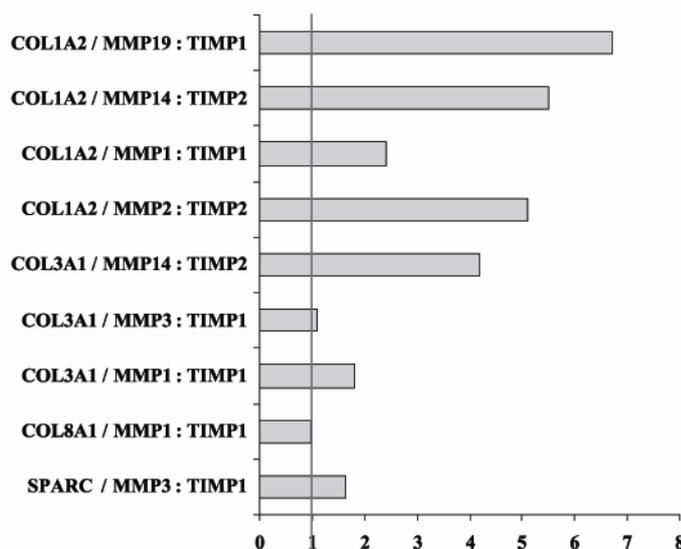


Fig. 3. Collagen-to-MMP-to-TIMP ratio in RE. Relative expression of MMP was calculated by determining the fold change of the MMP mRNA expression relative to its relevant inhibitor TIMP (i.e., fold change of MMP-1, -3, and -19 mRNA expression was divided by fold change TIMP-1 mRNA expression). Fold change of MMP-2 and -14 mRNA expression was divided by fold change TIMP-2 mRNA expression. The fold change for collagen mRNA was then divided by the fold change value for the relevant MMP/TIMP to yield the fold change in the ratio of collagen deposition to collagen degradation compared with the steady state.

found in each layer of the bowel in radiation enteritis (Fig. 5, C–F). In the mucosa, MMP-2 was detected at the apical end of epithelial cells, in α -sm actin positive subepithelial myofibroblasts, and inflammatory cells. Activated fibroblasts and leucocytes infiltrating the submucosa, as well as smooth muscle cells of the muscularis propria were also stained. Because MMP-14 is involved in the proteolytic activation of pro-MMP-2, and MMP-14 mRNA levels were found increased in radiation enteritis, we sought to determine the cell type involved in MMP-14 expression by immunolocalization (Fig. 5, J–O). A gradient of expression was observed along the crypt-villus axis: epithelial cells of the crypt were negative, whereas differentiated epithelial cells were strongly positive. MMP-14 was detected in the same cell types as those found positive for MMP-2 (i.e., subepithelial myofibroblasts, leucocytes, submucosal fibrosis myofibroblasts). Endothelial cells, however, appeared to be MMP-2 and -14 negative. An increased MMP-9 mRNA level was found in radiation enteritis, as shown by real-time RT-PCR experiments, and immunostaining provided evidence that MMP-9 protein was mainly expressed in leucocytes. MMP-9 staining was thus directly related to the degree of infiltration by inflammatory cells, which increased in radiation enteritis (Fig. 5, H–I).

Stromelysin expression. In our experimental conditions (10 ng of cDNA), MMP-3 mRNA was only detected in radiation enteritis samples, thus confirming the induction of MMP-3 mRNA observed by cDNA array analysis. MMP-3 immunostaining showed very few positive cells (mostly leucocytes) in the mucosa of control samples, whereas strong positive staining was observed in the mucosa and the submucosa of radiation enteritis samples. Epithelial cells and mucosal macrophages were hugely labeled, as well as submucosal inflammatory cells, fibrosis myofibroblasts, and endothelial cells (Fig. 6).

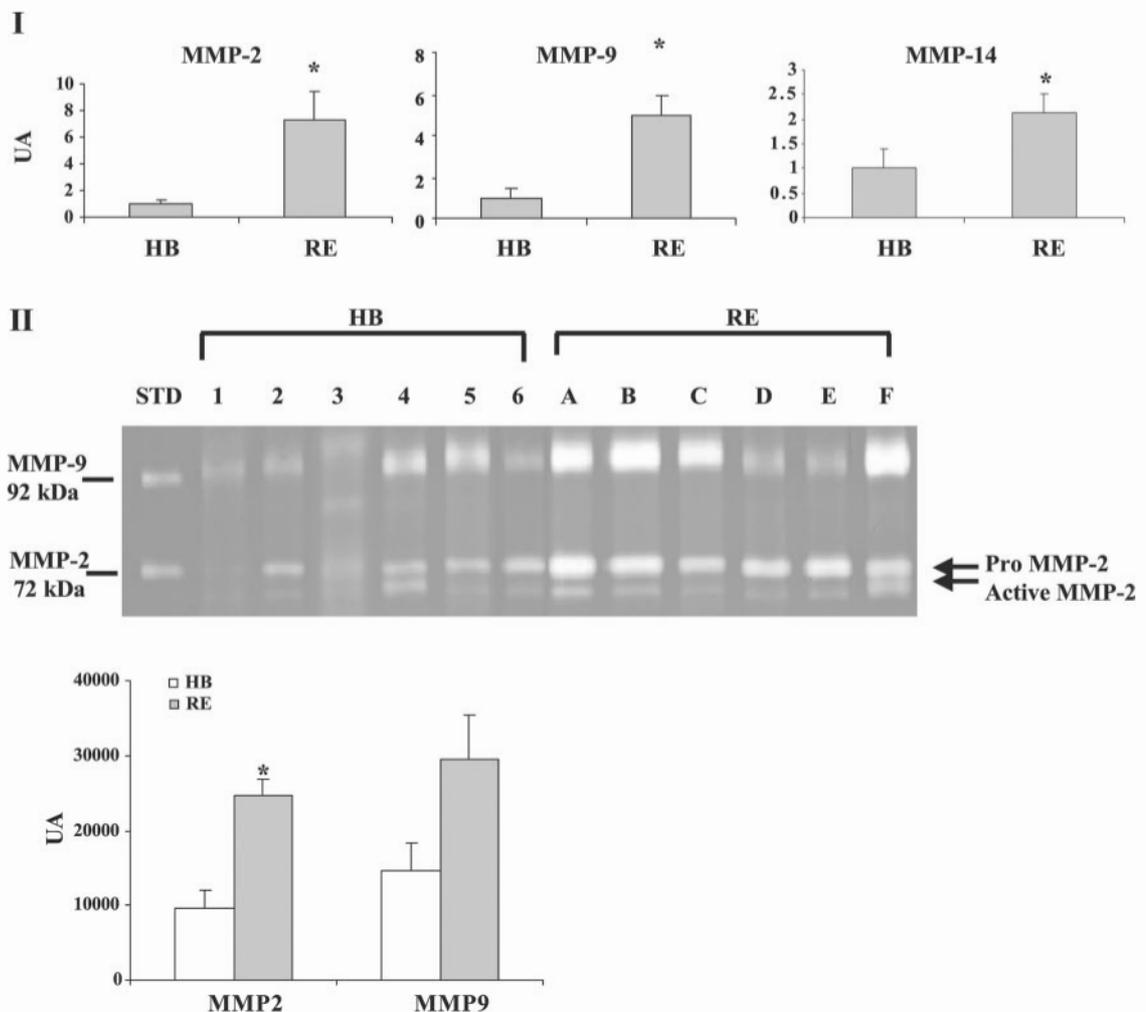


Fig. 4. *I*: gelatinases and MMP-14 mRNA levels in RE vs. HB. Gene expression of MMP-2, -9, and -14 determined by real-time RT-PCR was measured in RE samples ($n = 6$) and compared with the expression in HB samples ($n = 6$). Values were normalized to 18S RNA and are means \pm SE ($*P < 0.05$). *II*: study of gelatinase activities in RE vs. HB by zymography. Lane STD shows MMP-2 and -9 standards. Gelatin zymography showed basal MMP-2 and -9 activities in HB specimens ($n = 6$; lanes 1–6) and a statistically significant increase of MMP-2 activity ($*P < 0.05$) in RE samples ($n = 6$; lanes A–F), whereas increased MMP-9 activity in RE samples was not found to be statistically significant due to heterogeneity between samples ($n = 6$; lanes A–F).

TIMP expression. Real-time RT-PCR analysis confirmed that TIMP-1 and -2 (Fig. 7, *I* and *II*) mRNA level increased in radiation enteritis. Detection of TIMP-1 was restricted to the mucosa in control and radiation enteritis samples. In control samples, however, very few TIMP-1 positive cells were found, whereas the mucosa in radiation enteritis samples was heavily stained (Fig. 7*III*). Control samples showed sparse staining for TIMP-2, whereas radiation enteritis samples were highly positive for TIMP-2. Transparietal inflammatory cells and fibrosis myofibroblasts of the submucosa and muscularis propria were strongly immunoreactive for TIMP-2 (Fig. 7*IV*). All immunohistochemical data are summarized in Table 2.

DISCUSSION

To gain further insight into the biological function of various MMPs, their inhibitors, and their involvement in the excessive ECM deposition occurring in chronic radiation fibrosis after radiotherapy in humans, their expression patterns were studied by gene array analysis and immunohistochemistry. Classically,

radiation fibrosis has been considered a chronic and progressive process in which normal tissue is replaced by fixed and irreversible fibrotic tissue. This view has however, been challenged, because fibrosis has recently been defined as a dynamic process resembling chronic wound healing. In this study, a marked upregulation of collagen and enzymes involved in ECM remodeling was observed in late radiation enteritis, which concurs with this new definition of radiation-induced fibrosis and is reflective of a continuous repair process.

Collagen is the predominant protein of the intestine's connective tissue. It is secreted by intestinal mesenchymal cells (subepithelial myofibroblasts, smooth muscle cells) located in the lamina propria and in the muscles (14). Fibrillar collagens (type I and III) are found in the lamina propria, the submucosa, and muscles, whereas type IV collagen is found in the basement membrane and the lamina propria (8). Colocalization of collagen deposition and myofibroblasts was demonstrated in one of our previous studies (36). In the present study, we observed a marked increase in type I, III, and IV collagen RNA

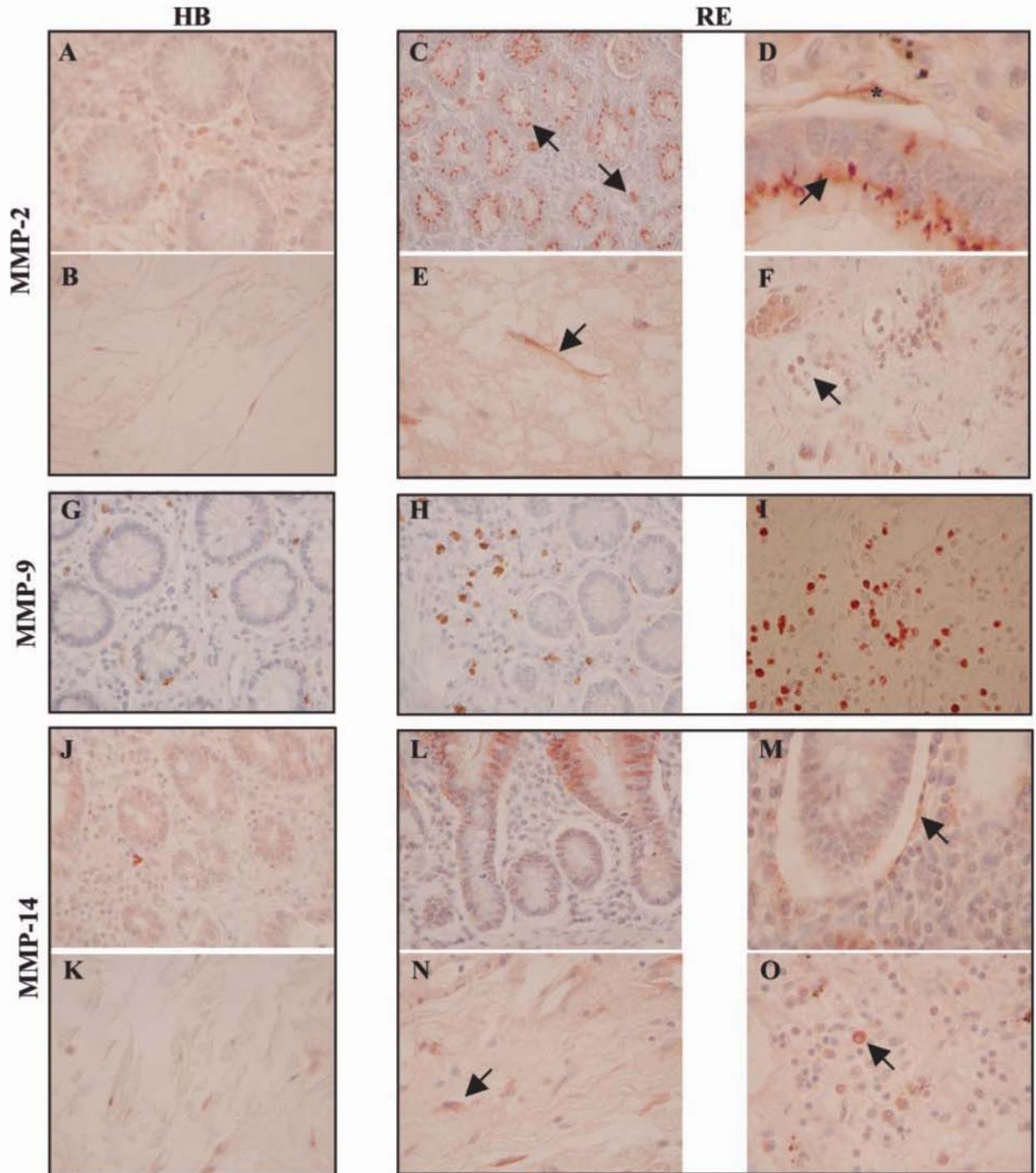


Fig. 5. Gelatinase A (MMP-2), gelatinase B (MMP-9), and membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) immunostaining in HB and RE specimens. Low MMP-2 immunostaining was seen in the mucosa (A; magnification, $\times 400$) and the submucosa (B; magnification, $\times 400$) of HB samples. In RE samples, MMP-2 immunostaining increased in mucosal epithelial and inflammatory cells (arrow) (C; magnification, $\times 100$). High magnification bright-field image (D; magnification, $\times 400$) showed MMP-2 positive staining at the apex of epithelial cells (arrow) and in subepithelial myofibroblasts (*). In the submucosa, increased MMP-2 immunostaining was found in fibrosis myofibroblasts (arrow) (E; magnification, $\times 400$) and in infiltrated leucocytes (arrow) (F; magnification, $\times 400$). Low MMP-9 immunostaining was seen in the mucosa (G; magnification, $\times 400$) and the submucosa (data not shown) of HB samples. In RE samples, MMP-9 immunostaining increased in mucosal (H; magnification, $\times 400$) and submucosal inflammatory cells (I; magnification, $\times 400$). Low MMP-14 immunostaining was seen in the mucosal inflammatory cells (J; magnification, $\times 400$) and the fibroblasts of the submucosa (K; magnification, $\times 400$) of HB samples. In RE samples, MMP-14 gradient of expression was observed along the crypt-villus axis in the epithelium (L; magnification, $\times 400$) and subepithelial myofibroblasts (arrow) were MMP-14 positive (M; magnification, $\times 400$). Submucosal activated fibroblasts (arrow) (N; magnification, $\times 400$) and infiltrated leucocytes (arrow) (O; magnification, $\times 400$) stained positively for MMP-14.

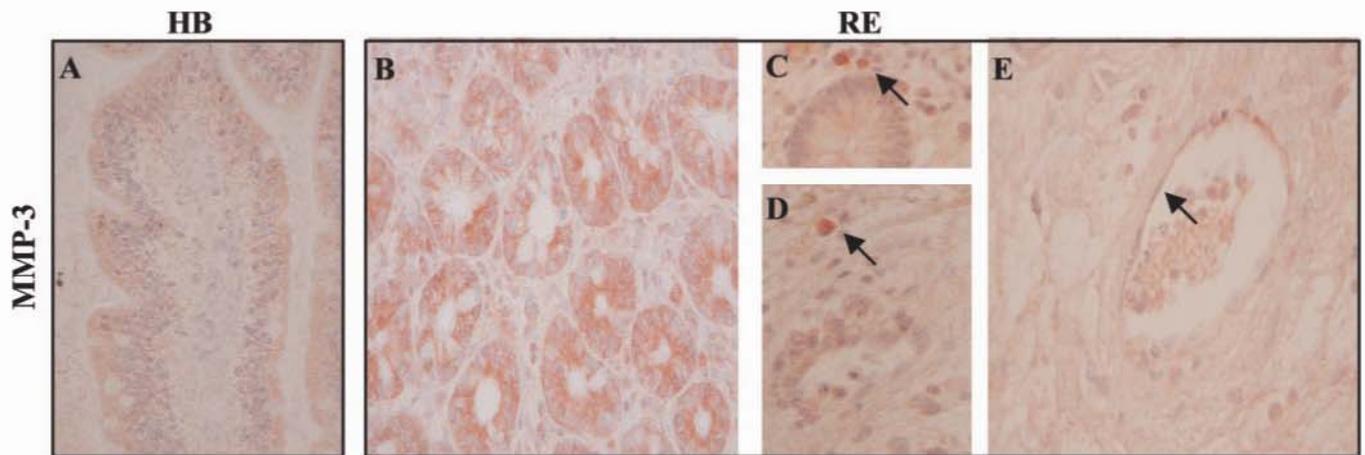


Fig. 6. Stromelysin-1 (MMP-3) immunostaining in HB and RE specimens. Low MMP-3 immunostaining was seen in the mucosa (A; magnification, $\times 400$), and no MMP-3 staining was seen in the submucosa of HB samples. In RE samples, MMP-3 immunostaining increased in epithelial cells (B; magnification, $\times 400$). High-magnification brightfield image showed MMP-3 positive staining in mucosal (C; magnification, $\times 400$) and submucosal (D; magnification, $\times 400$) leucocytes. Endothelial cells (arrow) stained positively for MMP-3 (E; magnification, $\times 400$).

transcripts in strictured ileum resected from patients with radiation enteritis. Moreover, we observed increase in the noncollagenous stromal component tenascin-C, which is produced in immature and newly formed granulation tissue and promotes migration, proliferation, and activation of matrix-producing cells, such as fibroblasts and smooth muscle cells (reviewed in Ref. 12). Induction of type I collagen, normalized for changes in the expression levels of MMPs and TIMPs, is

greater than that of type III collagen. This observation is consistent with previous findings showing accumulation of type I collagen in late phases of radiation fibrosis (25). This abnormal deposition of type I/III collagen that consists of large and tensile collagen fibrils, leads to intestinal stenoses and ensuing obstructive symptomatology. Furthermore, abnormal ECM deposition may affect the ability of cells to express and maintain their differentiated phenotype. Besides having a

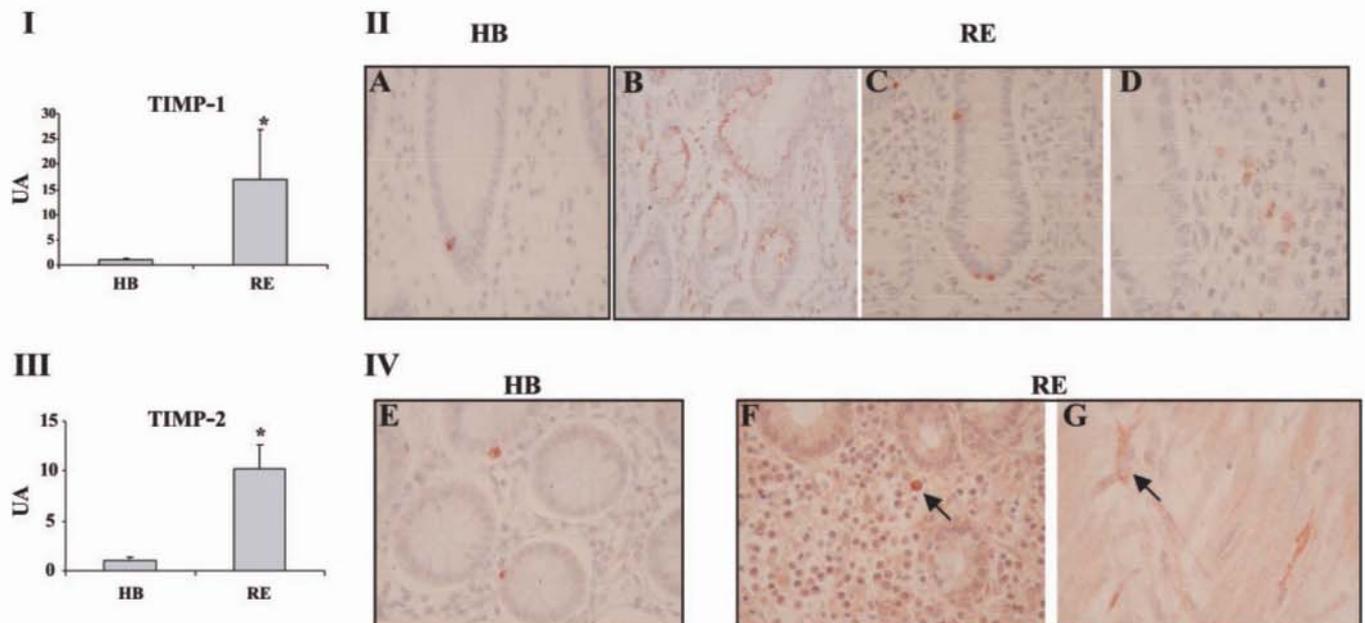


Fig. 7. Tissue inhibitors of metalloproteinase TIMP-1 and -2 mRNA expression and immunolocalization in HB and RE specimens. I and III: gene expression of TIMP-1 and TIMP-2 determined by real-time RT-PCR, was measured in RE samples ($n = 6$) and compared with the expression in HB samples ($n = 6$). Values were normalized to 18S RNA and are means \pm SE ($*P < 0.05$). II: immunolocalization of TIMP-1 in RE vs. HB. Both in normal and RE samples, TIMP-1 immunostaining was restricted to the mucosa. Low TIMP-1 immunostaining was seen in the epithelium (A; magnification, $\times 400$) of HB samples. In RE samples, TIMP-1 immunostaining increased in epithelial (B and C; magnification, $\times 400$) and inflammatory cells (D; magnification, $\times 400$). IV: immunolocalization of TIMP-2 in RE vs. HB. Low TIMP-2 immunostaining was seen in the mucosa (E; magnification, $\times 400$) and submucosa of HB samples. In RE samples, TIMP-2 immunostaining increased in leucocytes (arrow) of the mucosa (F; magnification, $\times 400$) and of the submucosa. In the submucosa, increased TIMP-2 immunostaining was found in activated fibroblasts (arrow) (G; magnification, $\times 400$).

Table 2. *Semiquantitative analysis of MMP-2, -3, -9, -14 and TIMP-1 and -2 in radiation enteritis versus healthy bowel*

Patients	No.	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-14	TIMP-1	TIMP-2
Control	6	+/++	-/+	++/+++	+/++	+	+
Radiation enteritis	22	+++	+++	+++	++	+++	++

-, No staining; +, weak staining; ++, mild staining; and +++, strong staining.

structural role, molecules of the ECM are now known to have functional roles, such as storage of growth factors and transmission of differentiation signals to cells (1, 31). Furthermore, MMP activation may lead to the release of growth factors and cytokines from the ECM. For instance, release and activation of TGF- β 1 may affect the fibrogenic process (15, 39). Consequently, the nature of the cell microenvironment should not be solely seen as a consequence of tissue fibrosis, but also as a mean to ensure cellular activation responsible for the maintenance of the fibrotic process.

