



Effet des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) sur l'hypersensibilité viscérale chronique dans un modèle d'ulcération colique radio-induite chez le rat

Christelle Durand

► To cite this version:

Christelle Durand. Effet des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) sur l'hypersensibilité viscérale chronique dans un modèle d'ulcération colique radio-induite chez le rat. Autres [stat.ML]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. ⟨NNT : 2014PA066135⟩. ⟨tel-01071193⟩

HAL Id: tel-01071193

<https://theses.hal.science/tel-01071193v1>

Submitted on 3 Oct 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Université Pierre et Marie Curie

(Ecole doctorale Physiologie, physiopathologie et thérapeutique)

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN)

Laboratoire de recherche en régénération des tissus sains irradiés (LR2I)

**Effet des Cellules Stromales Mésenchymateuses
(CSM) sur l'hypersensibilité viscérale chronique
dans un modèle d'ulcération colique radio-induite
chez le rat.**

Par Christelle DURAND

Présentée et soutenue publiquement le 19 Juin 2014

Devant un jury composé de :

Mr Denis ARDID, PU, Université d'Auvergne, Rapporteur

Mr Jean Jacques LATAILLADE, PU-PH, Hôpital d'Instruction des Armées Percy, Rapporteur

Mr Norbert-Claude GORIN, PU-PH, Hôpital Saint Antoine et UPMC, Examineur

Mr Christian GUY COICHARD, Dr, Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien, Examineur

Mr Rafi BENOTMANE, Dr, Centre d'Etude de l'Energie Nucléaire, Belgique, Examineur

Mr Marc BENDERITTER, Dr, IRSN, Directeur de thèse

Mme Alexandra SEMONT, Dr, IRSN, Encadrante de thèse

Mme Sophie PEZET, MCF, ESPCI ParisTech, Co-directrice de thèse

Université Pierre et Marie Curie

(Ecole doctorale Physiologie, physiopathologie et thérapeutique)

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN)

Laboratoire de recherche en régénération des tissus sains irradiés (LR2I)

**Effet des Cellules Stromales Mésoenchymateuses
(CSM) sur l'hypersensibilité viscérale chronique
dans un modèle d'ulcération colique radio-induite
chez le rat.**

Par Christelle DURAND

Présentée et soutenue publiquement le 19 Juin 2014

Devant un jury composé de :

Mr Denis ARDID, PU, Université d'Auvergne, Rapporteur

Mr Jean Jacques LATAILLADE, PU-PH, Hôpital d'Instruction des Armées Percy, Rapporteur

Mr Norbert-Claude GORIN, PU-PH, Hôpital Saint Antoine et UPMC, Examineur

Mr Christian GUY COICHARD, Dr, Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien, Examineur

Mr Rafi BENOTMANE, Dr, Centre d'Etude de l'Energie Nucléaire, Belgique, Examineur

Mr Marc BENDERITTER, Dr, IRSN, Directeur de thèse

Mme Alexandra SEMONT, Dr, IRSN, Encadrante de thèse

Mme Sophie PEZET, MCF, ESPCI ParisTech, Co-directrice de thèse

« L'expérience ne se trompe jamais, ce sont nos jugements
qui se trompent »

Léonard de Vinci

Ce travail est dédié à mon père et à mon parrain...

REMERCIEMENTS

Je remercie l'ensemble des membres du jury pour leur participation à l'évaluation de mon travail de thèse, et plus particulièrement :

Le Pr. Norbert-Claude Gorin pour avoir accepté de présider ce jury,

Les Pr. Denis Ardid et Jean Jacques Lataillade pour leur investissement en tant que rapporteur de cette thèse,

Les Dr Rafi Benotmane et Christian Guy Coichard pour avoir examiné mon travail.

Je remercie également Jocelyne Aigueperse et Philippe Voisin de m'avoir accueillie au sein du PRP-HOM et du Service de Radiobiologie et d'Epidémiologie (SRBE) de l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN), au début de ma thèse.

Je souhaite aussi remercier Marc Benderitter, mon directeur de thèse, pour m'avoir intégrée au sein de son laboratoire, le laboratoire de Radio pathologie et Thérapies Expérimentales (LRTE), ainsi que pour m'avoir toujours soutenue, encouragée et conseillée durant ces années de thèse. Je tiens aussi à adresser mes remerciements à Radia Tamarat, chef du laboratoire de Recherche en Régénération des tissus sains Irradiés (LR2I) où j'ai effectué mes derniers mois de thésarde. Merci pour ton soutien jusqu'à la ligne d'arrivée!

Un grand merci à Alexandra Sémont, ma tutrice IRSN, et à Sophie Pezet, ma co-encadrante de thèse du laboratoire de neurobiologie de l'École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la ville de Paris