Collagen accumulation in radiation fibrosis has been thought to be associated with a decrease in MMP activity and increased TIMP levels. Our results show an induction of each member of the MMP family, i.e., gelatinases, stromelysin, collagenases, and membrane-type MMPs, in late radiation enteritis. The concomitant induction of MMP inhibitors (TIMP-1, TIMP-2, and PAI-1) counterbalances this induction of MMPs, leading to a net collagen deposition. Because MMPs act locally, studies on whole-tissue lysates provide only partial information about ECM remodeling in late radiation enteritis. We therefore performed immunohistochemical studies on 22 radiation enteritis samples to investigate regulation of ECM metabolism in each bowel layer.

Intense ECM remodeling seems to particularly affect intestinal mucosa in radiation enteritis. We report a coordinated expression of MMP-2, -3, -9, and -14, proportional to the extent of inflammatory cell infiltration. Molecular characterization of inflammatory cell subtypes involved in MMP overexpression in radiation enteritis has not been done so far. However, it seems reasonable to assume that collagen synthesis in mesenchymal cells is stimulated by secretory products of inflammatory cells (14) and that MMP/TIMP secretion may be partly achieved by leucocytes themselves (13, 29). IL-1 β can be cited among the inflammatory mediators that control MMP synthesis (21). In a previous study (35), IL-1 β mRNA was found to be markedly increased in radiation enteritis samples, suggesting that it may be involved in ECM remodeling in the late phase of radiation fibrosis. Monitoring the T-helper 2 response in radiation enteritis may also be relevant, because T-helper 2 response has been shown to be involved in pneumonitis and subsequent pulmonary fibrosis after thoracic radiotherapy (37) and is known to control ECM remodeling in pathogen-induced pulmonary inflammation (27). Upregulation and colocalization of MMP-2 and -14 in activated mesenchymal cells has already been described in various wound healing models in skin (20), liver (32), and gut (34). Furthermore, in accordance with our findings, increased MMP-2 expression in human subepithelial myofibroblasts within irradiated rectum (9) and derived from IBD biopsies (16) has been demonstrated. Contrary to Hovdenak's findings (9), we report strong MMP-2 and -14 staining in epithelial cells with a crypt-villus gradient of expression for MMP-14. The difference between our findings and Hovdenak's may account for the difference in the

anatomical location of the biopsy (ileum vs. colon) and the timing at which resection was performed (several months vs. 2 wk after radiation therapy). Furthermore, colocalization of MMP-3 and -14 has already been described (22) in activated fibroblast-like cells from IBD biopsies, whereas in radiation enteritis samples, MMP-3 and -14 were found to be expressed in intestinal epithelial cells and inflammatory cells in the lamina propria. This increased expression of MMP-2, -3, and -14 provides new insight into the differentiation of intestinal epithelial cells in radiation enteritis. Increased MMP-2 and 3 expression has already been described in migrating keratinocytes during cutaneous wound healing and in monostratified epithelia, increased MMP-2 expression has been reported in lung (41) and mouse colon (23). Furthermore, MMP-2 and -14 are known to process laminin and to regulate migration of lung carcinoma-derived epithelial cells (A549) (24). The present observations suggest that remodeling of the basement membrane occurs in late radiation enteritis and could lead to epithelial anoikis and chronic ulceration. In addition, production of MMPs by epithelial cells may directly affect differentiation and proliferation of the subepithelial myofibroblasts into fibrosis-activated cells. The significance of MMP-14 gradient of expression along the crypt-villus axis is unknown, but increased MMP-2 activity could be required for accelerated migration of enterocytes toward the top of the villi and to desquamation of differentiated enterocytes in radiation enteritis. In conclusion, we propose that MMP-2, -3, and -14 could be useful markers of epithelium activation and could mediate fibrogenic activation signals from epithelial cells to subepithelial myofibroblasts, as recently described by Xu et al. (41) in pulmonary fibrosis.

Although the most dramatic intestinal collagen deposition occurs in the submucosa and muscles, submucosal and muscular ECM remodeling during intestinal fibrosis has been poorly investigated. In accordance with findings from Matthes and Graham on Crohn's disease (14), *in vitro* studies performed in our laboratory (17) demonstrated that activated smooth muscle cells derived from the muscularis propria of the bowel of patients with radiation enteritis secretes twofold more type I collagen than their normal counterparts. The present study brings some new insight concerning ECM remodeling in deep intestinal layers, because it shows an increased MMP-2, -3, and -14 staining in fibrosis myofibroblasts within the submucosa and the muscles. ECM turnover depends on the MMPs-to-TIMPs ratio. In this study, mRNA analysis showed that TIMP mRNA levels were higher than the MMPs mRNA level in radiation enteritis, which resulted in inhibition of degradation. Immunohistochemistry brought additional clues to the understanding of the ECM remodeling balance in radiation enteritis, because it enabled us to observe an increased TIMP-1 and -2 staining in the mucosa, whereas only TIMP-2 staining was observed in the deeper layers. Classically, the balance between MMPs and TIMPs has been thought to reg-

ulate proteolytic activities; however, in addition to its inhibitory activity, TIMP-2 can associate with pro-MMP-2 and activate its proteolytic activity (7). Furthermore, TIMPs can play additional functional roles, such as that of anti-apoptotic factors that may be particularly relevant in a fibrotic context. TIMP-2 protects melanoma cells from apoptosis (33), and recently, TIMP-1 has been shown to inhibit apoptosis in activated hepatic stellate cells in established liver fibrosis (18). In this particular model, the anti-apoptotic effect of TIMP-1 was dependent on the prevention of matrix degradation through inhibition of MMPs. In normal conditions, resorption of granulation tissue occurs through apoptosis of myofibroblasts (6), whereas in fibrosis, persistence of myofibroblasts leads to organ failure. The observed TIMP-1 staining in subepithelial myofibroblasts and TIMP-2 staining in submucosal fibrosis myofibroblasts suggest that TIMP-1 and -2 may mediate persistence of myofibroblastic differentiation in late radiation enteritis.

In conclusion, despite the difficulty in assessing the ECM remodeling process in vivo, these observations nonetheless provide the first evidence of active ECM remodeling in late radiation enteritis. These findings further reinforce the concept that fibrotic tissue is dynamic and undergoes constant renewal, thus opening interesting perspectives for the development of antifibrotic interventional therapies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. J. Aigueperse (Direction de la Radioprotection de l'Homme, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, 92265 Fontenay-aux-Roses, France), Dr. J. C. Sabourin (Pathology Department, Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France), and Dr. P. Lasser (Surgery Department, Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France) for support and scientific advice.

REFERENCES

1. Barcellos-Hoff MH and Brooks AL. Extracellular signaling through the microenvironment: a hypothesis relating carcinogenesis, bystander effects, and genomic instability. *Radiat Res* 156: 618–627, 2001.
2. Brew K, Dinakarpanian D, and Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477: 267–283, 2000.
3. Brinckerhoff CE and Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 207–214, 2002.
4. Corcoran ML, Hewitt RE, Kleiner DE Jr, and Stetler-Stevenson WG. MMP-2: expression, activation and inhibition. *Enzyme Protein* 49: 7–19, 1996.
5. Crawford HC and Matrisian LM. Mechanisms controlling the transcription of matrix metalloproteinase genes in normal and neoplastic cells. *Enzyme Protein* 49: 20–37, 1996.
6. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, and Gabbiani G. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 122: 103–111, 1993.
7. Goldberg GI, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Wilhelm S, and He CS. Human 72-kD type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinases designated TIMP-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8207–8211, 1989.
8. Graham MF. Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease—An update. *Inflamm Bowel Dis* 1: 220–227, 1995.
9. Hovdenak N, Wang J, Sung CC, Kelly T, Fajardo LF, and Hauer-Jensen M. Clinical significance of increased gelatinolytic activity in the rectal mucosa during external beam radiation therapy of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 53: 919–927, 2002.
10. Lafuma C, El Nabout RA, Crechet F, Hovnanian A, and Martin M. Expression of 72-kDa gelatinase (MMP-2), collagenase (MMP-1), and tissue metalloproteinase inhibitor (TIMP) in primary pig skin fibroblast cultures derived from radiation-induced skin fibrosis. *J Invest Dermatol* 102: 945–950, 1994.
11. Macdonald TT. A mouse model of intestinal fibrosis? *Gastroenterology* 125: 1889–1892, 2003.
12. MacDonald TT and Pender SL. Lamina propria T cells. *Chem Immunol* 71: 103–117, 1998.
13. MacDonald TT and Pender SL. Proteolytic enzymes in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 4: 157–164, 1998.
14. Matthes H, Herbst H, Schuppan D, Stallmach A, Milani S, Stein H, and Riecken EO. Cellular localization of procollagen gene transcripts in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 102: 431–442, 1992.
15. McCawley LJ and Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 13: 534–540, 2001.
16. McKaig BC, McWilliams D, Watson SA, and Mahida YR. Expression and regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinases by intestinal myofibroblasts in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* 162: 1355–1360, 2003.
17. Milliat F, Strup C, Linard C, Lebrun F, Durand V, Lusinchi A, Bourhis J, Aigueperse J, Mathe D, and Vozenin-Brotans MC. New in vitro models to study the radiation-induced fibrogenic differentiation in the bowel (Abstract). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 55: 534, 2003.
18. Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, and Iredale JP. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 277: 11069–11076, 2002.
19. Nagase H and Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274: 21491–21494, 1999.
20. Okada A, Tomasetto C, Lutz Y, Bellocq JP, Rio MC, and Basset P. Expression of matrix metalloproteinases during rat skin wound healing: evidence that membrane type-1 matrix metalloproteinase is a stromal activator of pro-gelatinase A. *J Cell Biol* 137: 67–77, 1997.
21. Okuno T, Andoh A, Bamba S, Araki Y, Fujiyama Y, Fujiyama M, and Bamba T. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α induce chemokine and matrix metalloproteinase gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *Scand J Gastroenterol* 37: 317–324, 2002.
22. Pender SL, Salmela MT, Monteleone G, Schnapp D, McKenzie C, Spencer J, Fong S, Saarialho-Kere U, and MacDonald TT. Ligation of α 4ss1 integrin on human intestinal mucosal mesenchymal cells selectively up-regulates membrane type-1 matrix metalloproteinase and confers a migratory phenotype. *Am J Pathol* 157: 1955–1962, 2000.
23. Pirila E, Ramamurthy NS, Sorsa T, Salo T, Hietanen J, and Maisi P. Gelatinase A (MMP-2), collagenase-2 (MMP-8), and laminin-5 γ 2-chain expression in murine inflammatory bowel disease (ulcerative colitis). *Dig Dis Sci* 48: 93–98, 2003.
24. Pirila E, Sharabi A, Salo T, Quaranta V, Tu H, Heljasvaara R, Koshikawa N, Sorsa T, and Maisi P. Matrix metalloproteinases process the laminin-5 γ 2-chain and regulate epithelial cell migration. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 1012–1017, 2003.
25. Remy J, Wegrowski J, Crechet F, Martin M, and Daburon F. Long-term overproduction of collagen in radiation-induced fibrosis. *Radiat Res* 125: 14–19, 1991.
26. Salmela MT, MacDonald TT, Black D, Irvine B, Zhuma T, Saarialho-Kere U, and Pender SL. Upregulation of matrix metalloproteinases in a model of T cell mediated tissue injury in the gut: analysis by gene array and in situ hybridisation. *Gut* 51: 540–547, 2002.
27. Sandler NG, Mentink-Kane MM, Cheever AW, and Wynn TA. Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. *J Immunol* 171: 3655–3667, 2003.
28. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, and Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370: 61–65, 1994.
29. Schuppan D and Hahn EG. MMPs in the gut: inflammation hits the matrix. *Gut* 47: 12–14, 2000.
30. Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, and Van Wart HE. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 364–368, 1990.
31. Taipale J and Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J* 11: 51–59, 1997.
32. Theret N, Musso O, L'Helgoual'h A, and Clement B. Activation of matrix metalloproteinase-2 from hepatic stellate cells requires interactions with hepatocytes. *Am J Pathol* 150: 51–58, 1997.

33. Valente P, Fassina G, Melchiori A, Masiello L, Cilli M, Vacca A, Onisto M, Santi L, Stetler-Stevenson WG, and Albini A. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer* 75: 246–253, 1998.
34. Von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, and Rosewicz S. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 47: 63–73, 2000.
35. Vozenin-Brotans MC, Milliat F, Linard C, Strup C, Francois A, Sabourin JC, Lasser P, Lusinchi A, Deutsch E, Girinsky T, Aigueperse J, Bourhis J, and Mathe D. Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization. *Radiat Res* 161: 299–311, 2004.
36. Vozenin-Brotans MC, Milliat F, Sabourin JC, de Gouville AC, Francois A, Lasser P, Morice P, Haie-Meder C, Lusinchi A, Antoun S, Bourhis J, Mathe D, Girinsky T, and Aigueperse J. Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 56: 561–572, 2003.
37. Westermann W, Schobl R, Rieber EP, and Frank KH. Th2 cells as effectors in postirradiation pulmonary damage preceding fibrosis in the rat. *Int J Radiat Biol* 75: 629–638, 1999.
38. Willenbrock F and Murphy G. Structure-function relationships in the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Am J Respir Crit Care Med* 150: S165–170, 1994.
39. Winkler MK and Fowlkes JL. Metalloproteinase and growth factor interactions: do they play a role in pulmonary fibrosis? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L1–L11, 2002.
40. Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 5: 2145–2154, 1991.
41. Xu J, Benyon RC, Leir SH, Zhang S, Holgate ST, and Lackie PM. Matrix metalloproteinase-2 from bronchial epithelial cells induces the proliferation of subepithelial fibroblasts. *Clin Exp Allergy* 32: 881–888, 2002.
42. Zhao W, Spitz DR, Oberley LW, and Robbins ME. Redox modulation of the pro-fibrogenic mediator plasminogen activator inhibitor-1 after ionizing radiation. *Cancer Res* 61: 5537–5543, 2001.



VI. Analyse de l'expression génique différentielle et de la sécrétion des MMP et des TIMP, par des cellules musculaires lisses intestinales humaines en culture primaire.

1. Objectif de l'étude :

L'entérite radique est l'une des complications les plus communes des radiothérapies abdomino-pelviennes. Elle peut apparaître plusieurs mois à plusieurs années après la radiothérapie et altérer significativement la qualité de vie des patients. L'entérite radique est caractérisée par une fibrose transmurale sévère associée à un remodelage pathologique de la matrice extra cellulaire [Vozenin-Brotons *et al.* 2003] et [Strup-Perrot *et al.* 2004]. La formation de strictures est responsable de la perte des mouvements physiologiques existants entre la muqueuse et la musculature et génère la perte de la fonctionnalité intestinale qui dépend à la fois de la capacité de transport mais aussi de la motilité, et est responsable du péristaltisme. La contraction est contrôlée par le système nerveux entérique et assurée par les cellules musculaires lisses. L'implication structurale mais aussi fonctionnelle de ces cellules dans l'homéostasie du tissu conjonctif, la réparation, le remodelage et la fibrose, ne cesse de s'accroître [Graham 1995], [Pender *et al.* 2003]. Au cours du processus fibrogénique, les fonctions intestinales sont fortement altérées en raison d'une dysmotilité [Husebye *et al.* 1994] à laquelle s'ajoute un dépôt transmurale excessif de collagène sécrété par les myofibroblastes subépithéliaux de fibrose et les cellules musculaires lisses [Vozenin-Brotons *et al.* 2003]. Des travaux récents menés au laboratoire ont montré que le phénotype des cellules musculaires lisses est altéré dans l'entérite radique [Bourgier *et al.* 2004]. Puisque le phénotype de ces agents clés du renouvellement matriciel est altéré dans l'entérite radique, qu'en est-il de leur capacité de production de MMP et de TIMP?

2. Méthodologie :

Des cellules musculaires lisses « normales » issues de prélèvements intestinaux de patients ne présentant pas d'entérite radique, ou « radiques » issues de patients présentant une entérite radique, ont été mises en culture à partir de prélèvements provenant de résections chirurgicales, et ont été maintenue en culture primaire. Les ARN des cellules « normales » et « radiques » ont été extraits puis l'hybridation de membranes de macro array « cell interaction » a été réalisée. Le mode opératoire et l'analyse ont été exécutés comme cela à été précédemment décrit (travaux complémentaires iléon de rat et article III). Les surnageants de ces cellules ont été collectés et la sécrétion des MMP et TIMP d'intérêt à été quantifiée par dosage ELISA à l'aide des kits de dosage Amersham (MMP-2 RPN 2617, MMP-3 RPN 2613, MMP-9 RPN 2614, TIMP-1 RPN 2611 et TIMP-2 RPN 2618).

3. Résultats :

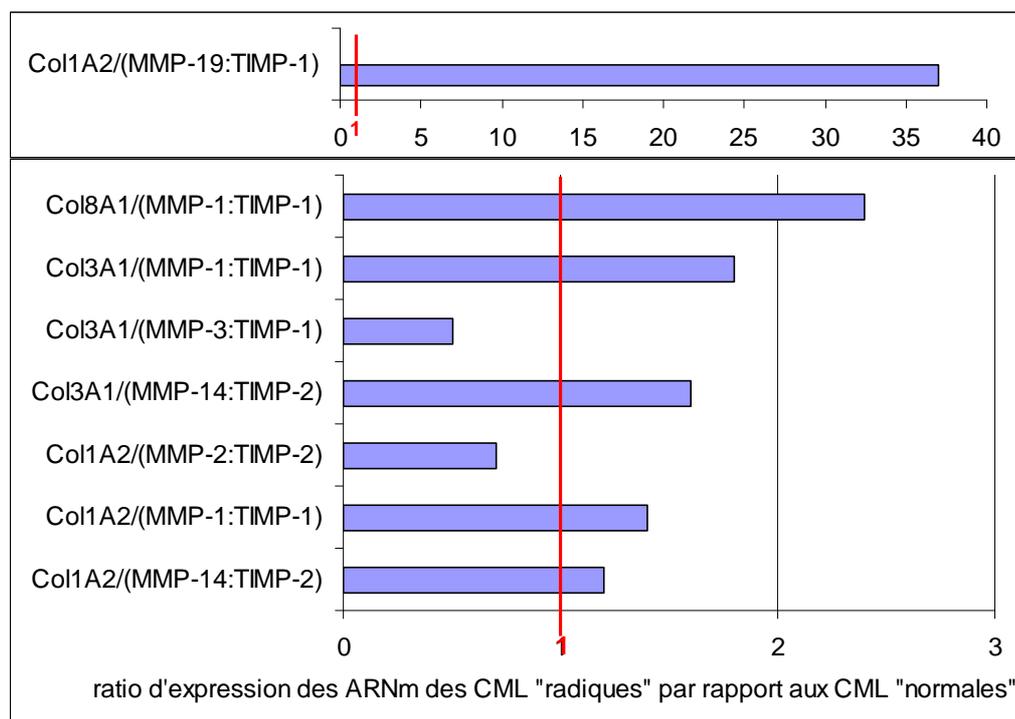
Les résultats obtenus par la technique de macro array, ciblés sur les MMP et les TIMP sont présentés dans le tableau ci-après. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires. Le bruit de fond, 12 pour les cellules «normales» et 15 pour les cellules « radiques » est soustrait des valeurs brutes.

Gènes d'intérêt	Cellules Normales	Cellules Radiques	Ratio	Gènes d'intérêt	Cellules Normales	Cellules Radiques	Ratio
MMP-1	88	67	0,76	COL1A2	8215	5822	0,71
MMP-2	336	699	2,08	COL2A1	69	100	1,45
MMP-3	296	789	2,66	COL3A1	2422	2221	0,92
MMP-7	18	29	1,61	COL4A2	55	92	1,67
MMP-8	15	21	non calculé	COL4A3	47	73	1,55
MMP-9	15	42	non calculé	COL4A6	45	67	1,49
MMP-10	9	13	non calculé	COL6A2	35	68	1,98
MMP-11	11	15	non calculé	COL6A3	545	744	1,36
MMP-12	8	10	non calculé	COL8A1	54	97	1,79
MMP-14	551	597	1,08	COL9A1	47	66	1,40
MMP-15	17	13	non calculé	COL11A2	16	32	2,00
MMP-16	16	18	non calculé	COL16A1	37	38	1,02
MMP-17	37	64	1,73	COL18A1	51	55	1,08
MMP-18/19	223	116	0,52				
TIMP-1	4140	6064	1,46				
TIMP-2	159	303	1,9				
TIMP-3	183	652	3,56				
TIMP-4	14	21	non calculé				

On notera que les cellules musculaires lisses intestinales normales produisent des ARNm codant pour l'ensemble des MMP, des TIMP et des collagènes. Toutefois il apparaît que certains de ces gènes sont préférentiellement exprimés: pour les MMP il s'agit des MMP-2, -3, -14 et -18/19, pour les TIMP ce sont les TIMP-1, -2 et -3 et pour les collagènes, des COL1A2, 3A1 et 6A3.

La comparaison du profil d'expression génique des cellules issues d'entérite radique à celui des cellules normales montre précisément une augmentation de l'expression des ARNm codant pour les MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-17, et les TIMP-1, TIMP-2 et TIMP-3. De la même manière, ces résultats mettent en évidence une surproduction des ARNm codant pour les collagènes, à l'exception de COL1A2 dont l'expression est

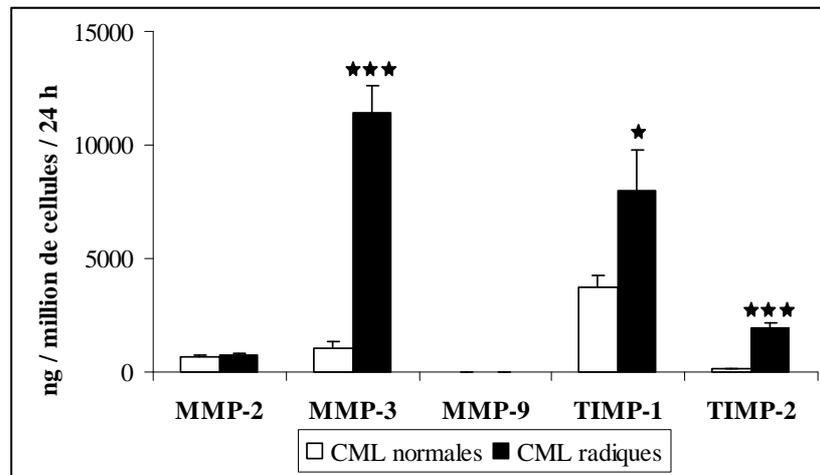
diminuée et COL3A1, 16A1 et 18A1 donc l'expression ne semble pas modifiée dans les cellules radiques. Pour affiner l'analyse de ces résultats nous avons utilisé la méthode développée par Sandler et collaborateurs basée sur les substrats préférentiels des MMPs et leur inhibiteur principal [Sandler *et al.* 2003]. L'expression des ARNm codant pour les collagènes est divisée par le rapport MMP sur TIMP. Les ratios obtenus pour les cellules « normales » servent de référence et leur valeur est ramenée à 1. Les valeurs sont présentées ci-dessous.



L'analyse de l'histogramme créé à partir des valeurs calculées, suggère que dans notre modèle de CML issues d'entérite radique, il y ait production nette d'ARNm codant pour les collagènes et ce malgré une augmentation significative de l'expression des ARNm codant pour la plupart des MMP. Cette donnée corrobore d'autres travaux qui ont précédemment mis en évidence le rôle joué par les CML dans les dépôts de collagènes observables dans l'entérite radique.

Nous nous sommes par ailleurs intéressés à la synthèse et à la sécrétion de MMP et de TIMP d'intérêts par ces CML « normales » et « radiques ». Les résultats de la

quantification réalisée dans les surnageants de culture sont présentés dans l'histogramme ci-après.



Il montre, sans surprise au vu des ARNm produits détectés par macro array, que les CML « normales » et « radiques » produisent de la MMP-2, de la MMP-3, du TIMP-1 et du TIMP-2. Par contre, aucune sécrétion de MMP-9 n'a put être détectée, alors que des messagers étaient détectés mais à de faibles niveaux, dans les deux groupes de cellules. L'étude de ce graphique montre que le statut des CML ne semble pas avoir d'influence sur la sécrétion de MMP-2 ($P = 0.283$) et sur l'absence de sécrétion de MMP-9. La provenance des cellules semble, contrairement à ce qui a été montré pour MMP-2 et -9, fortement influencer la sécrétion de MMP-3, TIMP-1 et TIMP-2. En effet pour les CML « radiques », par rapport aux CML « normales », on note une forte augmentation significative de la sécrétion de MMP-3 ($\times 11$, $P < 0.001$) et de TIMP-2 ($\times 13$, $P < 0.001$), et une élévation plus modérée de la sécrétion de TIMP-1 ($\times 2$, $P = 0.027$).

4. Conclusion :

L'analyse globale des résultats fournis par cette étude montre d'une part qu'il n'y a pas forcément d'adéquation algébrique entre l'expression des ARNm détectés par le macro array et la quantité de protéines synthétisées et sécrétées dans le milieu de culture. D'autre part cette étude met en lumière la surexpression conjointe par les

CML de patients présentant une entérite radique, de MMP et de TIMP, ici de MMP-3 et de TIMP-1 et -2. Les cellules « normales » produisent des faibles quantités de MMP-2 et -3 et pas de MMP-9, très peu de TIMP-2 ce qui limite l'activation de la proMMP-2, et une quantité moyenne de TIMP-1. La comparaison des valeurs déterminées par ELISA pourrait laisser penser que la balance existant entre la dégradation et l'accumulation de la matrice extracellulaire est globalement en équilibre. Il semble en être tout autrement pour les CML « radiques ». En effet même si ces dernières produisent de très grandes quantités de MMP-3, elles engendrent aussi de très grandes quantités de TIMP-2, inhibant ainsi la proMMP-2. Elles produisent par ailleurs des quantités non négligeables de TIMP-1 et potentiellement du TIMP-3 dont l'expression de l'ARNm est augmentée d'un facteur 3,5. Au vu de ces résultats il semble que l'équilibre de la balance dégradation / accumulation soit déplacé dans le sens de l'accumulation de matrice extracellulaire. Cette observation est très largement corroborée par l'analyse des transcrits produits faite par la méthode de Sandler qui met très nettement en lumière une production de collagènes en excès par rapport à la balance MMP/TIMP par ces cellules. Il est par ailleurs intéressant de noter que la sur-production de MMP-3 s'accompagne d'une diminution de 24% de l'expression des ARNm codant pour la proMMP-1. On peut se demander si cette sur-production n'a pas pour but de compenser la diminution de l'expression de MMP-1. Des résultats similaires concernant MMP-3 et TIMP-1 ont été mis en évidence par S. Pender [Pender *et al.* 2003] à partir de prélèvements tissulaires provenant d'enfants présentant une entérocolite nécrosante. En effet, dans ces prélèvements d'intestins grêles, par rapport à des prélèvements d'intestins normaux, une forte augmentation des expressions géniques et protéiques de MMP-3 et TIMP-1 ont été mise en évidence tandis que les expressions des gélatinases et de TIMP-2 n'étaient pas modulées. Une étude immunohistochimique des échantillons a permis de montrer que ce sont les cellules musculaires lisses qui sont la source de la MMP-3. La surproduction de MMP-3 par des CML, qu'elles proviennent d'entérites radiques ou nécrosante est une donnée

assez récente qui confère à ces cellules un potentiel lésionnel tout à fait nouveau jusqu'à présent exclusivement attribué aux cellules inflammatoires et aux myofibroblastes.

Partie III : Discussion générale

Les progrès réalisés dans le diagnostic et la prise en charge des accidents d'irradiation permettent de prolonger la vie des patients irradiés accidentellement. Cependant, comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce mémoire, l'irradiation cause des lésions aiguës mais aussi des effets tardifs dont le développement et la sévérité dépendent de l'organe exposé mais également du volume irradié, de la dose reçue, de la radiosensibilité inter-individuelle, mais aussi de facteurs génétiques et épigénétiques. Ces patients pourraient à moyen et long terme développer des pathologies radio-induites chroniques de type radiofibrose voire radionécrose pour lesquelles il n'existe actuellement aucun traitement satisfaisant [Hauer-Jensen *et al.* 2003]. L'exposition aux rayonnements ionisants peut aussi survenir dans le cas du traitement des cancers. Ainsi, les doses d'irradiation nécessaires au contrôle tumoral des cancers de la sphère abdomino-pelvienne, engendrent des phénomènes de toxicité intestinale aiguë et tardive. Ces complications peuvent avoir un impact clinique très important et affecter la qualité de vie des patients [Denham *et al.* 2001] [Denton *et al.* 2002].

L'exposition du tissu vivant à des rayonnements ionisants, induit une série d'altérations moléculaires et cellulaires complexes qui se traduisent par des effets cellulaires, structuraux et fonctionnels. Leur gravité est fonction de la nature du rayonnement, de la dose délivrée, du débit de dose, de la nature et de l'étendue des champs irradiés. Deux hypothèses s'affrontent sur les mécanismes qui pourraient expliquer la genèse des effets aigus de l'irradiation. La première, émise par le groupe de Potten, prétend que l'irradiation de l'épithélium digestif provoque la mort massive des cellules du compartiment progéniteur épithélial dans les heures qui suivent l'exposition aux rayonnements. Les mécanismes de repopulation de l'épithélium sont alors fortement perturbés en particulier si les cellules souches sont détruites [Gunter-Smith PJ 1995]. Lorsque les cellules différenciées desquameront par le processus physiologique de renouvellement cellulaire, elles ne seront plus remplacées et un phénomène d'ulcération massive pourra se produire. La seconde hypothèse, émise par

le groupe de Kolesnick, soutient que la cellule endothéliale est la cible primaire de l'irradiation, et qu'elle est par conséquent à l'origine même du syndrome gastro-intestinal [Paris *et al.* 2001]. Ainsi l'apoptose initiale des cellules endothéliales engendrerait de façon secondaire l'apoptose des cellules épithéliales et l'ulcération muqueuse. La dénudation épithéliale provoque la perte de la fonction de barrière et engendre le contact du compartiment sous-muqueux avec des agents du non-soi (la flore intestinale, les acides biliaires...) particulièrement délétères pour les cellules vasculaires et mésenchymateuses. Il se forme alors un tissu de granulation visant à combler la perte de substance et à produire une ré-épithélialisation rapide pour restaurer la fonction de barrière. Ce processus nécessite le remodelage de la matrice extracellulaire dans lequel les MMP et les TIMP sont des agents clefs. Si l'implication de ces enzymes et de leurs antagonistes est bien connue et décrite dans d'autres systèmes, leur rôle dans le remodelage intestinal est assez peu documenté.

Des données cliniques et expérimentales proposent l'existence d'un lien direct entre la sévérité de l'atteinte aiguë et le développement des effets tardifs intestinaux. En effet une corrélation entre la sévérité des complications radio induites aiguës et le développement de complications intestinales et coliques tardives a été suggérée par des études cliniques [Wang C. J. *et al.* 1998] et expérimentales [Denham *et al.* 2000]. Aujourd'hui les nombreux progrès réalisés dans la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la réponse tissulaire aux rayonnements ionisants, permettent **d'envisager l'existence d'un continuum entre les étapes d'initiation, de développement et de persistance des lésions radio-induites, donc entre les effets aigus et les effets tardifs.**

Nous nous sommes par conséquent intéressés à **l'implication des MMP et des TIMP dans le remodelage matriciel intestinal, lors des manifestations aiguës, mais aussi tardives de l'irradiation.**

Il n'existe pas de modèle expérimental idéal pour étudier à la fois les effets aigus et les effets tardifs. En effet s'il les effets tardifs ont été étudiés à partir de prélèvements opératoires de patients présentant un entérite radique tardive, il est éthiquement impossible de réaliser des prélèvements pendant la phase aiguë de la réponse à l'irradiation soit au cours de la radiothérapie. C'est pour cette raison que nous avons fait appel à un modèle expérimental pour étudier la phase aiguë de la réponse tissulaire à l'irradiation. Pour ce faire, nous avons utilisé le seul modèle expérimental qui était en place au laboratoire lorsque nous avons débuté cette étude : l'irradiation abdominale X de rat à 10 Gy. Ce modèle permet de modéliser l'irradiation en dose unique rencontrée dans les accidents et génère des dysfonctionnements intestinaux radio-induits tels que la diarrhée, qui s'accompagnent d'un important remodelage matriciel.

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la réponse tissulaire aiguë aux rayonnements ionisants. L'irradiation induit : des effets fonctionnels, la mort cellulaire, la production de médiateurs solubles, la constitution d'une matrice extracellulaire particulière, la différenciation pathologique des cellules survivantes. Nous aborderons successivement ces différents points.

- L'irradiation induits des effets fonctionnels :

La perte muqueuse s'accompagne de dysfonctionnements majeurs au niveau de l'intestin grêle qui se traduisent entre autre par des épisodes diarrhéiques (J3-J5), caractéristiques des dysfonctionnements intestinaux radio-induits [Dublineau *et al.* 2002]. I. Dublineau et collaborateurs ont montré qu'ils sont dus à la perte de l'intégrité de la barrière intestinale, qui se traduit entre autre par une diminution marquée de la résistance tissulaire épithéliale mais aussi par une augmentation massive de la perméabilité au mannitol, une forte désorganisation des protéines des jonctions

serrées et adhérentes ZO-1 et β -caténine. Sept jours après irradiation, un rétablissement de l'organisation des protéines fonctionnelles a été observé concomitamment avec un retour à la normale de la perméabilité intestinale [Dublineau *et al.* 2004].

- L'irradiation induit la mort cellulaire :

L'exposition de rats, à une irradiation abdominale X de 10 Gy, induit une atteinte tissulaire marquée qui se traduit, entre autre, par une atteinte de la muqueuse et plus particulièrement des cellules épithéliales. Nos observations histologiques sont en accord avec les résultats de Rubio et Jalnäs publiés en 1996 et ceux plus récents d'Isabelle Dublineau et collaborateurs [Rubio, Jalnäs 1996; Dublineau *et al.* 2004]. Le pic lésionnel est atteint à J3 avec une diminution de près de 30% de la profondeur des cryptes et de 22% de la hauteur des villosités. Cette constatation morphométrique, est complétée par des données plus moléculaires qui démontrent grâce à l'utilisation de la technique du macro array, que la perte cellulaire est majoritairement entérocytaire. En effet nous avons pu noter, trois jours après exposition, une diminution de près de 51% de l'expression des ARNm codant pour l'Apo A_I chez les animaux irradiés par rapport aux animaux témoins, témoignant d'une perte entérocytaire massive, cette répression s'accompagne d'une diminution globale de l'activité métabolique révélée par diminution, de près de 90% de l'expression des ARNm codant pour la Fatty Acid Synthase, de 88 % pour ceux de l'IFABP et de 94% pour les ARNm de la LFABP. Sept jours après irradiation, le processus cicatriciel est en phase de résolution, la muqueuse paraît histologiquement normale et présente une augmentation globale de son épaisseur classiquement décrite. En effet la hauteur des villosités est supérieure de 21% aux témoins et les cryptes montrent une profondeur supérieure de 20% aux témoins. Ces données histologiques sont appuyées par le retour à des valeurs équivalentes à celles détectées chez les animaux témoins, pour IFABP et LFABP, et en phase de recouvrement pour FAS et Apo A_I, qui traduisent la reconstitution du pool

entérocytaire et le recouvrement de leur activité métabolique. Cependant on notera que la différenciation entérocytaire matérialisée ici par l'expression des ARNm codant pour l'Apo A_{IV} n'est pas encore revenue à la normale à J7 puisque ces ARNm sont toujours diminués de 54% par rapport aux animaux témoins.

Les cellules épithéliales ne sont pas les seules cibles de l'irradiation. En effet une atteinte précoce des cellules endothéliales de la microvascularisation intestinale a été décrite [Paris *et al.* 2001]. En effet elles entrent en apoptose 4 h après exposition aux rayonnements ionisants et génèrent alors des signaux de mort vers les cellules du compartiment progéniteur épithélial qui entreront à leur tour en apoptose 6 heures après irradiation. L'atteinte des myofibroblastes a aussi été montrée [Naftalin 2004]. La disparition radio-induite de ces cellules a des conséquences négatives sur la production de la matrice extracellulaire puis en cascade sur le devenir des entérocytes [Liu *et al.* 1999] et sur le processus de restauration tissulaire à part entière [Basson *et al.* 1992] (revue dans Denham [Denham, Hauer-Jensen 2002]). L'importance du micro-environnement matriciel, tant au niveau structural qu'au niveau fonctionnel, est clairement établie.

- L'irradiation induits la production de médiateurs solubles :

L'interaction des rayonnements ionisants avec un tissu vivant provoque des processus d'ionisation et la production d'effecteurs secondaires que sont les radicaux libres et les ROS. Ils engendrent des lésions moléculaires conduisant à une réaction inflammatoire plus ou moins spécifique et dont l'intensité peut varier avec la dose reçue et le tissu. Cette réaction inflammatoire entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire, qui engendre localement le recrutement de leucocytes, l'extravasation des protéines sériques et l'activation du système de coagulation. Les leucocytes recrutés et les facteurs pro-coagulants comme la thrombine, facilitent l'adhésion des PNN à la surface des cellules endothéliales. Dans notre étude la réaction inflammatoire est caractérisée par l'augmentation de la synthèse du TNF- α et d'IL-1 β dès 6 h après irradiation et la

sur-expression des ARNm codant pour l'IL-8. Ces modulations moléculaires s'accompagnent d'une augmentation de l'infiltration neutrophilique. Ces résultats sont en accord avec les travaux de C. Linard [Linard *et al.* 2004] qui montrent en plus que l'irradiation induit un déséquilibre de la balance entre cytokines pro inflammatoires et anti-inflammatoires, en faveur de la production des cytokines pro inflammatoires. Ce déséquilibre moléculaire pourrait être le reflet d'un déséquilibre cellulaire affectant la balance entre les lymphocytes T helper de type1 et T helper de type2, qui sont fortement impliqués dans le remodelage de la matrice extra-cellulaire. Les Lymphocytes Th1 synthétisent de l'interféron- γ , des cytokines pro inflammatoires ainsi que des MMP, induisant ainsi la dégradation des constituants matriciels et possiblement des lésions tissulaires, alors que contrairement aux LTh1, les LTh2 synthétisent des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-13 et des TIMP, stimulant ainsi la synthèse de constituants matriciels, participant potentiellement au phénomène fibrotique [Wynn 2004]. Il apparaît que la destruction des voies sensitives afférentes par la capsaïcine diminue la production d'IL-1 β et de substance P et rétablit la contractilité [Linard *et al.* 2003a], suggérant le caractère neurogénique de la réaction inflammatoire radio-induite. Il apparaît à la lumière de ces données que la mise en place de ce processus inflammatoire intestinal soit impliqué dans les désordres intestinaux radio-induits que nous avons constatés après exposition des rats à une irradiation abdominale X de 10 Gy.

Les facteurs de croissance pro-fibrogéniques comme le TGF- β , sont aussi impliqués dans la cicatrisation des lésions muqueuses [Dignass,Podolsky 1993] [Beck *et al.* 2003]. Des études antérieures ont montré que les trois isoformes du TGF- β sont sur-exprimées dans les phases précoces de lésions radio-induites alors que le TGF- β 1 semble être la forme exprimée de façon prédominante dans les phases tardives [Wang J.,Robbins 1996; Ruifrok *et al.* 1997]. Dans notre étude nous avons observé une

induction de l'isoforme $\beta 2$ 24h après exposition alors que les isoformes $\beta 1$ et $\beta 3$ sont sur-exprimées à J3 concomitamment avec le début de la restauration tissulaire.

- L'irradiation induit la constitution d'une matrice extracellulaire particulière :

Outre la perte cellulaire et la réaction inflammatoire provoquées par l'irradiation, nos études ont montré que l'exposition à une irradiation abdominale de 10 Gy entraîne concomitamment à l'apparition des lésions tissulaires, une modification de l'équilibre physiologique existant entre dégradation et accumulation des constituants matriciels. En effet les concentrations et l'activité de la gélatinase A sont significativement et durablement augmentées dans l'intestin et le colon. Cette augmentation est due au moins partiellement à l'augmentation de son expression génique. Le remodelage post radique observé ne semble mettre en jeu la MMP-9 constitutivement produite et stockée dans les granules des polynucléaires neutrophiles, qu'au niveau colique, et de façon tout à fait modérée, ce qui paraît en accord avec la faible intensité de l'infiltration neutrophilique observée après irradiation. De même nos études suggèrent que MMP-1 et MMP-3 sont faiblement impliquées dans le remodelage post radique. En effet l'expression protéique de ces enzymes ne semble pas significativement radio-modulée et aucune activité n'a pu être mise en évidence par zymographie. Nos études sur l'intestin et le colon mettent en évidence une sur-expression de la MMP-14 après irradiation, ce qui n'avait jamais été montrée au préalable. Récemment, cette MMP membranaire a été impliquée dans l'activation de la proMMP-2 [Holmbeck *et al.* 2004], aussi sa sur-expression précoce dans l'intestin peut influencer de façon décisive la balance nette existant entre dégradation et accumulation des constituants matriciels. En effet l'augmentation concomitante de l'expression de la proMMP-2 et de la MMP-14 permet d'activer la proMMP-2 en MMP-2 pendant la phase de remodelage intense qui s'opère entre J1 et J3. Par ailleurs, nous avons montré que l'altération radio-induite de la structure de la muqueuse colique est concomitante à l'induction locale des MMP impliquées dans la dégradation de la membrane basale (MMP-2, -3 et -9) à J1 et J3. A

ces MMP viennent s'ajouter des molécules pouvant activer ces enzymes, comme les membres de la cascade plasminogène/plasmine [Sternlicht, Werb 2001], dont les expressions sont augmentées pendant la phase de dénudation. La génération de la plasmine à partir du plasminogène est régulée par de complexes interactions s'exerçant entre des activateurs et des inhibiteurs. Classiquement le plasminogène est décrit comme étant activé en plasmine par l'action de l'U-PA ou du t-PA. Dans notre étude ces deux activateurs sont sur-exprimés dès J1 après irradiation, suggérant que le système plasminogène/plasmine est fortement activé par les rayonnements ionisants, comme cela a déjà été montré dans les études de Rao, Boothman et Sawaya [Boothman *et al.* 1991; Rao *et al.* 1994; Sawaya *et al.* 1994]. En outre, notre étude a mis en évidence une sur-expression concomitante de PAI-1, permettant ainsi de limiter l'activation du plasminogène.

Enfin, après avoir étudié l'expression, des effecteurs moléculaires impliqués dans la synthèse des MMP et dans leur activation, nous nous sommes intéressés à celle des antagonistes tissulaires des MMP, les TIMP, et plus particulièrement à TIMP-1 et TIMP-2. Dans notre étude, l'expression de TIMP-1 et TIMP-2 est particulièrement intense à J3 et pourrait alors mettre fin au processus lésionnel tissulaire par l'inhibition directe de la dégradation de la matrice extracellulaire

Les niveaux d'expression des MMP excèdent significativement celui de TIMP-1. Mais il faut noter que TIMP-2 possède une fonction bimodale et promeut l'activation de la proMMP-2 quand il est associé, sous forme de complexe moléculaire à la proMMP-2 et à la MMP-14 [Wang Z. *et al.* 2000b]. Dans ce cadre, la production de MMP-14 semble être un facteur limitant l'activation de la proMMP-2 de première importance [Werb 1997]. Dans notre étude, MMP-14 et TIMP-2 sont sur-exprimés après irradiation, et les ratios MMP-14/TIMP-2 et MMP-2/TIMP-2 semblent être en faveur de l'activation de la proMMP-2 à J1.

Le cumul de nos données concernant les MMP, les TIMP et les effecteurs du système plasminogène/plasmine, montre que dans les jours qui suivent une irradiation

X abdominale de 10 Gy, l'équilibre MMP/TIMP est rompu. C'est l'activité métalloprotéasique qui est privilégiée, facilitant la dégradation des constituants de la matrice extracellulaire, et plus particulièrement de la lame basale, permettant ainsi le remodelage et la réparation des dommages tissulaires radio-induits. Ce déséquilibre en faveur de la dégradation des constituants matriciels est en voie de résolution à J7, laissant présager un bon fonctionnement du système de cicatrisation tissulaire.

- L'irradiation induit la différenciation pathologique des cellules survivantes : Parallèlement aux points évoqués plutôt, l'exposition aux rayonnements ionisants, induit une différenciation pathologique des cellules qui n'ont pas été détruites par l'irradiation. En effet elle active les cellules endothéliales ce qui provoque l'induction de molécules d'adhésion comme la P-sélectine [Hallahan, Virudachalam 1999; Molla *et al.* 2001], qui permettent le recrutement des leucocytes, la dédifférenciation des cellules musculaires lisses vasculaires en cellules productrices de matrice extra-cellulaire, et la transdifférenciation des fibroblastes/myofibroblastes et des cellules musculaires lisses, aux propriétés contractiles, en cellules aux propriétés sécrétoires comme nous l'avons montré pour les cellules musculaires lisses intestinales provenant de patients présentant une entérite radique et comme cela a été expérimentalement mis en évidence dans d'autres études [Vujaskovic *et al.* 2001] [Alexakis *et al.* 2001; Heckenkamp *et al.* 2004] .

Les études que nous avons menées chez le rat nous ont permis de mettre en évidence des différences notables entre l'iléon et le colon, dans la participation des acteurs impliqués dans le remodelage post-radique aigu, tant au niveau moléculaire que cellulaire. C'est le cas de la MMP-9 dont l'expression génique et l'activité enzymatique ne semblent pas être radio-modulées dans l'iléon, alors que l'exposition aux rayonnements ionisants augmente son expression génique et son activité dans le colon. Par ailleurs, il semble que la réaction inflammatoire radio-induite soit plus

importante dans le colon que dans l'iléon ce qui pourrait expliquer la différence des niveaux d'expression génique de la MMP-9 entre ces deux sites. En effet les niveaux d'expression des ARNm codant pour l'IL-8, le TNF- α et l'IL-1 β y sont respectivement 2,5 fois, 5 fois et trois fois plus élevés. Cependant l'implication des éléments majeurs du remodelage post-radique aigu que sont MMP-2, -14, de TIMP-1, ainsi que des éléments du système plasminogène/plasmine, est commune aux deux sites intestinaux, même s'il apparaît que les niveaux d'expression génique sont plus élevés dans l'iléon que dans le colon. Par opposition, alors que l'expression génique de TIMP-2 est fortement augmentée dans l'iléon, elle n'est pas modulée dans le colon. Il semble que la non participation des MMP-1 et -7, au remodelage radio-induit soit de mise dans l'iléon et le colon.

Si la balance entre dégradation et accumulation des constituants matriciels, est fortement déséquilibrée en faveur de la dégradation à J1 et J3, à J7 celle-ci semble se rééquilibrer. Il n'en est pas de même dans les maladies inflammatoires intestinales où l'implication des MMP dans les remodelages pathologiques observés est bien décrite. Un certain nombre de points communs lient les conséquences tissulaires d'une irradiation intestinale et les maladies inflammatoires intestinales chroniques, comme l'atrophie villositaire, la synthèse et la sécrétion de médiateurs inflammatoires, l'implication des MMP dans le remodelage matriciel.

Dans ces maladies, c'est la régulation immune de l'intégrité de la muqueuse qui semble être responsable des lésions tissulaires observées. Les travaux de T. Mac Donald et S. Pender ont établi des liens entre les observations concernant les modifications des taux de MMP et les acteurs cellulaires retrouvés dans les biopsies analysées. Leur hypothèse met en avant le rôle joué par les cellules T dans la modification de l'expression des MMP, dans la physiopathologie de l'IBD, et s'appuie sur leurs propres travaux et les observations effectuées entre autres par Bailey et

Saarialho-Kere [Saarialho-Kere U. K. *et al.* 1996b] [Bailey *et al.* 1994]. Ces observations mettaient en évidence une augmentation de la MMP-9, localisée dans les polynucléaires infiltrés dans les biopsies de colite ulcéreuse ou de Crohn, de la MMP-3 dans les cellules mononuclées infiltrées dans les biopsies montrant une pathologie digestive et de MMP-3 extracellulaire dans les zones lésées. Cette augmentation de la production de MMP-3 par la muqueuse dans le cadre de la maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse en phase active a aussi été montrée par d'autres auteurs [Louis *et al.* 2000] qui l'ont corrélée à la concentration en IL-6 et TNF- α .

Les cellules T activées causent des lésions à la muqueuse de deux façons : soit via leur cytotoxicité en tuant les cellules adjacentes, soit par le biais de la production de cytokines pro-inflammatoires qui vont à leur tour, activer les cellules endothéliales. Celles-ci vont alors acquérir un phénotype thrombogène et attirer encore plus de cellules inflammatoires de la circulation vers le tissu qui vont à leur tour être activées par les molécules produites par les cellules T activées comme l'IFN- γ , le TNF- α ou encore l'IL-1 β . Il apparaît que cette dernière voie est la plus importante. Bien que ces cytokines aient un effet bien documenté sur les cellules épithéliales ou endothéliales, il semble que cet effet direct ne joue qu'un rôle mineur. T. MacDonald et S. Pender considèrent que l'altération de la balance cytokinique normale entraîne la production endogène et la sécrétion de MMP qui vont altérer et endommager la muqueuse du tractus intestinal [MacDonald *et al.* 1998]. Normalement, dans le tractus intestinal, les cellules stromales secrètent de faibles taux de MMP, qui permettent la dégradation contrôlée de la matrice extracellulaire et ainsi les processus physiologiques de migration et de cicatrisation tissulaires. Cette dégradation physiologique est contrôlée par la sécrétion concomitante des antagonistes tissulaires de ces enzymes, comme l' α 2-macroglobuline ou les TIMP, qui préviennent un potentiel excès d'activité de ces enzymes. Les cytokines pro-inflammatoires peuvent stimuler rapidement l'expression des MMP, cependant sans altérer la production des TIMP, montrant ainsi quel potentiel

lésionnel élevé elles ont sur la muqueuse. Cette idée avait été avancée par les auteurs dans leur étude utilisant un modèle *ex vivo* d'inflammation intestinale médiée par les cellules T, ou les cellules T de la *lamina propria* d'explants foetaux d'intestin grêle humain en culture étaient polyclonalement activés par la PWM [Pender *et al.* 1996; Pender *et al.* 1997]. Il en résultait une expansion massive des cellules T CD3+, tout comme dans les cas de la maladie céliaque ou de la maladie de Crohn. Cette réponse est fortement orientée Th1, et génère dans les trois à quatre jours suivant un tel traitement de fortes lésions tissulaires et la destruction de la muqueuse. Les surnageants des explants analysés ont révélé de fortes concentrations en MMP-1 et MMP-3. De façon intéressante l'utilisation d'inhibiteurs de MMP prévient les lésions sans toutefois avoir d'action sur l'activation des cellules T. Les cultures de cellules stromales secrètent de forts taux de MMP-1 et -3 s'il elles sont stimulées par du TNF- α ou de l'IL-1 β et l'utilisation d'une protéine de fusion Ig humaine-récepteur au TNF P55 prévient les lésions induites par le traitement à la lectine PWM et la production de MMP-3, ce qui met en lumière le potentiel inducteur de MMP-3 joué par le TNF- α . C'est certainement par cette voie que l'excès de TNF- α détecté dans les IBD cause des lésions tissulaires. En effet la stromélysine -1 dégrade de façon particulièrement efficace la muqueuse intestinale, grâce à sa large spécificité, elle fonctionne comme une collagénase de type IV ce qui lui permet de détruire les membranes basales. De par sa grande efficacité à cliver les protéoglycans de surface impliqués dans la signalisation cellulaire et la présentation des facteurs de croissance, à détruire la matrice extracellulaire de la lamina propria, la MMP-3 est une molécule de destruction particulièrement efficace. L'utilisation de stratégies anti TNF- α est efficace dans la maladie de Crohn parce que la neutralisation de cette cytokine inflammatoire interrompt la synthèse de MMP-3 par les cellules stromales stimulées par le TNF- α . Par ailleurs, [De Winter *et al.* 2002] et collaborateurs ont mis en évidence une collaboration particulièrement étroite entre lymphocytes et cellules épithéliales *in vivo*,

dépendant des cytokines localement produites par les cellules épithéliales qui régulent régionalement les réponses immunes sans qu'aucune modification systémique ne soit observable.

L'ensemble de ces données suggère que les cellules T et les polynucléaires neutrophiles pourraient être des effecteurs cellulaires de première importance dans le remodelage post radique, donc l'action pourrait comme dans les IBD être impliquée dans les lésions muqueuses et les dysfonctions tissulaires que nous observons après irradiation. C'est dans ce cadre que nous avons réalisé l'étude de l'expression des cellules CD8a+ dans l'iléon de rat par immunohistochimie. Nos résultats montrent très nettement la disparition extrêmement rapide de ces cellules après irradiation et le non retour à une situation normale à J7, mettant ainsi en lumière la non implication des cellules T cytotoxiques dans les lésions tissulaires observées. Les polynucléaires neutrophiles, mis spécifiquement en évidence par le marquage immunohistochimique de la myeloperoxydase, ne sont que très modérément infiltrés dans le tissu suite à l'irradiation, ce qui est en accord avec la faiblesse de l'activité MMP-9 mise en évidence après irradiation.

Comme nous venons de le voir, l'irradiation induit des effets aigus qui se développent de façon concomitante et qui pourraient converger pour constituer les effets tardifs. Si plusieurs hypothèses sur les mécanismes conduisant à la fibrose radio-induite s'affrontent il n'en demeure pas moins que l'entérite radique est caractérisée avant tout par un déséquilibre de la balance régissant l'équilibre physiologique normal s'opérant entre dégradation et accumulation des constituants matriciels, dont la résultante nette est l'accumulation pathologique de matrice extracellulaire. **Mais, la fibrose caractérisant l'entérite radique est-elle due à une inhibition de la dégradation des constituants matriciels, une augmentation de l'inhibition de la dégradation ou à un dépôt excessif de ces constituants ?**

Le modèle que nous avons utilisé pour étudier les effets aigus de l'irradiation ne permet pas de générer d'effets tardifs. Pour remplir cette lacune deux autres modèles d'entérite radique expérimentale ont été mis en place chez le rat au laboratoire assez récemment. Ces derniers permettent d'explorer les deux postulats actuellement proposés qui pourraient expliquer le développement des effets tardifs et d'identifier les processus d'initiation de la fibrose radio induite.

- Le premier postulat propose que **les effets tardifs se développent comme la conséquence des effets aigus**, c'est le « consequential late effect » des anglo-saxons. Deux hypothèses sont mises en avant.

L'hypothèse conséquentielle développée par Dörr et collaborateurs [Dorr,Hendry 2001] met en avant que la sévérité de l'atteinte muqueuse précoce détermine l'apparition des effets tardifs. Dans ce concept, la perte des cellules souches, la diminution du nombre des cellules fonctionnelles, la perte des propriétés de barrière et l'inflammation radio-induites conduisent à la dénudation et à l'ulcération de la muqueuse. Cette réponse aiguë à l'irradiation a des répercussions sur le mésenchyme et crée des dommages supplémentaires qui se traduisent par des effets tardifs de type fibrose.

La genèse du processus fibrotique radio-induit à plusieurs éléments que sont la mort cellulaire, les médiateurs secondaires et les effets fonctionnels. Elle incrimine la mort cellulaire radio-induite précoce des compartiments à renouvellement cellulaire rapide (cellules de la muqueuse intestinale et de la micro vascularisation) mais aussi à renouvellement plus lents (cellules mésenchymateuses). De même, les facteurs paracrins pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, IFN- γ) et facteurs de croissance pro-fibrosants (CTGF, TGF- β et PDGF) seraient impliqués dans ce processus. L'activation des cellules endothéliales, la dédifférenciation des cellules musculaires lisses vasculaires en cellules productrices de matrice, la transdifférenciation des fibroblastes en myofibroblastes de fibrose, l'acquisition par les

cellules musculaires lisses d'un phénotype sécrétoire, regroupées en effets fonctionnels, ont pour conséquence un déséquilibre du remodelage matriciel et comme résultante nette l'accumulation des constituants matriciels. La sévérité des effets tardifs est proportionnelle à la sévérité des lésions aiguës. Ce mécanisme est impliqué dans les lésions faisant suite à une irradiation accidentelle localisée et à dose forte. Pour étudier un tel mécanisme, le modèle d'étude mis en place au laboratoire est une irradiation dose unique d'une anse grêle extériorisée après laparotomie au moment de l'irradiation. Ce modèle permet de développer une fibrose dite « conséquentielle », résultant de la persistance et de la non cicatrisation d'ulcérations muqueuses précoces.

- Le second postulat en vigueur avance que **les effets tardifs se développent suite à l'irradiation du compartiment conjonctif et à la déplétion des cellules parenchymateuses et stromales**, qui se traduira par une pathologie tardive avec accumulation de matrice extra-cellulaire. Ce mécanisme est défini par les anglo-saxons comme le « primary late effect ». Cette hypothèse met en avant le rôle de la différenciation myofibroblastique dans l'entérite radique. L'irradiation induirait la différenciation fibrogénique des cellules du mésenchyme intestinal (CML, myofibroblastes sub épithéliaux et fibroblastes) dont l'activation chronique conduirait à la surproduction de matrice extracellulaire et à la fibrose.

Pour étudier ce mécanisme, le modèle mis en place au laboratoire consiste à fixer définitivement par chirurgie une anse grêle dans le scrotum du rat après castration, ce qui permet l'irradiation fractionnée d'une même anse grêle et ainsi de modéliser la fibrose radique primaire.

Toutes les maladies fibrotiques, quelle que soit leur origine, ont en commun la surproduction de matériel matriciel, cependant les mécanismes conduisant au dépôt de constituants matriciels restent à ce jour mal connus. En effet, dans la maladie de Crohn, une surproduction des transcrits codant pour les collagènes de type I, III, IV, V a été observée [MATTHES *et al.* 1993]. L'approche génique globale mise en place au laboratoire, rendue possible par la mise en œuvre de techniques de type macro array, nous a permis d'avoir une vue d'ensemble et intégrée du remodelage matriciel. L'analyse des données que nous avons obtenues à partir des échantillons de patients présentant une entérite radique a mis en évidence, une sur-expression des transcrits codants pour les collagènes I, III, IV, V, VIII, tenascine-C et SPARC [Strup-Perrot *et al.* 2004; Vozenin-Brotons *et al.* 2004]. Ces données concordent d'une part avec les observations biochimiques de notre groupe [Vozenin-Brotons *et al.* 2003] mais aussi ceux de Daburon, Rubin et Hauer-Jensen sur des modèles variés de fibroses radio induites [Wegrowski *et al.* 1986] [Finkelstein *et al.* 1994] [Langberg, Hauer-Jensen 1996] [Richter *et al.* 1996; Geffrotin *et al.* 1998] et valide d'autre part l'approche génomique par macro array que nous avons privilégiée. La modulation de l'expression des gènes codant pour les composants de la matrice extracellulaire vasculaire, comme le collagène de type VIII et SPARC, ce qui n'avait jamais été décrit dans les fibroses radiques jusqu'à ce jour, suggère par ailleurs que les cellules musculaires vasculaires sont activées dans l'entérite radique. Les changements observés dans les profils d'expression des ARNm codant pour les gènes de composants de la membrane basale : augmentation du collagène de type IV et diminution des laminines $\beta 1$ et $\gamma 2$ et du récepteur à la laminine, associés à une répression des gènes codant pour les interactions cellules/cellules comme la desmocolline 1A/1B et 2A/2B, la β -caténine et la desmoplakine, suggèrent que l'intégrité de la muqueuse intestinale est altérée dans l'entérite radique. La production des constituants matriciels est assurée par les cellules mésenchymateuses. Elles sont responsables du contrôle de l'homéostasie matricielle et sont à ce titre actuellement considérées comme les actrices clés des processus

fibrotiques. Les fibroblastes issus de biopsies de patients souffrant de la maladie de Crohn, produisent plus de collagène de type III *in vitro* que des fibroblastes issus d'intestins sains [Stallmach *et al.* 2000]. Les cellules musculaires lisses et les myofibroblastes sub-épithéliaux isolés d'entérite radique humaine sécrètent plus de pro-collagène de type I que les cellules isolées d'intestins sains [Bourgier *et al.*] [Vozenin-Brotons *et al.* 2003]. Si la surexpression génique et protéique des constituants matriciels et plus particulièrement des collagènes I et III dans l'entérite radique semble établie, qu'en est-il de la balance dégradation/accumulation des constituants matriciels ?

L'homéostasie de la matrice extracellulaire est hautement régulée par une balance complexe s'équilibrant entre synthèse et dégradation matricielle conduite par les MMP et les TIMP. L'altération de la palette d'expression des constituants matriciels ne peut pas à elle seule expliquer l'accumulation pathologique de matrice extracellulaire observée dans l'entérite radique. C'est pour cette raison que nous avons étudié au niveau moléculaire, en utilisant une approche globale, le déséquilibre de la balance responsable de l'accumulation de MEC dans l'entérite radique. Tandis que dans les maladies inflammatoires intestinales, le rôle joué par la MMP-1, -3, -9 et -13 est bien caractérisé dans ces remodelages pathologiques [MacDonald T.T., Pender 1998; Pender *et al.* 1999], l'implication des MMP et des TIMP est assez mal caractérisée dans les phases de fibroses intestinales établies. Pourtant une meilleure compréhension des mécanismes conduisant à l'accumulation des composants matriciels est une étape obligatoire dans la compréhension du processus fibrotique, et son traitement potentiel.

Notre analyse génique différentielle, menée sur des prélèvements de patients présentant une entérite radique, comparés à des patients sains, montre une induction des ARNm codant pour l'ensemble des membres de la famille MMP : gélatinases, stromélysines, collagénases, concomitante à la surexpression des antagonistes tissulaires des MMP que sont TIMP-1, TIMP-2 et PAI-1. Nous avons analysé en détail,

selon la méthode mise au point par Sandler [Sandler *et al.* 2003], les résultats obtenus concernant l'expression génique des constituants matriciels, des MMP et des TIMP, et mis ainsi en évidence un déséquilibre net de la balance accumulation/dégradation des constituants matriciel clairement en faveur de l'accumulation des composants de la matrice extra cellulaire. Cette sur-expression concomitante des MMP et de leur antagonistes associée à celle de certains constituants matriciels, concorde avec les travaux du groupe de M. Hauer Jensen qui a montré comme nous une augmentation de la production et une activité accrue des MMP dans les fibroses intestinales radio-induites [Hovdenak *et al.* 2002]. Il est en de même pour l'étude complémentaire que nous avons réalisée sur l'expression génique et protéique des MMP et des TIMP, sur des cellules musculaires lisses intestinales issues ou non de prélèvements fibrotiques. Elle a montré simultanément la sur-expression des transcrits codant pour les MMP, les TIMP et les constituants matriciels. L'ensemble de ces résultats s'opposent à ceux du groupe de M. Robbins qui propose l'existence d'un défaut de dégradation des constituants matriciels par altération du système plasminogène/plasmine, dans les fibroses rénales radio-induites [Zhao *et al.* 2001], et du groupe de M. Martin qui montre un défaut de la production de MMP-1 et de TIMP-1 dans les fibroses cutanées radio-induites [Lafuma *et al.*].

La MEC synthétisée dans l'entérite radique tardive, consiste en un réseau dense de collagènes fibrillaires de type I et de type III associé à un tissu de granulation néosynthétisé et immature (tenascine-C) qui promeut la migration, la prolifération, et l'activation des cellules produisant la matrice. L'ensemble de ces observations suggère que le métabolisme global de la MEC est activé dans l'entérite radique, et soutient notre hypothèse selon laquelle le tissu fibrotique est un tissu dynamique en constant remodelage. Les études réalisées au cours des dernières années ont mis en lumière le rôle fondamental joué par le micro-environnement sur le contrôle des phénotypes cellulaires. En effet outre son rôle structural, la MEC, via sa composition, peut aussi

jouer un rôle fonctionnel essentiel dans l'homéostasie tissulaire, et cela par trois voies différentes.

La composition de la MEC dans l'entérite radique peut aussi altérer la transmission aux cellules des signaux de différenciation. Les récepteurs aux intégrines sont en partie responsables des interactions cellule-matrice et capables de réguler des fonctions comme la migration, la prolifération et l'expression génique par interaction directe avec le cytosquelette ou activation d'une cascade de signalisation moléculaire [Beaulieu 1999] [Lussier *et al.* 2000]. Malgré leurs capacités, leur rôle dans la fibrose radio-induite est mal connu.

La MEC joue par ailleurs le rôle de réservoir de facteurs de croissance, comme le TGF- β 1. Ce facteur de croissance pro-fibrogénique est synthétisé sous forme de propeptide et stocké dans la MEC grâce à la protéine LTBP qui possède une structure fibrillaire identique aux protéines matricielles. La mobilisation du TGF- β 1 s'opère par activation du propeptide par clivage protéolytique, en absence de toute néosynthèse. Toute modification qualitative et/ou quantitative de la MEC peut alors avoir des répercussions importantes sur la biodisponibilité des facteurs de croissance et par rebond sur la persistance des signaux fibrogéniques.

Enfin, la sur-expression des TIMP, outre son rôle d'inhibition des MMP, pourrait jouer un rôle important dans la pérennisation de la différenciation myofibroblastique. Il a été montré dans différents modèles expérimentaux que la sur-expression de TIMP-1 et TIMP-2 inhibe l'apoptose [Valente *et al.*]. Par ailleurs, nous avons montré que dans l'entérite radique, les myofibroblastes du manchon pericryptique sur-expriment TIMP-1 et que les myofibroblastes activés de la sous muqueuse sur-expriment TIMP-2. La mise en relation de ces informations suggère effectivement un maintien forcé de la différenciation myofibroblastique.

Le statut inflammatoire des tissus fibrotiques est particulièrement important dans la compréhension des mécanismes conduisant à la genèse et la pérennisation

des fibroses. Il a été mis en évidence que l'infiltration tissulaire radio-induite précoce des effecteurs cellulaires de l'inflammation que sont les leucocytes, les granulocytes, les mastocytes et les macrophages, contribue à amplifier la réponse inflammatoire précoce par la production de cytokines et de chemokines pro-inflammatoires, de facteurs de croissance pro-fibrosants et de protéases tissulaires qui pourraient par la suite être impliqués dans le développement de la fibrose [Rubin *et al.* 1995].

Nous avons observé dans notre étude une diminution du niveau d'expression de l'ARNm codant pour TNF- α , cytokine pro-inflammatoire considérée comme un médiateur clef des processus inflammatoires aigus, répression aussi constatée par Quarmby et collaborateurs [Quarmby *et al.* 2002]. Ce médiateur joue un rôle important dans l'homéostasie tissulaire en limitant l'extension du processus inflammatoire et les lésions tissulaires. La répression de l'expression des ARNm codant pour le TNF- α est une information importante dans la compréhension de la persistance de la fibrose radio induite. Nous avons de plus observé une augmentation de l'expression des ARNm codant pour les membres de la famille de chémokines CC (Scya 5 et MIP- α). Cette donnée est en accord avec les travaux récemment publiés par Johnson et collaborateurs qui émettent l'hypothèse dans le cadre de la fibrose pulmonaire radio-induite, selon laquelle l'activation des lymphocytes et des macrophages pourrait être un élément clef de la chronicité de la réponse inflammatoire qui mène à la fibrose [Johnston *et al.* 2002].

Si l'analyse génique différentielle pratiquée nous a apporté des renseignements sur les cytokines inflammatoires ou sur les facteurs de croissance pro-fibrogéniques, produits au cours de l'entérite radique, elle ne nous a cependant pas renseigné sur la présence potentielle d'un infiltrat inflammatoire. Cette donnée nous a été fournie par l'immunohistochimie qui nous a permis d'établir une corrélation entre la présence de polynucléaires et celle de la MMP-9 et de la MMP-3 et celle de cellules inflammatoires

non typées. Cette corrélation a été établie de même dans les IBD [Bailey *et al.* 1994; Saarialho-Kere U. K. *et al.* 1996b]. L'identification précise des populations de cellules inflammatoires infiltrant les différentes tuniques du tissu intestinal des patients présentant une entérite radique devra être réalisée, d'une part pour avoir une idée précise du statut inflammatoire, non plus uniquement moléculaire, mais aussi cellulaire de ces tissus, et d'autre part pour établir si comme dans les IBD, les lymphocytes T sont responsables des liaisons muqueuses observées impliquant les MMP.

Mais les cellules inflammatoires sont-elles les seuls à détenir un potentiel lésionnel ? Une étude récente menée par le groupe de S. Pender [Pender *et al.* 2003] a mis en évidence une forte production de MMP-3 dans des prélèvements tissulaires provenant d'enfants présentant une entérocolite nécrosante. En effet, dans ces prélèvements d'intestins grêles, par rapport à des prélèvements d'intestins normaux, une forte augmentation des expressions géniques et protéiques de MMP-3 a été mise en évidence tandis que l'expression des gélatinases et de TIMP-2 n'étaient pas modulées. Une étude immunohistochimique des échantillons a permis de montrer que ce sont les cellules musculaires lisses qui sont la source de la MMP-3. Nous avons aussi mis en évidence une sur-production de MMP-3 dans les cellules musculaires lisses de patients présentant une entérite radique. La surproduction de MMP-3 par des CML, qu'elles proviennent d'entérites radiques ou nécrosantes est une donnée assez récente qui confère à ces cellules un potentiel lésionnel tout à fait nouveau jusqu'à présent exclusivement attribué aux cellules inflammatoires et aux myofibroblastes.

Nous avons de plus mis en évidence une sur-expression des ARNm codant pour les IGF-BP2, 4 et 5, dont les protéines peuvent inhiber ou promouvoir l'interaction de l'IGF-I avec son récepteur. Il a été montré que ces protéines sont impliquées dans la prolifération des cellules musculaires lisses et dans le contrôle de la contraction des cellules musculaires viscérales et vasculaires [Bushman, Kuemmerle 1998] [Kuemmerle 2000]. Ces données mettent un peu plus en avant encore, l'importance

des cellules musculaires dans les lésions tissulaires observées dans la fibrose radio-induite.

Partie IV : Perspectives

Les résultats obtenus sur le modèle d'irradiation abdominale X à 10 Gy de rats, mais aussi sur les échantillons provenant de patients présentant une entérite radique, ont mis en lumière une participation intense des MMP et des TIMP aux modifications tissulaires observées, de façon aiguë chez le rat ou tardivement dans le cas des patients. Nos perspectives concernent à la fois le remodelage matriciel aigu mais aussi tardif :

Pour analyser plus finement le rôle joué par les MMP dans le remodelage radio induit, aigu mais aussi tardif, nous projetons avant toute chose de changer de modèle expérimental, et d'utiliser les modèles récemment mis en place au laboratoire. Ils nous permettront de mettre en relation les données expérimentales obtenues concernant les réponses aiguës mais aussi tardives à l'irradiation.

Phase aiguë :

◆ Nous souhaitons, sur les nouveaux modèles expérimentaux précédemment présentés, caractériser l'implication des MMP et des TIMP, et des acteurs du système plasminogène/plasmine, dans le remodelage matriciel intestinal, provoqué par l'irradiation.

◆ Nos résultats ont mis en avant l'implication marquée des MMP-2 et -14 dans le remodelage post-radique aigu. Il serait particulièrement intéressant d'inhiber l'action de ces enzymes pour mettre en évidence le rôle clef de ces enzymes dans la cicatrisation radio induite que nous présageons. Il n'existe pas à ce jour d'inhibiteur pharmacologique spécifique d'une MMP en particulier, par contre des modèles de souris invalidées pour ces MMP existent. Nous souhaitons irradier des souris invalidées pour les gènes de la MMP-2 et des souris invalidées pour le gène de la MMP-14. Nous

pensons que le processus cicatriciel de ces animaux après irradiation devrait être défaillant, leur invalidation génique empêchant la cicatrisation normale que nous avons constatée chez le rat.

◆ Par ailleurs pour démontrer que les MMP-3 et -9 ne sont pas nécessaires au remodelage post-radique intestinal, alors qu'elles sont spécifiquement impliquées dans la pathogenèse des lésions muqueuses rencontrées dans les IBD, nous souhaitons irradier des souris invalidées pour le gène de la MMP-9 et des souris invalidées pour le gène de la MMP-3. Nous pensons, chez ces souris, mettre en évidence un profil de cicatrisation équivalent à celui de souris non invalidées.

◆ Pour déterminer si comme nous le croyons, les lésions muqueuses radio-induites ne sont générées par des lymphocytes T, nous aimerions irradier des rats sans lymphocytes T.

Phase tardive :

Comme nous l'avons signalé précédemment, l'utilisation des modèles développés au laboratoire, nous permettra de cerner plus finement l'implication des MMP dans le remodelage pathologique mis en évidence au laboratoire chez les patients présentant une entérite radique .

◆ Pour déterminer quel est le rôle joué par les lymphocytes dans le remodelage pathologique affectant l'intestin des patients présentant une entérite radique, il est nécessaire de réaliser le typage immunohistochimique des lymphocytes présents. Nous envisageons par ailleurs de déterminer au niveau génique et moléculaire l'expression des cytokines pro et anti inflammatoires exprimées.

L'ensemble de ces informations nous renseignera sur l'état de la balance Th1/Th2 chez les patients et permettra de déterminer sa potentielle implication sur le remodelage post radique pathologique mis en évidence chez les patients.

◆ Pour explorer plus avant le rôle lésionnel potentiel joué par les cellules mésenchymateuses et plus particulièrement par les CML, via la sécrétion de MMP-3, dans les lésions tissulaires tardives rencontrées dans les entérites radiques, nous prévoyons de tester la capacité de sécrétion en MMP et TIMP de ces cellules en réponse aux cytokines ou facteurs de croissance dont l'induction a été mise en évidence dans les processus fibrotiques comme l'IL-1 β , le CTGF ou les différentes isoformes du TGF- β .

Partie V : Références bibliographiques

Alexakis, C., Guettoufi, A., Mestries, P., Strup, C., Mathe, D., Barbaud, C., Barritault, D., Caruelle, J. P., Kern, P. (2001). Heparan mimetic regulates collagen expression and TGF-beta1 distribution in gamma-irradiated human intestinal smooth muscle cells. Faseb J **15**(9): 1546-54.

Alexander, C. M., Howard, E. W., Bissell, M. J., Werb, Z. (1996). Rescue of mammary epithelial cell apoptosis and entactin degradation by a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 transgene. J Cell Biol **135**(6 Pt 1): 1669-77.

Aley, S., Zimmermann, M., Hetsko, M., Selsted, M., Gillin, F. (1994). Killing of *Giardia lamblia* by cryptidins and cationic neutrophil peptides. Infect Immun **62**(12): 5397-403.

Allen-Mersh, T. G., Wilson, E. J., Hope-Stone, H. F., Mann, C. V. (1986). Has the incidence of radiation-induced bowel damage following treatment of uterine carcinoma changed in the last 20 years? J R Soc Med **79**(7): 387-90.

Alumets, J., Hakanson, R., Ingemansson, S., Sundler, F. (1977). Substance P and 5-HT in granules isolated from an intestinal argentaffin carcinoid. Histochemistry **52**(3): 217-22.

Angel, P., Bauman, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H. J., Herrlich, P. (1987). 12 o-tetradecanoyl-phorbol-13 acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. Mol Cell Biol **7**: 2256-66.

Anonymous (1997). Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. Swedish Rectal Cancer Trial. N Engl J Med **336**(14): 980-7.

Araya, J., Maruyama, M., Sassa, K., Fujita, T., Hayashi, R., Matsui, S., Kashii, T., Yamashita, N., Sugiyama, E., Kobayashi, M. (2001). Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 production in human lung epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **280**(L30-L38).

Arii, S., Mise, M., Harada, T., Furutani, M., Ishigami, S., Niwano, M., Mizumoto, M., Fukumoto, M., Imamura, M. (1996). Overexpression of matrix metalloproteinase 9 gene in hepatocellular carcinoma with invasive potential. Hepatology **24**(2): 316-22.

Armstrong, P. B., Quigley, J. P. (1999). Alpha2-macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system. Dev Comp Immunol **23**(4-5): 375-90.

Ayabe, T., Satchell, D. P., Wilson, C. L., Parks, W. C., Selsted, M. E., Ouellette, A. J. (2000). Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. Nat Immunol **1**(2): 113-8.

Bahr, M. J., Vincent, K. J., Arthur, M. J., Fowler, A. V., Smart, D. E., Wright, M. C., Clark, I. M., Benyon, R. C., Iredale, J. P., Mann, D. A. (1999). Control of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter in culture-activated rat hepatic stellate cells: regulation by activator protein-1 DNA binding proteins. Hepatology **29**(3): 839-48.

Bailey, C. J., Hembry, R. M., Alexander, A., Irving, M. H., Grant, M. E., Shuttleworth, C. A. (1994). Distribution of the matrix metalloproteinases stromelysin, gelatinases A and B, and collagenase in Crohn's disease and normal intestine. J Clin Pathol **47**(2): 113-6.

Bajaj-Elliott, M., Breese, E. J., Poulsom, R. (1997). Keratinocyte growth factor in inflammatory bowel disease. Increased mRNA transcripts in ulcerative colitis compared Crohn's disease in biopsy and isolated mucosal myofibroblasts. Am J Pathol **151**: 1469-76.

Baker, A. H., Edwards, D. R., Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. J Cell Sci **115**(Pt 19): 3719-27.

Baragi, V. M., Qiu, L., Gunja-Smith, Z., Woessner Jr, J. F., Lesch, C. A., Guglietta, A. (1997). Role of metalloproteinases in the development and healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats. Scand J Gastroenterol **32**: 419-26.

Barrett, A. J. (1995). Proteolytic enzymes: aspartic and metalloproteinases. method enzymol. San Diego.

Basson, M. D. (2001). In vitro evidence for matrix regulation of intestinal epithelial biology during mucosal healing. Life Sci **69**(25-26): 3005-18.

Basson, M. D., Modlin, I. M., Flynn, S. D., Jena, B. P., Madri, J. A. (1992). Independent modulation of enterocyte migration and proliferation by growth factors, matrix proteins, and pharmacologic agents in an in vitro model of mucosal healing. Surgery **112**(2): 299-307; discussion 07-8.

Bauer, E. A., Stricklin, G. P., Jeffrey, J. J., Eisen, A. Z. (1975). Collagenase production by human skin fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun **64**(1): 232-40.

Baugh, M. D., Perry, M. J., Hollander, A. P., Davies, D. R., Cross, S. S., Lobo, A. J., Taylor, C. J., Evans, G. S. (1999). Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. Gastroenterology **117**(4): 814-22.

Beaulieu, J. F. (1999). Integrins and human intestinal cell functions. Front Biosci **4**: D310-21.

Becciolini, A., Arganini, L., Tedde, G., Vannelli, G., Cariaggi, P. (1976). Biochemical and morphological changes in the epithelial cells of the small intestine after irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys **1**(9-10): 915-25.

Becciolini, A., Balzi, M., Potten, C. S. (1995). Radiation effects on proliferation and differentiation in the rat small intestine. Radiation and Gut. C. S. Potten, J. H. Hendry, ELSEVIER: 85-143.

Beck, P. L., Rosenberg, I. M., Xavier, R. J., Koh, T., Wong, J. F., Podolsky, D. K. (2003). Transforming growth factor-beta mediates intestinal healing and susceptibility to injury in vitro and in vivo through epithelial cells. Am J Pathol **162**(2): 597-608.

Belanger, I., Beaulieu, J. F. (2000). Tenascin in the developing and adult human intestine. Histol Histopathol **15**(2): 577-85.

Benderitter, M., Vincent-Genod, L., Berroud, A., Muller, S., Donner, M., Voisin, P. (1999). Radio-induced structural membrane modifications: a potential bioindicator of ionizing radiation exposure? Int J Radiat Biol **75**(8): 1043-53.

Bernard, C. (1949). An introduction to the study of experimental medicine. Schuman. New York.

Bertaux, B., Hornebeck, W., Eisen, A. Z., Dubertret, L. (1991). Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. J Invest Dermatol **97**(4): 679-85.

Besnard, P., Niot, I., Poirier, H., Clement, L., Bernard, A. (2002). New insights into the fatty acid-binding protein (FABP) family in the small intestine. Mol Cell Biochem **239**(1-2): 139-47.

Bian, J., Sun, Y. (1997). Transcriptional activation by p53 of the human type IV collagenase (gelatinase A or matrix metalloproteinase 2) promoter. Molecular and Cellular Biology **17**(11): 6330-38.

Binder, H., Sandle, G., Rajendran, V. (1991). Colonic Fluid and electrolyte movement in health and disease. The large intestine. S. R. Phillips SF, Pemperton W. New-York, Raven Press: 141-68.

Bjerknes, M., Cheng, H. (1999). Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. Gastroenterology **116**(1): 7-14.

Bond, V., Fliedner, T. M., Archambeau, J. (1965). A disturbance in cellular kinetics. Mammalian radiation lethality. A. press. New York.

Boothman, D. A., Wang, M., Lee, S. W. (1991). Induction of tissue-type plasminogen activator by ionizing radiation in human malignant melanoma cells. Cancer Res **51**(20): 5587-95.

Bottcher, G., Alumets, J., Hakanson, R., Sundler, F. (1986). Co-existence of glicentin and peptide YY in colorectal L-cells in cat and man. An electron microscopic study. Regul Pept **13**(3-4): 283-91.

Bourgier, C., Milliat, F., Haydont, V., Linard, C., Francois, A., Holler, V., Lasser, P., Bourhis, J., Mathe, D., Vozenin-Brotans, M. C. (2004). Inhibition of Rho kinase

modulate radiation-induced fibrogenic phenotype through alteration of the cytoskeleton and CTGF expression. Gut à paraitre.

Brandt, E., Colombel, J. F., Ectors, N., Gambiez, L., Emilie, D., Geboes, K., Capron, M., Desreumaux, P. (2000). Enhanced production of IL-8 in chronic but not in early ileal lesions of Crohn's disease (CD). Clin Exp Immunol **122**(2): 180-5.

Brassart, B., Randoux, A., Hornebeck, W., Emonard, H. (1998). Regulation of matrix metalloproteinase-2 (gelatinase A, MMP-2), membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) expression by elastin-derived peptides in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. Clin Exp Metastasis **16**(6): 489-500.

Breese, E. J., Michie, C. A., Nicholls, S. W. (1994). Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. Gastroenterology **106**: 1455-66.

Brenneisen, P., Wenk, J., Wlaschek, M., Krieg, T., Schaffetter-Kochanek, K. (2000). Activation of p70 ribosomal protein S6 kinase is an essential step in the DNA damage-dependent signaling pathway responsible for the ultraviolet B-mediated increase in interstitial collagenase (MMP-1) and stromelysin-1 (MMP-3) protein levels in human dermal fibroblasts. J Biol Chem **275**(6): 4336-44.

Brooks, P. C., Stromblad, S., Sanders, L. C., von Schalscha, T. L., Aimes, R. T., Stetler-Stevenson, W. G., Quigley, J. P., Cheresh, D. A. (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. Cell **85**(5): 683-93.

Buell, M. G., Harding, R. K. (1989). Proinflammatory effects of local abdominal irradiation on rat gastrointestinal tract. Dig Dis Sci **34**(3): 390-9.

Burger, A., Loffler, H., Bamberg, M., Rodemann, H. P. (1998). Molecular and cellular basis of radiation fibrosis. Int J Radiat Biol **73**(4): 401-8.

Bushman, T. L., Kuemmerle, J. F. (1998). IGFBP-3 and IGFBP-5 production by human intestinal muscle: reciprocal regulation by endogenous TGF-beta1. Am J Physiol **275**(6 Pt 1): G1282-90.

Butler, G., Hutton, M., Wattam, B., Williamson, R., Knauper, V., Willenbrock, F., Murphy, G. (1999). The specificity of TIMP-2 for matrix metalloproteinases can be modified by single amino acid mutations. Journal of Biological Chemistry **274**: 20391-96.

Cairns, J. (1975). Mutation selection and the natural history of cancer. Nature **255**(5505): 197-200.

Cario, E., Becker, A., Sturm, A., Goebell, H., Dignass, A. U. (1999). Peripheral blood mononuclear cells promote intestinal epithelial restitution in vitro through an

interleukin-2/interferon-gamma-dependent pathway. Scand J Gastroenterol **34**(11): 1132-8.

Carr, K. E. (2001). Effects of radiation damage on intestinal morphology. Int Rev Cytol **208**: 1-119.

Caterina, J. J., Yamada, S., Caterina, N. C., Longenecker, G., Holmback, K., Shi, J., Yermovsky, A. E., Engler, J. A., Birkedal-Hansen, H. (2000). Inactivating mutation of the mouse tissue inhibitor of metalloproteinases-2(Timp-2) gene alters proMMP-2 activation. J Biol Chem **275**(34): 26416-22.

Chang, C., Werb, Z. (2001). The many faces of metalloproteases : cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. Trends in Cell Biology **11**(11): S37-S43.

Chapman, J., Gillespie, C. (1981). Radiation-induced events and their time scale in mammalian cells. Advances in radiation biology. J. Lett, H. Adler. New York, Academic press. **9**: 143.

Cheng, H., Leblond, C. P. (1974a). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. Am J Anat **141**(4): 461-79.

Cheng, H., Leblond, C. P. (1974b). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. Am J Anat **141**(4): 537-61.

Ciacchi, C., Lind, S. E., Podolsky, D. K. (1993). Transforming growth factor beta regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers. Gastroenterology **105**(1): 93-101.

Coia, L., Myerson, R., Tepper, J. (1995). Late effects of radiation therapy on the gastrointestinal tract. International journal of radiation biology **31**: 1213-26.

Colognato, H., Yurchenco, P. D. (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. Dev Dyn **218**(2): 213-34.

Coopersmith, C. M., Chandrasekaran, C., McNevin, M. S., Gordon, J. I. (1997). Bi-transgenic mice reveal that K-rasVal12 augments a p53-independent apoptosis when small intestinal villus enterocytes reenter the cell cycle. J Cell Biol **138**(1): 167-79.

Corcoran, M. L., Stetler-Stevenson, W. G. (1995). Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates fibroblast proliferation via a cAMP-dependent mechanism. J Biol Chem **270**(22): 13453-9.

Cuenod-Jabri, B., Patey, N., Goulet, O., Canioni, D., Guy-Grand, D., Schmitz, J., Brousse, N., Cerf-Bensussan, N. (1997). Immune and non-immune intestinal villous atrophies. Rev Med Interne **18**(5): 418-20.

Cuvelier, A., Kuntz, C., Sesboue, R., Muir, J. F., Martin, J. P. (1997). Les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMP) : structure et activité. Revue des Maladies Respiratoires **14**: 1-10.

Dalberg, K., Eriksson, E., Enberg, U., Kjellman, M., Bäckdahl, M. (2000). Gelatinase A, membrane type 1 matrix metalloproteinase, and extracellular matrix metalloproteinase inducer mRNA expression : correlation with invasive growth of breast cancer. World J Surg **24**: 334-40.

Dammeier, J., Brauchle, M., Falk, W., Grotendorst, G. R., Werner, S. (1998). Connective tissue growth factor: a novel regulator of mucosal repair and fibrosis in inflammatory bowel disease? Int J Biochem Cell Biol **30**(8): 909-22.

Daum, S., Bauer, U., Foss, H., Schuppan, D., Stein, H., Riecken, E., Ullrich, R. (1999). Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinase-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in intestinal biopsys specimens from patients with coeliac disease. Gut **44**: 17-25.

Davidson, B., Golberg, I., Kopolovic, J., Lerner-Geva, L., Gotlieb, W. H., Ben-Baruch, G., Reich, R. (1999). MMP-2 and TIMP-2 expression correlates with poor prognosis in cervical carcinoma-a clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in Situ Hybridization. Gynecol Oncol **73**(372-382).

De Winter, H., Elewaut, D., Turovskaya, O., Huflejt, M., Shimeld, C., Hagenbaugh, A., Binder, S., Takahashi, I., Kronenberg, M., Cheroutre, H. (2002). Regulation of mucosal immune responses by recombinant interleukin 10 produced by intestinal epithelial cells in mice. Gastroenterology **122**(7): 1829-41.

Debonnie, J. C., Phillips, S. F. (1978). Capacity of the human colon to absorb fluid. Gastroenterology **74**(4): 698-703.

Denham, J. W., Hauer-Jensen, M. (2002). The radiotherapeutic injury--a complex 'wound'. Radiother Oncol **63**(2): 129-45.

Denham, J. W., Hauer-Jensen, M., Kron, T., Langberg, C. W. (2000). Treatment-time-dependence models of early and delayed radiation injury in rat small intestine. Int J Radiat Oncol Biol Phys **48**(3): 871-87.

Denham, J. W., Hauer-Jensen, M., Peters, L. J. (2001). Is it time for a new formalism to categorize normal tissue radiation injury? Int J Radiat Oncol Biol Phys **50**(5): 1105-6.

Denton, A. S., Andreyev, H. J., Forbes, A., Maher, E. J. (2002). Systematic review for non-surgical interventions for the management of late radiation proctitis. Br J Cancer **87**(2): 134-43.

Desreumaux, P., Colombel, J. F. (2003). Intestinal flora and Crohn's disease. Ann Pharm Fr **61**(4): 276-81.

Dignass, A. U., Podolsky, D. K. (1993). Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta. Gastroenterology **105**(5): 1323-32.

Dobretsov, G. E., Borschevskaya, T. A., Petrov, V. A., Vladimirov, Y. A. (1977). The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation. FEBS Lett **84**(1): 125-8.

Dooms, G. C., Hecht, S., Brant-Zawadzki, M., Berthiaume, Y., Norman, D., Newton, T. H. (1986). Brain radiation lesions: MR imaging. Radiology **158**(1): 149-55.

Dorr, W., Hendry, J. H. (2001). Consequential late effects in normal tissues. Radiother Oncol **61**(3): 223-31.

Dublineau, I., Ksas, B., Joubert, C., Aigueperse, J., Gourmelon, P., Griffiths, N. M. (2002). Alterations in water and electrolyte absorption in the rat colon following neutron irradiation: influence of neutron component and irradiation dose. Int J Radiat Biol **78**(12): 1127-38.

Dublineau, I., Lebrun, F., Grison, S., Griffiths, N. M. (2004). Functional and structural alterations of epithelial barrier properties of rat ileum following X-irradiation. Can J Physiol Pharmacol **82**(2): 84-93.

Dubois, A., King, G., Livengood, D. (1995). Radiation and the gastrointestinal tract. Boca Raton, CRC press.

Dubois, B., Arnold, B., Opdenakker, G. (2000). Gelatinase B deficiency impairs reproduction. Journal of Clinical Investigation **106**(5): 627-28.

Dumin, J., Dickeson, S., Stricker, T., Bhattacharyya-Pakras, M., Roby, J., Santoro, S., Parks, W. (2001). Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the alpha2beta1 integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen. Journal of Biological Chemistry **276**(31): 29368-74.

Edwards, D. R. (2001). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. N. J. Clendeninn, K. Appelt. Totowa, Humana press: 67-84.

Eisenhauer, P., Harwig, S., Lehrer, R. (1992). Cryptdins : antimicrobial defensins of the murine small intestine. Infect Immun **60**(9): 3556-65.

Epstein, E. H., Jr., Munderloh, N. H. (1975). Isolation and characterization of CNBr peptides of human (alpha 1 (III))₃ collagen and tissue distribution of (alpha 1 (I))₂ alpha 2 and (alpha 1 (III))₃ collagens. J Biol Chem **250**(24): 9304-12.

Erspamer, V., Asero, B. (1952). Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. Nature **169**(4306): 800-1.

Esteve, P. O., Tremblay, P., Houde, M., St-Pierre, Y., Mandeville, R. (1998). In vitro expression of MMP-2 and MMP-9 in glioma cells following exposure to inflammatory mediators. Biochim Biophys Acta **1403**(1): 85-96.

Etoh, T., Inoue, H., Yoshikawa, Y., Barnard, G., Kitano, S., Mori, M. (2000). Increased expression of collagenase-3 (MMP-13) and MT1-MMP in oesophageal cancer is related to cancer aggressiveness. Gut **47**: 50-56.

Fabumni, R., Baker, A. H., Murray, E. J., Booth, R. F. G., Newby, A. C. (1996). Divergent regulation by growth factors and cytokines of 95 kDa and 72 kDa gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2 and -3 in rabbit aortic smooth muscle cells. Biochem J **315**: 335-42.

Fajardo, L., Berthrong, M., Anderson, R. (2001). Alimentary Tract. Alimentary tract radiation pathology. Oxford, Oxford university Press: 208-47.

Farquhar, M. G., Palade, G. E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. J Cell Biol **17**: 375-412.

Feige, J. J., Negoescu, A., Keramidis, M., Souchelnskiy, S., Chambaz, E. M. (1996). Alpha 2-macroglobulin: a binding protein for transforming growth factor-beta and various cytokines. Horm Res **45**(3-5): 227-32.

Feil, W., Wenzl, E., Vattay, P., Starlinger, M., Sogukoglu, T., Schiessel, R. (1987). Repair of rabbit duodenal mucosa after acid injury in vivo and in vitro. Gastroenterology **92**(6): 1973-86.

Feuvret, L., Jammet, P., Campana, F., Cosset, J. M., Fourquet, A. (1994). Value of granisetron in the prevention of digestive disorders in total body irradiation. Bull Cancer Radiother **81**(1): 41-4.

Fini, M. E., Cook, J. R., Mohan, R., Brinckerhoff, C. E. (1998). Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. Matrix metalloproteinases. W. C. Parks, R. P. Mecham. New York, Academic press: 299-356.

Fini, M. E., Girard, M. T. (1990). The pattern of metalloproteinase expression by corneal fibroblasts is altered by passage in cell culture. J Cell Sci **97**: 373-83.

Finkelstein, J. N., Johnston, C. J., Baggs, R., Rubin, P. (1994). Early alterations in extracellular matrix and transforming growth factor beta gene expression in mouse lung indicative of late radiation fibrosis. Int J Radiat Oncol Biol Phys **28**(3): 621-31.

Fleming, T. P., Sheth, B., Fesenko, I. (2001). Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis. Front Biosci **6**: D1000-7.

Fliedner, T. M. (1969). A cytokinetic comparison of hematological consequences of radiation exposure in different mammalian species. Comparative

cellular and species radiosensitivity. V. Bond, T. Sugahara. Tokyo, Igaken Shoin: 89-101.

Fliedner, T. M., Nothdurft, W., Steinbach, K. H. (1988). Blood cell changes after radiation exposure as an indicator for hemopoietic stem cell function. Bone Marrow Transplant **3**(2): 77-84.

Flynn, D., Mihalakis, I., Mauceri, T., Pins, R. (1995). Gastrointestinal syndrome after accidental overexposure during radiotherapy. Radiation and the gastrointestinal tract. A. Dubois, G. King, D. Livengood. Boca Raton, CRC press: 225-34.

Fouquet, S., Lugo-Martinez, V. H., Faussat, A. M., Renaud, F., Cardot, P., Chambaz, J., Pincon-Raymond, M., Thenet, S. (2004). Early loss of E-cadherin from cell-cell contacts is involved in the onset of anoikis in enterocytes. J Biol Chem: en cours de publication.

Francois, A., Aigueperse, J., Gourmelon, P., MacNaughton, W. K., Griffiths, N. M. (1998). Exposure to ionizing radiation modifies neurally-evoked electrolyte transport and some inflammatory responses in rat colon in vitro. Int J Radiat Biol **73**(1): 93-101.

Francois, A., Milliat, F., Vozenin-Brotans, M. C., Mathe, D., Griffiths, N. M. (2003). 'In-field' and 'out-of-field' functional impairment during subacute and chronic phases of experimental radiation enteropathy in the rat. Int J Radiat Biol **79**(6): 437-50.

Freeman, S. L., Hossain, M., MacNaughton, W. K. (2001). Radiation-induced acute intestinal inflammation differs following total-body versus abdominopelvic irradiation in the ferret. Int J Radiat Biol **77**(3): 389-95.

Fuchs, E., Dowling, J., Segre, J., Lo, S. H., Yu, Q. C. (1997). Integrators of epidermal growth and differentiation: distinct functions for beta 1 and beta 4 integrins. Curr Opin Genet Dev **7**(5): 672-82.

Gan, X., Wong, B., Wright, S., Cai, T. (2001). Production of matrix metalloproteinase-9 in CaCO-2 cells in response to inflammatory stimuli. Journal of interferon and cytokine research **21**: 93-98.

Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol **119**(3): 493-501.

Geffrotin, C., Tricaud, Y., Crechet, F., Castelli, M., Lefaix, J. L., Vaiman, M. (1998). Unlike tenascin-X, tenascin-C is highly up-regulated in pig cutaneous and underlying muscle tissue developing fibrosis after necrosis induced by very high-dose gamma radiation. Radiat Res **149**(5): 472-81.

Giamb Bernardi, T. A., Grant, G. M., Taylor, G. P., Hay, R. J., Maher, V. M., McCormick, J. J., Klebe, R. J. (1998). Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells. Matrix Biol **16**(8): 483-96.

Giannelli, G., Falk-Marzillier, J., Schiraldi, O., Stetler-Stevenson, W. G., Quaranta, V. (1997). Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. Science **277**(5323): 225-8.

Giannopoulou, E., Katsoris, P., Hatziapostolou, M., Kardamakis, D., Kotsaki, E., Polytarchou, C., Parthymou, A., Papaioannou, S., Papadimitriou, E. (2001). X-rays modulate extracellular matrix in vivo. Int J Cancer **94**(5): 690-8.

Gordon, J. I., Hooper, L. V., McNevin, M. S., Wong, M., Bry, L. (1997). Epithelial cell growth and differentiation. III. Promoting diversity in the intestine: conversations between the microflora, epithelium, and diffuse GALT. Am J Physiol **273**(3 Pt 1): G565-70.

Graham, M. F. (1995). Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease-an update. Inflammatory Bowel Disease **1**: 220-27.

Green, K. J., Gaudry, C. A. (2000). Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? Nat Rev Mol Cell Biol **1**(3): 208-16.

Gross, J., Lapiere, C. M. (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. Proc Natl Acad Sci U S A **48**: 1014-22.

Grossmann, J. (2002). Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". Apoptosis **7**(3): 247-60.

Gu, Q., Wang, D., Gao, Y., Zhou, J., Peng, R., Cui, Y., Xia, G., Qing, Q., Yang, H., Liu, J., Zhao, M. (2002). Expression of MMP1 in surgical and radiation-impaired wound healing and its effects on the healing process. J Environ Pathol Toxicol Oncol **21**(1): 71-8.

Gumbiner, B., Stevenson, B., Grimaldi, A. (1988). The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. J Cell Biol **107**(4): 1575-87.

Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell **84**(3): 345-57.

Gunja-Smith, Z., Moralles, A. R., Romanelli, R., Woessner, J. F. (1996). Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy. Am J Pathol **148**: 1639-48.

Gunter-Smith, P. (1987). Effect of ionizing radiation on gastrointestinal physiology. Military Radiobiology. J. Conklin, R. Walker. Orlando, Academic press: 135-52.

Gunter-Smith, P. (1995). The effect of radiation on intestinal electrolyte transport. Radiation and the gastrointestinal tract. A. Dubois, G. King, D. Livengood. Boca Raton, CRC Press.

Gunter-Smith, P. J. (1986). Gamma radiation affects active electrolyte transport by rabbit ileum: basal Na and Cl transport. Am J Physiol **250**(4 Pt 1): G540-5.

Günther, U., Schuppan, D., Bauer, M., Matthes, H., Stalmach, A., Schmitt-Gräff, A., Riecken, E. O., Herbst, H. (1999). Fibrogenesis and Fibrolysis in Collagenous Colitis : Pattern of Procollagen Types I and IV, Matrix Metalloproteinase-1 and 13, and TIMP-1 Gene Expression. American Journal of Pathology **155**: 493-503.

Gururajan, R., Grenet, J., Lahti, J. M., Kidd, V. J. (1998). Isolation and characterization of two novel metalloproteinase genes linked to the Cdc2L locus on human chromosome 1p36.3. Genomics **52**(1): 101-6.

Gutman, A., Wasyluk, B. (1990). The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. Embo J **9**(7): 2241-6.

Guzman-Stein, G., Bonsack, M., Liberty, J., Delaney, J. P. (1989). Abdominal radiation causes bacterial translocation. J Surg Res **46**(2): 104-7.

Haimovitz-Friedman, A. (1998). Radiation-induced signal transduction and stress response. Radiat Res **150**(5 Suppl): S102-8.

Hakenjos, L., Bamberg, M., Rodemann, H. P. (2000). TGF-beta1-mediated alterations of rat lung fibroblast differentiation resulting in the radiation-induced fibrotic phenotype. Int J Radiat Biol **76**(4): 503-9.

Hall, P. A., Coates, P. J., Ansari, B., Hopwood, D. (1994). Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. J Cell Sci **107**(Pt 12): 3569-77.

Hallahan, D. E., Virudachalam, S. (1999). Accumulation of P-selectin in the lumen of irradiated blood vessels. Radiat Res **152**(1): 6-13.

Hamzaoui, N., Kerneis, S., Pringault, E. (2000). Rôle des cellules M dans le transport des macromolécules et des micro-organismes intestinaux. Biologie et Pathologie des Epithéliums. E.D.K. Paris: 201-12.

Handschel, J., Prott, F. J., Sunderkotter, C., Metze, D., Meyer, U., Joos, U. (1999). Irradiation induces increase of adhesion molecules and accumulation of beta2-integrin-expressing cells in humans. Int J Radiat Oncol Biol Phys **45**(2): 475-81.

Harendza, S., Pollock, A. S., Mertens, P. R., Lovett, D. H. (1995). Tissue-specific enhancer-promoter interactions regulate high-level constitutive expression of matrix metalloproteinase 2 by glomerular mesangial cells. J Biol Chem **270**: 187786-96.

Harper, E., Bloch, K. J., Gross, J. (1971). The zymogen of tadpole collagenase. Biochemistry **10**(16): 3035-41.

Harwig, S., Eisenhauper, P., Chen, N., Lehrer, R. (1995). Cryptdins : endogenous antibiotic peptides of small intestinal Paneth cells. Adv Exp Med Biol **371A**: 251-5.

Hasty, K. A., Pourmotabbed, T. F., Goldberg, G. I., Thompson, J. P., Spinella, D. G., Stevens, R. M., Mainardi, C. L. (1990). Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. J Biol Chem **265**(20): 11421-4.

Hauer Jensen, M., Sauer, T., Devik, F., Nygaard, K. (1983). Effects of dose fractionation on late roentgen radiation damage of rat small intestine. Acta Radiol Oncol **22**(5): 381-4.

Hauer-Jensen, M., Richter, K., Wang, J., Abe, E., Sung, C., Hardin, J. W. (1998). Changes in transforming growth factor beta 1 gene expression and immunoreactivity levels during the development of chronic radiation enteropathie. Radiation research **150**: 673-80.

Hauer-Jensen, M., Wang, J., Denham, J. W. (2003). Bowel injury: current and evolving management strategies. Semin Radiat Oncol **13**(3): 357-71.

Hayakawa, T. (1994). Tissue inhibitors of metalloproteinases and their cell growth-promoting activity. Cell Struct Funct **19**: 109-14.

Hayday, A., Theodoridis, E., Ramsburg, E., Shires, J. (2001). Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. Nat Immunol **2**(11): 997-1003.

Heckenkamp, J., Nigri, G. R., Waterman, P. R., Overhaus, M., Kossodo, S. C., Lamuraglia, G. M. (2004). Gamma-irradiation modulates vascular smooth muscle cell and extracellular matrix function: Implications for neointimal development. J Vasc Surg **39**(5): 1097-103.

Hendry, J. H., Potten, C. S., Roberts, N. P. (1983). The gastrointestinal syndrome and mucosal clonogenic cells: relationships between target cell sensitivities, LD50 and cell survival, and their modification by antibiotics. Radiat Res **96**(1): 100-12.

Heremans, A., De Cock, B., Cassiman, J. J., Van den Berghe, H., David, G. (1990). The core protein of the matrix-associated heparan sulfate proteoglycan binds to fibronectin. J Biol Chem **265**(15): 8716-24.

Hermann, G., Wlascek, M., Lange, T. S., Prenzel, K., Goerz, G., Scharffetter-Kochanek, K. (1993). UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts. Experimental Dermatology **2**: 92-97.

Hernandez-Barrantes, S., Toth, M., Bernardo, M. M., Yurkova, M., Gervasi, D. C., Raz, Y., Sang, Q. A., Fridman, R. (2000). Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-

2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. J Biol Chem **275**(16): 12080-9.

Hiller, O., Lichte, A., Oberpichler, A., Kocourek, A., Tschesche, H. (2000). Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII. J Biol Chem **275**(42): 33008-13.

Holmbeck, K., Bianco, P., Yamada, S., Birkedal-Hansen, H. (2004). MT1-MMP: a tethered collagenase. J Cell Physiol **200**(1): 11-19.

Hooper, N. M. (1994). Families of zinc metalloproteases. FEBS Letters **354**: 1-6.

Hopewell, J. (1998). The skin : its structure and responses to ionizing radiation. Diagnostic and treatment of radiation injury, Rotterdam.

Hopf, M., Gohring, W., Kohfeldt, E., Yamada, Y., Timpl, R. (1999). Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. Eur J Biochem **259**(3): 917-25.

Hornebeck, W. (2003). Down-regulation of tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival. Pathol Biol (Paris) **51**(10): 569-73.

Hornebeck, W., Emonard, H., Monboisse, J. C., Bellon, G. (2002). Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression. Semin Cancer Biol **12**(3): 231-41.

Hotary, K., Allen, E., Punturieri, A., Yana, I., Weiss, S. J. (2000). Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. J Cell Biol **149**(6): 1309-23.

Hovdenak, N., Fajardo, L. F., Hauer-Jensen, M. (2000a). Acute radiation proctitis: a sequential clinicopathologic study during pelvic radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys **48**(4): 1111-7.

Hovdenak, N., Sung, C. C., Hauer-Jensen, M. (2000b). Increased type IV collagenase activity in rectal mucosa during pelvic radiation therapy. Gut **47 (suppl III)**: A271.

Hovdenak, N., Wang, J., Sung, C. C., Kelly, T., Fajardo, L. F., Hauer-Jensen, M. (2002). Clinical significance of increased gelatinolytic activity in the rectal mucosa during external beam radiation therapy of prostate cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys **53**(4): 919-27.

Hsu, H. Y., Chai, C. Y., Lee, M. S. (1998). Radiation-induced muscle damage in rats after fractionated high-dose irradiation. Radiat Res **149**(5): 482-6.

Huhtala, P., Chow, L. T., Tryggvason, K. (1990). Structure of the human type IV collagenase gene. J Biol Chem **265**: 11077-82.

Husebye, E., Hauer-Jensen, M., Kjorstad, K., Skar, V. (1994). Severe late radiation enteropathy is characterized by impaired motility of proximal small intestine. Dig Dis Sci **39**(11): 2341-9.

Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell **110**(6): 673-87.

Iliakis, G. (1991). The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. Bioassays **13**(12): 641-8.

Imai, K., Hiramatsu, A., Fukushima, D., Pierschbacher, M. D., Okada, Y. (1997). Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. Biochem J **322** (Pt 3): 809-14.

Imai, K., Ohuchi, E., Aoki, T., Nomura, H., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M., Okada, Y. (1996). Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2. Cancer Res **56**(12): 2707-10.

Isemura, M., Sato, N., Yamaguchi, Y., Aikawa, J., Munakata, H., Hayashi, N., Yosizawa, Z., Nakamura, T., Kubota, A., Arakawa, M., et al. (1987). Isolation and characterization of fibronectin-binding proteoglycan carrying both heparan sulfate and dermatan sulfate chains from human placenta. J Biol Chem **262**(18): 8926-33.

Ito, A., Mukaiyama, A., Itoh, Y., Nagase, H., Thogersen, I. B., Enghild, J. J., Sasaguri, Y., Mori, Y. (1996). Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. J Biol Chem **271**(25): 14657-60.

Itoh, Y., Ito, A., Iwata, K., Tanzawa, K., Mori, Y., Nagase, H. (1998). Plasma membrane-bound tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 specifically inhibits matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) activated on the cell surface. J Biol Chem **273**(38): 24360-7.

Jacinto, A., Martinez-Arias, A., Martin, P. (2001). Mechanisms of epithelial fusion and repair. Nat Cell Biol **3**(5): E117-23.

Johnston, C. J., Williams, J. P., Okunieff, P., Finkelstein, J. N. (2002). Radiation-induced pulmonary fibrosis: examination of chemokine and chemokine receptor families. Radiat Res **157**(3): 256-65.

Joo, Y., Seo, K., Kim, H., Rew, J., Park, C., Kim, S. (2000). Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in gastric cancer. Digestive Diseases and Sciences **45**(1): 114-21.

Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. Nat Rev Cancer **3**(6): 422-33.

Kalogeris, T. J., Fukagawa, K., Tso, P. (1994). Synthesis and lymphatic transport of intestinal apolipoprotein A-IV in response to graded doses of triglyceride. J Lipid Res **35**(7): 1141-51.

Kedinger, M., Freund, J. N., Launay, J. F., Simon-Assmann, P. (2000). Cell Interactions through the Basement Membrane in Intestinal Development and Differentiation. Development of the Gastrointestinal Tract. I. R. Sanderson, W. A. Walker, B.C. Decker Inc.: 83 - 102.

Kedinger, M., Lefebvre, O., Duluc, I., Freund, J. N., Simon-Assmann, P. (1998). Cellular and molecular partners involved in gut morphogenesis and differentiation. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **353**(1370): 847-56.

KIM, T. H., MARS, W. M., STOLZ, D. B., MICHALOPOULOS, G. K. (2000). Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration. Hepatology **30**: 75-82.

Kleiner, D., Stetler-Stevenson, W. (1999). Matrix metalloproteinases and metastasis. Cancer Chemotherapy and Pharmacology **43 suppl**: S42-S51.

Kleiner, D., Stettler-Stevenson, W. (1993). Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteinases. Current Opinion in Cell Biology **5**: 891-97.

Knauper, V., Docherty, A. J., Smith, B., Tschesche, H., Murphy, G. (1997). Analysis of the contribution of the hinge region of human neutrophil collagenase (HNC, MMP-8) to stability and collagenolytic activity by alanine scanning mutagenesis. Febs Lett **405**(1): 60-4.

Ko, K., Yazumi, S., Yoshikawa, K., Konda, Y., Nakajima, M., Chiba, T., Takahashi, R. (2000). Activation of fibroblast-derived matrix metalloproteinase-2 by colon cancer cells in non-contact co-cultures. International Journal of Cancer **87**(2): 165-71.

Koshikawa, N., Giannelli, G., Cirullil, V., Miyazaki, K., Quaranta, V. (2000). Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. J Cell Biol **148**(3): 615-24.

Kruse, J. J., Bart, C. I., Visser, A., Wondergem, J. (1999). Changes in transforming growth factor-beta (TGF-beta 1), procollagen types I and II mRNA in the rat heart after irradiation. Int J Radiat Biol **75**(11): 1429-36.

Kuemmerle, J. F. (2000). Motility disorders of the small intestine: new insights into old problems. J Clin Gastroenterol **31**(4): 276-81.

Kumar, A., Collins, H., Van Tam, J., Scholefield, J. H., Watson, S. A. (2002). Effect of preoperative radiotherapy on matrilysin gene expression in rectal cancer. Eur J Cancer **38**(4): 505-10.

Kumar, A., Collins, H. M., Scholefield, J. H., Watson, S. A. (1999). The effect of pre-operative high dose irradiation on gelatinase expression in rectal cancer. gut **44**(suppl 1): A91.

Kumar, A., Collins, H. M., Scholefield, J. H., Watson, S. A. (2000). Increased type-IV collagenase (MMP-2 and MMP-9) activity following preoperative radiotherapy in rectal cancer. Br J Cancer **82**(4): 960-5.

Kurschat, P., Zigrino, P., Nischt, R., Breitkopf, K., Steurer, P., Klein, C. E., Krieg, T., Mauch, C. (1999). Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 regulates matrix metalloproteinase-2 activation by modulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity in high and low invasive melanoma cell lines. J Biol Chem **274**(30): 21056-62.

Lacy, E. R. (1988). Epithelial restitution in the gastrointestinal tract. J Clin Gastroenterol **10 Suppl 1**: S72-7.

Lafuma, C., El Nabout, R. A., Crechet, F., Hovnanian, A., Martin, M. (1994). Expression of 72-kDa gelatinase (MMP-2), collagenase (MMP-1), and tissue metalloproteinase inhibitor (TIMP) in primary pig skin fibroblast cultures derived from radiation-induced skin fibrosis. J Invest Dermatol **102**(6): 945-50.

Lambert, E., Dasse, E., Haye, B., Petitfrere, E. (2004). TIMPs as multifacial proteins. Crit Rev Oncol Hematol **49**(3): 187-98.

Lander, H. M., Ogiste, J. S., Teng, K. K., Novogrodsky, A. (1995). p21ras as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress. J Biol Chem **270**(36): 21195-8.

Langberg, C. W., Hauer-Jensen, M. (1996). Influence of fraction size on the development of late radiation enteropathy. An experimental study in the rat. Acta Oncol **35**(1): 89-94.

Langberg, C. W., Sauer, T., Reitan, J. B., Hauer-Jensen, M. (1992). Tolerance of rat small intestine to localized single dose and fractionated irradiation. Acta Oncol **31**(7): 781-7.

Lauer-Fields, J. L., Tuzinski, K. A., Shimokawa, K. I., Nagase, H., Fields, G. B. (2000). Hydrolysis of triple-helical collagen peptide models by matrix metalloproteinases. J Biol Chem **275**(18): 13282-90.

Lawrance, I. C., Wu, F., Leite, A. Z., Willis, J., West, G. A., Fiocchi, C., Chakravarti, S. (2003). A murine model of chronic inflammation-induced intestinal fibrosis down-regulated by antisense NF-kappa B. Gastroenterology **125**(6): 1750-61.

Lee, E., Schiller, L. R., Fordtran, J. S. (1988). Quantification of colonic lamina propria cells by means of a morphometric point-counting method. Gastroenterology **94**(2): 409-18.

Lefaix, J. L., Daburon, F. (1998). Diagnosis of acute localized irradiation lesions: review of the French experimental experience. Health Phys **75**(4): 375-84.

Lefaix, J. L., Daburon, F., Martin, M., Remy, J. (1990). [Gamma irradiation and delayed effects: muscular fibrosis]. Pathol Biol (Paris) **38**(6): 617-25.

Lehti, K., Valtanen, H., Wickström, S., J., L., Keski-Oja, J. (2000). Regulation of membrane-type-1 matrix metalloproteinase activity by its cytoplasmic domain. Journal of Biological Chemistry **275**(20): 15006-13.

Lempinen, M., Inkinen, K., Wolff, H., Ahonen, J. (2000). Matrix metalloproteinases 2 and 9 in indomethacin-induced rat gastric ulcer. Eur Surg Res **32**: 169-76.

Leshner, S. (1967). Compensatory reactions in intestinal crypt cells after 300 Roentgens of cobalt-60 gamma irradiation. Radiat Res **32**(3): 510-9.

Levi, E., Fridman, R., Miao, H. Q., Ma, Y. S., Yayon, A., Vlodavsky, I. (1996). Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. Proc Natl Acad Sci U S A **93**(14): 7069-74.

Linard, C., Marquette, C., Mathieu, J., Pennequin, A., Clarencon, D., Mathe, D. (2004). Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-irradiation in the rat: effect of an NF-kappaB inhibitor. Int J Radiat Oncol Biol Phys **58**(2): 427-34.

Linard, C., Marquette, C., Strup, C., Aigueperse, J., Mathe, D. (2003a). Involvement of primary afferent nerves after abdominal irradiation: consequences on ileal contractile activity and inflammatory mediator release in the rat. Dig Dis Sci **48**(4): 688-97.

Linard, C., Ropenga, A., Vozenin-Brotans, M. C., Chapel, A., Mathe, D. (2003b). Abdominal irradiation increases inflammatory cytokine expression and activates NF-kappaB in rat ileal muscularis layer. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **285**(3): G556-65.

Liu, Y. W., Sanders, M. A., Basson, M. D. (1999). Loss of matrix-dependent cytoskeletal tyrosine kinase signals may regulate intestinal epithelial differentiation during mucosal healing. J Gastrointest Surg **3**(1): 82-94.

Lochter, A., Galosy, S., Muschler, J., Freedman, N., Werb, Z., Bissell, M. J. (1997). Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. J Cell Biol **139**(7): 1861-72.

Logan, S. K., Hansell, E. J., Damsky, C. H., Werb, Z. (1996). T-antigen inhibits metalloproteinase expression and invasion in human placental cells transformed with temperature-sensitive simian virus 40. Matrix Biol **15**(2): 81-9.

Lohi, J., Lehti, K., Valtanen, H., Parks, W. C., Keski-Oja, J. (2000). Structural analysis and promoter characterization of the human membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene. Gene **242**(1-2): 75-86.

Lopez-Bodao, Y., Wilson, C., Hooper, L., Gordon, J., Hultgren, S., Parks, W. (2000). Bacterial exposure induces and activates matrilysin in mucosal epithelial cells. Journal of Cell Biology **148**(6): 1305-15.

Louis, E., Belaiche, J. (2000). Effect of ofloxacin on the production of pro-inflammatory cytokines and MMP-3 by cultured colonic biopsies in Crohns disease. Gut **47 (suppl III)**: A223.

Louis, E., Ribbens, C., Godon, A., Franchimont, D., De Groote, D., Hardy, N., Boniver, J., Belaiche, J., Malaise, M. (2000). Increased production of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by inflamed mucosa in inflammatory bowel disease. Clin Exp Immunol **120**(2): 241-6.

Ludwig, M. G., Basset, P., Anglard, P. (2000). Multiple regulatory elements in the murine stromelysin-3 promoter. Evidence for direct control by CCAAT/enhancer-binding protein beta and thyroid and retinoid receptors. J Biol Chem **275**(51): 39981-90.

Lukashev, M. E., Werb, Z. (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. Trends Cell Biol **8**(11): 437-41.

Lukinius, A. I., Ericsson, J. L., Lundqvist, M. K., Wilander, E. M. (1986). Ultrastructural localization of serotonin and polypeptide YY (PYY) in endocrine cells of the human rectum. J Histochem Cytochem **34**(6): 719-26.

Lund, L. R., Romer, J., Bugge, T. H., Nielsen, B. S., Frandsen, T. L., Degen, J. L., Stephens, R. W., Dano, K. (1999). Functional overlap between two classes of matrix-degrading proteases in wound healing. Embo J **18**(17): 4645-56.

Lussier, C., Basora, N., Bouatrouss, Y., Beaulieu, J. F. (2000). Integrins as mediators of epithelial cell-matrix interactions in the human small intestinal mucosa. Microsc Res Tech **51**(2): 169-78.

MacDonald, T. (1998). Mucosal T cells. M. TT, Basel, Karger: 103-17.

MacDonald, T. T., Bajaj-Elliott, M., Pender, S. L. (1999). T cells orchestrate intestinal mucosal shape and integrity. Immunol Today **20**: 505-10.

MacDonald, T. T., Pender, S. L. F. (1998). Proteolytic enzymes in inflammatory bowel disease. Inflammatory Bowel Diseases **4**: 157-64.

MacDonald, W. C., Trier, J. S., Everett, N. B. (1964). Cell proliferation and migration in the stomach, duodenum, and rectum of man: radioautographic studies. Gastroenterology **46**: 405-17.

MacNaughton, W. K., Leach, K. E., Prud'homme-Lalonde, L., Harding, R. K. (1997). Exposure to ionizing radiation increases responsiveness to neural secretory stimuli in the ferret jejunum in vitro. Int J Radiat Biol **72**(2): 219-26.

MacNaughton, W. K., Leach, K. E., Prud'homme-Lalonde, L., Ho, W., Sharkey, K. A. (1994). Ionizing radiation reduces neurally evoked electrolyte transport in rat ileum through a mast cell-dependent mechanism. Gastroenterology **106**(2): 324-35.

Mahida, Y., Beltinger, J., Maks, S., Göke, M., Gray, T., Podolski, D., Hawkey, C. (1997). Adult human colonic subepithelial myofibroblasts express extracellular matrix proteins and cyclooxygenase-1 and -2. Am. J. Physiol. **273**(Gastrointest. Liver Physiol.): G1341-G48.

Mammen, J. M., Matthews, J. B. (2003). Mucosal repair in the gastrointestinal tract. Crit Care Med **31**(8 Suppl): S532-7.

Maquoi, E., Frankenne, F., Baramova, E., Munaut, C., Sounni, N., Remacle, A., Noël, A., Murphy, G., Foidart, J. (2000). Membrane type 1 matrix metalloproteinase-associated degradation of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in human tumor cell lines. JBC **275**(15): 11368-78.

Marsh, J. C. (1994). Is there a role for adjuvant therapy in bowel cancer? J Clin Gastroenterol **18**(3): 184-8.

Marshman, E., Booth, C., Potten, C. S. (2002). The intestinal epithelial stem cell. Bioassays **24**(1): 91-8.

Marshman, E., Ottewill, P. D., Potten, C. S., Watson, A. J. (2001). Caspase activation during spontaneous and radiation-induced apoptosis in the murine intestine. J Pathol **195**(3): 285-92.

Martin, M., Delanian, S., Sivan, V., Vozenin-Brotans, M. C., Reisdorf, P., Lawrence, D., Lefaix, J. L. (2000a). Radiation-induced superficial fibrosis and TGF-alpha 1. Cancer Radiother **4**(5): 369-84.

Martin, M., Lefaix, J., Delanian, S. (2000b). TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? Int J Radiat Oncol Biol Phys **47**(2): 277-90.

Martin, M., Lefaix, J. L., Pinton, P., Crechet, F., Daburon, F. (1993). Temporal modulation of TGF-beta 1 and beta-actin gene expression in pig skin and muscular fibrosis after ionizing radiation. Radiat Res **134**(1): 63-70.

Matsuzawa, T., Wilson, R. (1965). The Intestinal Mucosa of Germfree Mice after Whole-Body X-Irradiation with 3 Kilorontgens. Radiat Res **25**: 15-24.

Matter, K., Balda, M. S. (2003). Signalling to and from tight junctions. Nat Rev Mol Cell Biol **4**(3): 225-36.

MATTHES, H., STALLMACH, A., MATTHES, B. (1993). Hinweise für einen differenzierten Kollagenmetabolismus bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. **88**: 185-92.

Mauviel, A. (1993). Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. Journal of Biological Chemistry **53**: 288-95.

McBride, W. H. (1995). Cytokine cascades in late normal tissue radiation responses. Int J Radiat Oncol Biol Phys **33**(1): 233-4.

McKaig, B., Collins, H., Hawkey, C., Watson, S., Mahida, Y. (2000). Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by human intestinal myofibroblasts. (2897): AGA A551.

McKaig, B., Makh, S., Hawkey, C., Podolski, D., Mahida, Y. (1999). Normal human colonic subepithelial myofibroblasts enhance epithelial migration (restitution) via TGF- β 3. American Journal of Physiology **276**: G1087-G93.

McKerrow, J. H., Bhargava, V., Hansell, E., Huling, S., Kuwahara, T., Matley, M., Coussens, L., Warren, R. (2000). A functional proteomics screen of proteases in colorectal carcinoma. Mol Med **6**(5): 450-60.

McQuibban, G. A., Gong, J. H., Tam, E. M., McCulloch, C. A., Clark-Lewis, I., Overall, C. M. (2000). Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. Science **289**(5482): 1202-6.

McVay, L., Li, B., Biancaniello, R., Rombeau, J. L., Carding, S. R. (1997). Selective interaction of human T cells with colonic fibroblasts in IBD. Gastroenterology **112**(4): A1039.

Medina, C., Videla, S., Radomski, A., Radomski, M., Antolin, M., Guarner, F., Vilaseca, J., Salas, A., Malagelada, J. R. (2001). Therapeutic effect of phenantroline in two rat models of inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol **36**(12): 1314-9.

Merritt, A. J., Potten, C. S., Kemp, C. J., Hickman, J. A., Balmain, A., Lane, D. P., Hall, P. A. (1994). The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice. Cancer Res **54**(3): 614-7.

Miller, M. A., Bunnett, N. W., Debas, H. T. (1994). Laminin mediates the restitution of rat gastric mucosa in vitro. Exp Physiol **79**(5): 647-59.

Miyagawa, S., Kawasaki, S. (2000). Immunohistochemical analysis of matrix metalloproteinase 7 expression in metastatic liver tumors from colorectal cancer. Gut **47** (suppl III): A193.

Molla, M., Gironella, M., Salas, A., Miquel, R., Perez-del-Pulgar, S., Conill, C., Engel, P., Biete, A., Pique, J. M., Panes, J. (2001). Role of P-selectin in radiation-induced intestinal inflammatory damage. Int J Cancer **96**(2): 99-109.

Moore, R., Carlson, S., Madara, J. L. (1989). Rapid barrier restitution in an in vitro model of intestinal epithelial injury. Lab Invest **60**(2): 237-44.

Moore, R., Madri, J., Carlson, S., Madara, J. L. (1992). Collagens facilitate epithelial migration in restitution of native guinea pig intestinal epithelium. Gastroenterology **102**(1): 119-30.

Mori, M., Barnard, G. F., Mimori, K., Ueo, H., Akiyoshi, T., Sugimachi, K. (1994). Overexpression of matrix metalloproteinase-7 mRNA in human colon carcinomas. Cancer **75**(6): 1516-19.

Moulder, J. E. (2002). Report on an interagency workshop on the radiobiology of nuclear terrorism. Molecular and cellular biology dose (1-10 Sv) radiation and potential mechanisms of radiation protection (Bethesda, Maryland, December 17-18, 2001). Radiat Res **158**(1): 118-24.

Mowat, A. M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. Nat Rev Immunol **3**(4): 331-41.

Murphy, G., Allan, J. A., Willenbrock, F., Cockett, M. I., O'Connell, J. P., Docherty, A. J. (1992). The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. J Biol Chem **267**(14): 9612-8.

Murphy, G., Nguyen, Q., Cockett, M. I., Atkinson, S. J., Allan, J. A., Knight, C. G., Willenbrock, F., Docherty, A. J. (1994). Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. J Biol Chem **269**(9): 6632-6.

Murphy, G., Willenbrock, F. (1995). Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases. Methods Enzymol **248**: 496-510.

Naftalin, R. (2004). Alterations in colonic barrier function caused by a low sodium diet or ionizing radiation. J Environ Pathol Toxicol Oncol **23**(2): 79-97.

Nagase, H., Woessner, J. F., Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. J Biol Chem **274**(31): 21491-4.

Natarajan, R., Ghosh, S., Fisher, B. J., Diegelmann, R. F., Willey, A., Walsh, S., Graham, M. F., Fowler, A. A., 3rd (2001). Redox imbalance in Crohn's disease intestinal smooth muscle cells causes NF-kappaB-mediated spontaneous interleukin-8 secretion. J Interferon Cytokine Res **21**(6): 349-59.

Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L., Matrisian, L. M. (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. J Clin Oncol **18**(5): 1135-49.

Neutra, M. R., Grand, R. J., Trier, J. S. (1977). Glycoprotein synthesis, transport, and secretion by epithelial cells of human rectal mucosa: normal and cystic fibrosis. Lab Invest **36**(5): 535-46.

Newell, K. J., Witty, J. P., Rodgers, W. H., Matrisian, L. M. (1994). Expression and localization of matrix-degrading metalloproteinases during colorectal tumorigenesis. Molecular Carcinogenesis **10**(4): 199-206.

Nguyen, Q., Willenbrock, F., Cockett, M., O'Shea, M., Docherty, A., Murphy, G. (1994). Different domain interactions are involved in the binding of tissue inhibitors of metalloproteinases to stromelysin-1 and gelatinase A. Biochemistry **33**: 2089-95.

Nirmala, C., Jasti, S. L., Sawaya, R., Kyritsis, A. P., Konduri, S. D., Ali-Osman, F., Rao, J. S., Mohanam, S. (2000). Effects of radiation on the levels of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 during morphogenic glial-endothelial cell interactions. Int J Cancer **88**(5): 766-71.

Noe, V., Fingleton, B., Jacobs, K., Crawford, H. C., Vermeulen, S., Steelant, W., Bruyneel, E., Matrisian, L. M., Mareel, M. (2001). Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. J Cell Sci **114**(Pt 1): 111-18.

Nusrat, A., Delp, C., Madara, J. L. (1992). Intestinal epithelial restitution. Characterization of a cell culture model and mapping of cytoskeletal elements in migrating cells. J Clin Invest **89**(5): 1501-11.

Nusrat, A., Parkos, C. A., Bacarra, A. E., Godowski, P. J., Delp-Archer, C., Rosen, E. M., Madara, J. L. (1994). Hepatocyte growth factor/scatter factor effects on epithelia. Regulation of intercellular junctions in transformed and nontransformed cell lines, basolateral polarization of c-met receptor in transformed and natural intestinal epithelia, and induction of rapid wound repair in a transformed model epithelium. J Clin Invest **93**(5): 2056-65.

Obe, G., Johannes, C., Schulte-Frohlinde, D. (1992). DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. Mutagenesis **7**(1): 3-12.

Okada, A., Bellocq, J. P., Rouyer, N., Chenard, M. P., Rio, M. C., Chambon, P., Basset, P. (1995). Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. Proc Natl Acad Sci U S A **92**(7): 2730-4.

Okada, Y., Morodomi, T., Enghild, J. J., Suzuki, K., Yasui, A., Nakanashi, I. (1990). Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. Eur J Biochem **194**: 721-30.

Olsen, B. R. (1999). Life without perlecan has its problems. J Cell Biol **147**(5): 909-12.

Opdenakker, G., Van den Steen, P. E., Dubois, B., Nelissen, I., Van Coillie, E., Masure, S., Proost, P., Van Damme, J. (2001). Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. J Leukoc Biol **69**(6): 851-9.

O'Reilly, M. S., Wiederschain, D., Stetler-Stevenson, W. G., Folkman, J., Moses, M. A. (1999). Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. J Biol Chem **274**(41): 29568-71.

Ouellette, A. J., Greco, R. M., James, M., Fredeick, D., Naftilan, J., Fallon, J. T. (1989). Developmental regulation of cryptdin, a corticostatin/defensin precursor mRNA in mouse small intestinal crypt epithelium. J Biol Chem **108**(5): 1687-95.

Overall, C., Wrana, J., Sodek, J. (1991a). Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor- β 1 in human fibroblast. Comparison with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. Journal of Biological Chemistry **266**: 14064-71.

Overall, C. M., Wrana, J. L., Sodek, J. (1991b). Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. J Biol Chem **266**(21): 14064-71.

Panes, J., Molla, M., Casadevall, M., Salas, A., Sans, M., Conill, C., Anderson, D. C., Rosello-Catafau, J., Granger, D. N., Pique, J. M. (2000). Tepoxalin inhibits inflammation and microvascular dysfunction induced by abdominal irradiation in rats. Aliment Pharmacol Ther **14**(6): 841-50.

Pankov, R., Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. J Cell Sci **115**(20): 3861-3.

Paris, F., Fuks, Z., Kang, A., Capodiceci, P., Juan, G., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., Kolesnick, R. (2001). Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. Science **293**(5528): 293-7.

Park, H. I., Ni, J., Gerkema, F. E., Liu, D., Belozarov, V. E., Sang, Q. X. (2000). Identification and characterization of human endometase (Matrix metalloproteinase-26) from endometrial tumor. J Biol Chem **275**(27): 20540-4.

Patterson, B. C., Sang, Q. A. (1997). Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). J Biol Chem **272**(46): 28823-5.

Pei, D., Weiss, S. J. (1995). Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. Nature **375**(6528): 244-7.

Pendas, A. M., Balbin, M., Llano, E., Jimenez, M. G., Lopez-Otin, C. (1997). Structural analysis and promoter characterization of the human collagenase-3 gene (MMP13). Genomics **40**(2): 222-33.

Pender, S. L., Braegger, C., Gunther, U., Monteleone, G., Meuli, M., Schuppan, D., Macdonald, T. T. (2003). Matrix metalloproteinases in necrotising enterocolitis. Pediatr Res **54**(2): 160-4.

Pender, S. L., Breese, E. J., Gunther, U., Howie, D., Wathen, N. C., Schuppan, D., Macdonald, T. T. (1998a). Suppression of T cell-mediated injury in human gut by interleukin 10: role of matrix metalloproteinases. Gastroenterology **115**: 573-83.

Pender, S. L., Fell, J. M., Chamow, S. M., Ashkenazi, A., Macdonald, T. T. (1998b). A p55 TNF receptor immunoadhesin prevents T cell-mediated intestinal injury by inhibiting matrix metalloproteinase production. J Immunol **160**: 4098-103.

Pender, S. L., Lionetti, P., Murch, S. H., Wathan, N., MacDonald, T. T. (1996). Proteolytic degradation of intestinal mucosal extracellular matrix after lamina propria T cell activation. Gut **39**(2): 284-90.

Pender, S. L., McKenzie, C., Shaida, A., MacDonald, T. T. (1999). Regulation of matrix metalloproteinases in human intestinal mucosa. Ann N Y Acad Sci **878**: 581-2.

Pender, S. L., Quinn, J. J., Sanderson, I. R., Macdonald, T. T. (2000a). Butyrate upregulates stromelysin-1 production by intestinal mesenchymal cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **279**: G918-G24.

Pender, S. L., Salmela, M. T., Monteleone, G., Schnapp, D., McKenzie, C., Spencer, J., Fong, S., Saarialho-Kere, U., Macdonald, T. T. (2000b). Ligation of alpha4beta1 integrin on human intestinal mucosal mesenchymal cells selectively up-regulates membrane type-1 matrix metalloproteinase and confers a migratory phenotype. Am J Pathol **157**(6): 1955-62.

Pender, S. L., Tickle, S. P., Docherty, A. J., Howie, D., Wathen, N. C., MacDonald, T. T. (1997). A major role for matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. J Immunol **158**(4): 1582-90.

Perey, D. Y., Frommel, D., Hong, R., Good, R. A. (1970). The mammalian homologue of the avian bursa of Fabricius. II. Extirpation, lethal x-irradiation, and reconstitution in rabbits. Effects on humoral immune responses, immunoglobulins, and lymphoid tissues. Lab Invest **22**(3): 212-27.

Perry, M., Baugh, M., Evans, G., Lobo, A. (1999). Expression of matrix metalloproteinase-9 in inflammatory bowel disease. Gut **44 (suppl)**: A33.

Peter, R. (1998). Diagnosis and treatment of the cutaneous radiation syndrome. Diagnosis and treatment of radiation injury, Rotterdam.

Phillips, P. A., McCarroll, J. A., Park, S., Wu, M.-J., Pirola, R., Korsten, M., Wilson, J. S., Apte, M. V. (2003). Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. Gut **52**: 275-82.

Plaisancie, P., Bosshard, A., Meslin, J. C., Cuber, J. C. (1997). Colonic mucin discharge by a cholinergic agonist, prostaglandins, and peptide YY in the isolated vascularly perfused rat colon. Digestion **58**(2): 168-75.

Podolsky, D. K. (2002). Inflammatory bowel disease. N Engl J Med **347**(6): 417-29.

Ponder, B. A., Schmidt, G. H., Wilkinson, M. M., Wood, M. J., Monk, M., Reid, A. (1985). Derivation of mouse intestinal crypts from single progenitor cells. Nature **313**(6004): 689-91.

Potten, C. S. (1990). A comprehensive study of the radiobiological response of the murine (BDF1) small intestine. Int J Radiat Biol **58**(6): 925-73.

Potten, C. S. (1997). Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. Am J Physiol **273**(2): G253-7.

Potten, C. S. (2004). Radiation, the ideal cytotoxic agent for studying the cell biology of tissues such as the small intestine. Radiat Res **161**(2): 123-36.

Potten, C. S., Booth, C., Pritchard, D. M. (1997). The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. Int J Exp Pathol **78**(4): 219-43.

Potten, C. S., Hendry, J. H. (1983). Stem cells in murine small intestine. Stem cells: Their identification and Characterisation. C. S. Potten. Edinburgh, Churchill Livingstone: 153-99.

Potten, C. S., Merritt, A., Hickman, J., Hall, P., Faranda, A. (1994). Characterization of radiation-induced apoptosis in the small intestine and its biological implications. Int J Radiat Biol **65**(1): 71-8.

Potten, C. S., Owen, G., Booth, D. (2002). Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. J Cell Sci **115**(Pt 11): 2381-8.

Pritchard, D. M., Watson, A. J. (1996). Apoptosis and gastrointestinal pharmacology. Pharmacol Ther **72**(2): 149-69.

Probstmeier, R., Martini, R., Schachner, M. (1990). Expression of J1/tenascin in the crypt-villus unit of adult mouse small intestine: implications for its role in epithelial cell shedding. Development **109**(2): 313-21.

Przemioslo, R. T., Kontakou, M., Nobili, V. (1994). Raised proinflammatory cytokines interleukin 6 and tumour necrosis factor α in coeliac disease mucosa detected by immunohistochemistry. Gut **35**: 1398-403.

Qu, X., Llyod, K., Walsh, J., Lehrer, R. (1996). Secretion of type II phospholipase A2 and cryptdin by rat small intestinal Paneth cells. Infect Immun **64**(12): 5161-5.

Quaranta, V. (2000). Cell migration through extracellular matrix : membrane-type metalloproteinases make the way. J Cell Biol **149**(6): 1167-69.

Quarmby, S., West, C., Magee, B., Stewart, A., Hunter, R., Kumar, S. (2002). Differential expression of cytokine genes in fibroblasts derived from skin biopsies of patients who developed minimal or severe normal tissue damage after radiotherapy. Radiat Res **157**(3): 243-8.

Quastler, H. (1956). The nature of intestinal radiation death. Radiat Res **4**(4): 303-20.

Rao, J. S., Rayford, A., Yamamoto, M., Ang, K. K., Tofilon, P., Sawaya, R. (1994). Modulation of fibrinolysis by ionizing radiation. J Neurooncol **22**(2): 161-71.

Raza, S. L., Nehring, L. C., Shapiro, S. D., Cornelius, L. A. (2000). Proteinase-activated receptor-1 regulation of macrophage elastase (MMP-12) secretion by serine proteinases. J Biol Chem **275**(52): 41243-50.

Reinecker, H., Steffen, M., Witthoef, T., Pflueger, I., Schreiber, S., MacDermott, R. P., Raedler, A. (1993). Enhanced secretion of tumor necrosis factor- α , IL-6, and IL-1 β by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. Clinical Experimental Immunology **94**(1): 174-81.

Richman, P. I., Tilly, R., Jass, J. R., Bodmer, W. F. (1987). Colonic pericrypt sheath cells: characterisation of cell type with new monoclonal antibody. J Clin Pathol **40**(6): 593-600.

Richter, K. K., Langberg, C. W., Sung, C. C., Hauer-Jensen, M. (1996). Association of transforming growth factor beta (TGF- β) immunoreactivity with specific histopathologic lesions in subacute and chronic experimental radiation enteropathy. Radiother Oncol **39**(3): 243-51.

Romer, J., Bugge, T. H., Pyke, C., Lund, L. R., Flick, M. J., Degen, J. L., Dano, K. (1996). Plasminogen and wound healing. Nat Med **2**(7): 725.

Rube, C. E., Uthe, D., Schmid, K. W., Richter, K. D., Wessel, J., Schuck, A., Willich, N., Rube, C. (2000). Dose-dependent induction of transforming growth factor beta (TGF- β) in the lung tissue of fibrosis-prone mice after thoracic irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys **47**(4): 1033-42.

Rubin, P., Casarett, G. W. (1968). Clinical radiation pathology as applied to curative radiotherapy. Cancer **22**(4): 767-78.

Rubin, P., Johnston, C. J., Williams, J. P., McDonald, S., Finkelstein, J. N. (1995). A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. Int J Radiat Oncol Biol Phys **33**(1): 99-109.

Rubio, C. A., Jalnäs, M. (1996). Dose-time dependent histological changes following irradiation of the small intestine of rats. Digestive Diseases and Sciences **41**(2): 392-401.

Ruifrok, A. C., Mason, K. A., Lozano, G., Thames, H. D. (1997). Spatial and temporal patterns of expression of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha and transforming growth factor beta 1-3 and their receptors in mouse jejunum after radiation treatment. Radiat Res **147**(1): 1-12.

Saarialho-Kere, U. K., Vaalamo, M., Puolakkainen, P. (1996a). Enhanced expression of matrix metalloproteinases, collagenase, and stromelysin-1 in gastrointestinal ulcers. Am J Pathol **148**: 519-26.

Saarialho-Kere, U. K., Vaalamo, M., Puolakkainen, P., Airola, K., Parks, W. C., Karjalainen-Lindsberg, M. L. (1996b). Enhanced expression of matrix metalloproteinases, collagenase, and stromelysin-1 in gastrointestinal ulcers. Am J Pathol **148**(2): 519-26.

Salmela, M. T., MacDonald, T. T., Black, D., Irvine, B., Zhuma, T., Saarialho-Kere, U., Pender, S. L. (2002). Upregulation of matrix metalloproteinases in a model of T cell mediated tissue injury in the gut: analysis by gene array and in situ hybridisation. Gut **51**(4): 540-7.

Salmela, M. T., Pender, S. L., Reunala, T., MacDonald, T. T., Saarialho-Kere, U. (2001). Parallel expression of macrophage metalloelastase (MMP-12) in duodenal and skin lesions of patients with dermatitis herpetiformis. Gut **48**: 496-502.

Sanchez-Lopez, R., Alexander, C. M., Behrendtsen, O., Breathnach, R., Werb, Z. (1993). Role of zinc-binding- and hemopexin domain-encoded sequences in the substrate specificity of collagenase and stromelysin-2 as revealed by chimeric proteins. J Biol Chem **268**(10): 7238-47.

Sandler, N. G., Mentink-Kane, M. M., Cheever, A. W., Wynn, T. A. (2003). Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. J Immunol **171**(7): 3655-67.

Sartor, R. B. (1995). Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. Gastroenterol Clin North Am **24**(3): 475-507.

Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E., Seiki, M. (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. Nature **370**(6484): 61-5.

Sato, T., Kondo, T., Fujisawa, T., Seiki, M., Ito, A. (1999). Furin-independent pathway of membrane type 1-matrix metalloproteinase activation in rabbit dermal fibroblasts. Journal of Biological Chemistry **274**(52): 37280-84.

Sauer, W. G. (1961). Carcinoidosis and the effect of serotonin on the gastrointestinal tract. Am J Dig Dis **6**: 906-13.

Sawaya, R., Rayford, A., Kono, S., Ang, K. K., Feng, Y., Stephens, L. C., Rao, J. S. (1994). Plasminogen activator inhibitor-1 in the pathogenesis of delayed radiation damage in rat spinal cord in vivo. J Neurosurg **81**(3): 381-7.

Scheppach, W., Dusel, G., Kuhn, T., Loges, C., Karch, H., Bartram, H. P., Richter, F., Christl, S. U., Kasper, H. (1996). Effect of L-glutamine and n-butyrate on the restitution of rat colonic mucosa after acid induced injury. Gut **38**(6): 878-85.

Schmidt-Ullrich, R. K., Dent, P., Grant, S., Mikkelsen, R. B., Valerie, K. (2000). Signal transduction and cellular radiation responses. Radiat Res **153**(3): 245-57.

Schmitz, J., Cerf-Bensussan, N. (2003). [Celiac disease 50 years later: certainties and hopes]. Arch Pediatr **10 Suppl 1**: 56s-60s.

Schofield, G. C., Ho, A. K., Southwell, J. M. (1967). Enterochromaffin cells and 5-hydroxytryptamine content of the colon of mice. J Anat **101**(4): 711-21.

Seifert, W., Wobbes, T., Hendricks, T. (1996). Divergent patterns of matrix metalloproteinase activity during wound healing in ileum and colon of rats. Gut **39**: 114-19.

Seifert, W. F., Wobbes, T., Hoogenhout, J., de Man, B. M., Hendriks, T. (1997). Intra-operative irradiation prolongs the presence of matrix metalloproteinase activity in large bowel anastomoses of the rat. Radiat Res **147**(3): 354-61.

Seong, J., Kim, S. H., Chung, E. J., Lee, W. J., Suh, C. O. (2000). Early alteration in TGF-beta mRNA expression in irradiated rat liver. Int J Radiat Oncol Biol Phys **46**(3): 639-43.

Seya, T., Ishikawa, N., Yokoi, K., Kyono, S., Yashamita, K., Koizumi, M., Takahashi, Y., Yoshimura, K., Takasaki, H., Onda, M., Naito, Z., Asano, G. (2000). Expression of type IV collagen and Matrix metalloproteinase-9 in colorectal cancer. Gut **47 (suppl III)**: A258.

Shankaravam, U. T., Lai, W. C., Netzel-Arnett, S., Mangan, P. R., Ardans, J. A., Caterina, N., Stetler-Stevenson, W. G., Birkedal-Hansen, H., Wahl, L. M. (2001). Monocyte membrane type 1-matrix metalloproteinase. J Biol Chem **276**(22): 19027-32.

Sherley, J. L. (2002). Asymmetric cell kinetics genes: the key to expansion of adult stem cells in culture. Stem Cells **20**(6): 561-72.

Shiple, J. M., Doyle, G. A., Fliszar, C. J., Ye, Q.-Z., Johnson, L. L., Shapiro, S. D., Welgus, H. G., Senior, R. M. (1996). The structural basis for the elastolytic activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases. Journal of Biological Chemistry **271**: 4335-41.

Silen, W. (1985). Pathogenetic factors in erosive gastritis. Am J Med **79**(2C): 45-8.

Silen, W. (1987). The clinical problem of stress ulcers. Clin Invest Med **10**(3): 270-4.

Skwarchuk, M. W., Travis, E. L. (1998). Volume effects and epithelial regeneration in irradiated mouse colorectum. Radiat Res **149**(1): 1-10.

Smart, D., Vincent, K., Arthur, M., Eickelberg, O., Castellazi, M., Mann, J., Mann, D. (2001). JunD regulates transcription of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and interleukin-6 genes in activated hepatic stellate cells. Journal of Biological Chemistry **276**(26): 24414-21.

Sobue, T., Hakeda, Y., Kobayashi, Y., Hayakawa, H., Yamashita, K., Aoki, T., Kumegawa, M., Noguchi, T., Hayakawa, T. (2001). Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 directly stimulate the bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. J Bone Miner Res **16**(12): 2205-14.

Somasundaram, R., Ruehl, M., Tiling, N., Ackermann, R., Schmid, M., Riecken, E. O., Schuppan, D. (2000). Collagens serve as an extracellular store of bioactive interleukin 2. J Biol Chem **275**(49): 38170-75.

Soo, C., Shaw, W., Zhang, X., Longaker, M., Howard, E., Ting, K. (2000). Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair. Plastic and Reconstructive Surgery **105**(2): 638-47.

Sottrup-Jensen, L., Birkedal-Hansen, H. (1989). Human fibroblast collagenase-alpha-macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian alpha-macroglobulins. J Biol Chem **264**(1): 393-401.

Specian, R. D., Oliver, M. G. (1991). Functional biology of intestinal goblet cells. Am J Physiol **260**(2): C183-93.

Stallmach, A., Chan, C., Ecker, K., Fieffel, G., Herbst, H., Schuppan, D., Zeitz, M. (2000). Comparable expression of matrix metalloproteinases 1 and 2 in pouchitis and ulcerative colitis. GUT **47**: 415-22.

Stanley, J. R., Woodley, D. T., Katz, S. I., Martin, G. R. (1982). Structure and function of basement membrane. J Invest Dermatol **79** Suppl 1: 69s-72s.

Stappenbeck, T. S., Wong, M. H., Saam, J. R., Mysorekar, I. U., Gordon, J. I. (1998). Notes from some crypt watchers: regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium. Curr Opin Cell Biol **10**(6): 702-9.

Sternlicht, M. D., Bissell, M. J., Werb, Z. (2000). The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene* **19**(8): 1102-13.

Sternlicht, M. D., Lochter, A., Sympson, C. J., Huey, B., Rougier, J. P., Gray, J. W., Pinkel, D., Bissell, M. J., Werb, Z. (1999). The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* **98**(2): 137-46.

Sternlicht, M. D., Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 463-516.

Stetler-stevenson, W. G. (1996). Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. *Am J Pathol* **148**: 1345-50.

Stocker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F. X., McKay, D. B., Bode, W. (1995). The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci* **4**(5): 823-40.

Streffer, C., Beisel, P. (1974). Radiation effects on NAD-and DNA-metabolism in mouse spleen. *Febs Lett* **44**(2): 127-30.

Streuli, C. H., Gilmore, A. P. (1999). Adhesion-mediated signaling in the regulation of mammary epithelial cell survival. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **4**(2): 183-91.

Stricker, T., Dumin, J., Dickeson, S., Chung, L., Nagase, H., Parks, W., Santoro, S. (2001). Structural analysis of the alpha2 integrin I domain/procollagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) interaction. *Journal of Biological Chemistry* **276**(31): 29375-81.

Strickland, I., Rhodes, L. E., Flanagan, B. F., Friedmann, P. S. (1997). TNF-alpha and IL-8 are upregulated in the epidermis of normal human skin after UVB exposure: correlation with neutrophil accumulation and E-selectin expression. *J Invest Dermatol* **108**(5): 763-8.

Strongin, A., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B., Grant, G., Golberg, G. (1995). Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloproteinase. *JBC* **270**: 5331-38.

Strup-Perrot, C., Mathe, D., Linard, C., Violot, D., Milliat, F., Francois, A., Bourhis, J., Vozenin-Brotans, M. C. (2004). Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**(4): G875-85.

Sun, Y., Wenger, L., Rutter, J. L., Brinckerhoff, C. E., Cheung, H. S. (1999). p53 down-regulates human matrix metalloproteinase-1 (Collagenase-1) gene expression. *J Biol Chem* **274**(17): 11535-40.

Takahashi, M., Ota, S., Shimada, T., Hamada, E., Kawabe, T., Okudaira, T., Matsumura, M., Kaneko, N., Terano, A., Nakamura, T., et al. (1995). Hepatocyte growth

factor is the most potent endogenous stimulant of rabbit gastric epithelial cell proliferation and migration in primary culture. J Clin Invest **95**(5): 1994-2003.

Theret, N., Musso, O., Campion, J. P., Turlin, B., Loreal, O., L'Helgoualc'h, A., Clement, B. (1997). Overexpression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in liver from patients with gastrointestinal adenocarcinoma and no detectable metastasis. Int J Cancer **74**(4): 426-32.

Thiagarajah, J. R., Griffiths, N. M., Pedley, K. C., Naftalin, R. J. (2002). Evidence for modulation of pericyptal sheath myofibroblasts in rat descending colon by transforming growth factor beta and angiotensin II. BMC Gastroenterol **2**(1): 4.

Thuneberg, L., Rumessen, J., Mikkelsen, H., Peters, S., Jessen, H. (1995). Structural aspects of interstitial cells of Cajal as an intestinal pace-maker cells. Pacemaker activity and intercellular communication. J. Huizinga. Boca Raton, CRC: 193-222.

Travis, M. A., Humphries, J. D., Humphries, M. J. (2003). An unraveling tale of how integrins are activated from within. Trends Pharmacol Sci **24**(4): 192-7.

Trim, J. E., Samra, S. K., Arthur, M. J., Wright, M. C., McAulay, M., Beri, R., Mann, D. A. (2000). Upstream tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) element-1, a novel and essential regulatory DNA motif in the human TIMP-1 gene promoter, directly interacts with a 30-kDa nuclear protein. J Biol Chem **275**(9): 6657-63.

Tubiana, M., Dutreix, J., Wambersie, A. (1986). Effets des rayonnements ionisants sur les molécules d'ADN et les chromosomes. Radiobiologie. Paris, Hermann: 33-71.

Uria, J. A., Jimenez, M. G., Balbin, M., Freije, J. M., Lopez-Otin, C. (1998). Differential effects of transforming growth factor-beta on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. J Biol Chem **273**(16): 9769-77.

Uria, J. A., Lopez-Otin, C. (2000). Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. Cancer Res **60**(17): 4745-51.

Vaalamo, M., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Puolakkainen, P., Kere, J., Saarialho-Kere, U. (1998). Distinct expression profiles of stomelysin-2 (MMP-10), collagenase-3 (MMP-13), Macrophage metalloelastase (MMP-12), and tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMPS-3) in intestinal ulcerations. Am J Pathol **152**: 1005-14.

Valente, P., Fassina, G., Melchiori, A., Masiello, L., Cilli, M., Vacca, A., Onisto, M., Santi, L., Stetler-Stevenson, W. G., Albin, A. (1998). TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. Int J Cancer **75**(2): 246-53.

Vallee, B.,Auld, D. (1992). Active zinc binding sites of zinc metalloenzymes. Matrix suppl 1: 5-19.

Van Wart, H. E.,Birkedal-Hansen, H. (1990). The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. Proc Natl Acad Sci U S A **87**(14): 5578-82.

Villar, M. J., Hassell, J. R.,Brandan, E. (1999). Interaction of skeletal muscle cells with collagen type IV is mediated by perlecan associated with the cell surface. J Cell Biochem **75**(4): 665-74.

von Lampe, B., Barthel, B., Coupland, S. E., Riecken, E. O.,Rosewicz, S. (2000). Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. Gut **47**(1): 63-73.

Vozenin-Brotons, M. C., Milliat, F., Linard, C., Strup, C., Francois, A., Sabourin, J. C., Lasser, P., Lusinchi, A., Deutsch, E., Girinsky, T., Aigueperse, J., Bourhis, J.,Mathe, D. (2004). Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization. Radiat Res **161**(3): 299-311.

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., Bourhis, J., Mathe, D., Girinsky, T.,Aigueperse, J. (2003). Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. Int J Radiat Oncol Biol Phys **56**(2): 561-72.

Vujaskovic, Z., Anscher, M. S., Feng, Q. F., Rabbani, Z. N., Amin, K., Samulski, T. S., Dewhirst, M. W.,Haroon, Z. A. (2001). Radiation-induced hypoxia may perpetuate late normal tissue injury. Int J Radiat Oncol Biol Phys **50**(4): 851-5.

Vujaskovic, Z.,Groen, H. J. (2000). TGF-beta, radiation-induced pulmonary injury and lung cancer. Int J Radiat Biol **76**(4): 511-6.

Waller, D. A., Thomas, N. W.,Self, T. J. (1988). Epithelial restitution in the large intestine of the rat following insult with bile salts. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **414**(1): 77-81.

Wang, C. J., Leung, S. W., Chen, H. C., Sun, L. M., Fang, F. M., Huang, E. Y., Hsiung, C. Y.,Changchien, C. C. (1998). The correlation of acute toxicity and late rectal injury in radiotherapy for cervical carcinoma: evidence suggestive of consequential late effect (CQLE). Int J Radiat Oncol Biol Phys **40**(1): 85-91.

Wang, J.,Robbins, M. E. (1996). Radiation-induced alteration of rat mesangial cell transforming growth factor-beta and expression of the genes associated with the extracellular matrix. Radiat Res **146**(5): 561-8.

- Wang, J. L., Sun, Y., Wu, S. (2000a). Gamma-irradiation induces matrix metalloproteinase II expression in a p53-dependent manner. Mol Carcinog **27**(4): 252-58.
- Wang, Z., Juttermann, R., Soloway, P. D. (2000b). TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. J Biol Chem **275**(34): 26411-5.
- Warren, S., Whipple, G. (1922). J. Exptl. Med. **35**: 187; 207; 13;.
- Warters, R. L., Hofer, K. G. (1977). Radionuclide toxicity in cultured mammalian cells. Elucidation of the primary site for radiation-induced division delay. Radiat Res **69**(2): 348-58.
- Watanabe, T., Niioka, M., Ishikawa, A., Hozawa, S., Arai, M., Maruyama, K., Okada, A., Okazaki, I. (2001). Dynamic change of cells expressing MMP-2 mRNA and MT1-MMP mRNA in the recovery from liver fibrosis in the rat. J Hepatol **35**(4): 465-73.
- Wegrowski, J., Lafuma, C., Lefaix, J. L., Daburon, F., Robert, L. (1988). Modification of collagen and noncollagenous proteins in radiation-induced muscular fibrosis. Exp Mol Pathol **48**(3): 273-85.
- Wegrowski, J., Lafuma, C., Lefaix, J. L., Robert, L., Daburon, F. (1986). Modifications of collagen, fibronectin and glycosaminoglycans of the pig thigh muscle after acute local gamma irradiation. Br J Radiol Suppl **19**: 113-6.
- Welsh, M. J., Smith, P. L., Fromm, M., Frizzell, R. A. (1982). Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. Science **218**(4578): 1219-21.
- Wenk, J., Brenneisen, P., Wlaschek, M., Poswig, A., Brivibas, K., Obertley, T. D., Scarfetter-Kochanek, K. (1999). Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1-mediated induction of matrix-degrading metalloproteinase-1. J Biol Chem **274**(36): 25869-76.
- Werb, Z. (1997). ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. Cell **91**(4): 439-42.
- Will, H., Atkinson, S. J., Butler, G. S., Smith, B., Murphy, G. (1996). The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. J Biol Chem **271**(29): 17119-23.
- Willenbrock, F., Murphy, G. (1994). Structure-function relationship in the tissue inhibitors of metalloproteinases. **150**: S165-S70.
- Wilson, A. J., Gibson, P. R. (1997). Epithelial migration in the colon: filling in the gaps. Clin Sci (Lond) **93**(2): 97-108.
- Wilson, C., Ouellette, A., Satchell, D., Ayabe, T., Lopez-Bodao, Y., Stratman, J., Hultgren, S., Matrisian, L., Parks, W. (1999). Regulation of intestinal α -defensin

activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. Science **286**: 113-17.

Witty, J. P., Bridgham, J. T., Johnson, A. L. (1996). Induction of apoptotic cell death in hen granulosa cells by ceramide. Endocrinology **137**(12): 5269-77.

Woessner, J., Nagase, H. (2000). Matrix metalloproteinases and TIMPs. New York, Oxford University Press.

Woessner, J. F. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB Journal **5**: 2145-54.

Wright, N. A., Alison, M. (1984). The Biology of Epithelial Cell Populations.

Wright, N. A., Irwin, M. (1982). The kinetics of villus cell populations in the mouse small intestine. I. Normal villi: the steady state requirement. Cell Tissue Kinet **15**(6): 595-609.

Wrong, O., Edmonds, C., Chadwick, V. (1981). The large Intestine : its role in mammalian nutrition and homeostasis. Lancaster, UK, MTP: 217.

Wu, A. L., Windmueller, H. G. (1979). Relative contributions by liver and intestine to individual plasma apolipoproteins in the rat. J Biol Chem **254**(15): 7316-22.

Wynn, T. A. (2004). Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. Nat Rev Immunol **4**(8): 583-94.

Yana, I., Weiss, S. (2000). Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. Molecular Biology of the Cell **11**: 2387-401.

Yanaka, A., Muto, H., Fukutomi, H., Ito, S., Silen, W. (1996). Role of transforming growth factor-beta in the restitution of injured guinea pig gastric mucosa in vitro. Am J Physiol **271**(1 Pt 1): G75-85.

Yang, Z., Strickland, D. K., Bornstein, P. (2001). Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. J Biol Chem **276**(11): 8403-8.

Ye, S. (2000). Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. Matrix Biol **19**(7): 623-9.

Yoshimoto, M., Itoh, F., Yamamoto, H., Hinoda, Y., Imai, K., Yachi, A. (1993). Expression of MMP-7 (PUMP-1)mRNA in human colorectal cancers. International Journal of Cancer **54**(4): 614-18.

Yu, Q., Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. Genes Dev **14**(2): 163-76.

Yu, W., Woessner, J. (2000). Heparan sulfate proteoglycans as extracellular docking molecules for matrilysin (matrix metalloproteinase 7). Journal of Biological Chemistry **275**: 4183-91.

Zahraoui, A., Louvard, D., Galli, T. (2000). Tight Junction, a Platform for Trafficking and Signaling Protein Complexes. J. Cell Biol. **151**(5): 31F-36.

Zeng, Z. S., Cohen, A. M., Zhang, Z. F., Stetler-Stevenson, W., Guillem, J. G. (1995). Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases. Clin Cancer Res **1**(8): 899-906.

Zhao, W., O'Malley, Y., Robbins, M. E. (1999). Irradiation of rat mesangial cells alters the expression of gene products associated with the development of renal fibrosis. Radiat Res **152**(2): 160-9.

Zhao, W., O'Malley, Y., Wei, S., Robbins, M. E. (2000). Irradiation of rat tubule epithelial cells alters the expression of gene products associated with the synthesis and degradation of extracellular matrix. Int J Radiat Biol **76**(3): 391-402.

Zhao, W., Spitz, D. R., Oberley, L. W., Robbins, M. E. (2001). Redox modulation of the pro-fibrogenic mediator plasminogen activator inhibitor-1 following ionizing radiation. Cancer Res **61**(14): 5537-43.

Zheng, H., Wang, J., Hauer-Jensen, M. (2000). Role of mast cells in early and delayed radiation injury in rat intestine. Radiat Res **153**(5 Pt 1): 533-9.

Publications personnelles

- **Strup-Perrot C**, Vozenin-Brotans MC, Vandamme M, Linard C, Mathe D.
Expression of MMPs and TIMPs increases in the X-irradiated rat ileum despite the disappearance of CD8a T cells.
World Journal of Gastroenterology sous presse
- Alexakis C, **Strup C**, Mestries P, Mathe D, Caruelle JP, Barritault D, Kern P.
Regulation of the collagen phenotype expression of gamma-irradiated vascular smooth muscle cells by heparan mimetics (RGTA).
J Biomed Mater Res. 2004 Sep 15;70A(4):594-602.
- **Strup-Perrot C**, Mathe D, Linard C, Violot D, Milliat F, Francois A, Bourhis J, Vozenin-Brotans MC.
Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs and TIMPs in late radiation enteritis.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2004 Jun 3 [Epub ahead of print]
- Vozenin-Brotans MC, Milliat F, Linard C, **Strup C**, Francois A, Sabourin JC, Lasser P, Lusinchi A, Deutsch E, Girinsky T, Aigueperse J, Bourhis J, Mathe D.
Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization.
Radiat Res. 2004 Mar;161(3):299-311.
- Linard C, Marquette C, **Strup C**, Aigueperse J, Mathe D.
Involvement of primary afferent nerves after abdominal irradiation: consequences on ileal contractile activity and inflammatory mediator release in the rat.
Dig Dis Sci. 2003 Apr;48(4):688-97.
- Vozenin-Brotans MC, Milliat F, Linard C, **Strup C**, François A, Mathé D.
Les effets tardifs des irradiations thérapeutiques sur les tissus sains : mécanismes des fibroses radio-induites et stratégies thérapeutiques. *Journal Algérien de Chirurgie* 2003, sous presse.
- Lavagna C, **Strup C**, Rampal A, Hofman P, Bardon S, Rampal P, Poiree JC.
Immunolocalization of a new intestinal antiproliferative factor in human intestinal epithelial cells.

Dig Dis Sci. 2002 Nov;47(11):2446-53.

- Alexakis C, Guettoufi A, Mestries P, **Strup C**, Mathe D, Barbaud C, Barritault D, Caruelle JP, Kern P.

Heparan mimetic regulates collagen expression and TGF-beta1 distribution in gamma-irradiated human intestinal smooth muscle cells.

FASEB J. 2001 Jul;15(9):1546-54.

Publications soumises

- **Strup-Perrot C**, Vozenin-Brotons MC, Vandamme M, Benderitter M, Mathe D.
Expression and activation of MMP subtypes specialized in basement membrane degradation are induced in rat colon after abdominal X-irradiation.
Soumis à *Scandinavian Journal of Gastroenterology*

Abstracts

- Vozenin-Brotons M-C, **Strup C**, Milliat F, Linard C, François A, Bourhis J, Girinsky T, Aigueperse J and Mathé D.
Molecular profile associated with human delayed radiation enteritis : definition of new research and therapeutic targets.
International Conference on Translational Research.
Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003, 55(2) : 481 (Abst).
- Milliat, F **Strup, C** Linard, F Lebrun, V Durand, A Lusinchi, J Bourhis, J Aigueperse, D Mathé and M-C Vozenin-Brotons
New *in vitro* model to study the radiation-induced fibrogenic differentiation in the bowel.
International Conference on Translational Research.
Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003, 55(2) :534 (Abst).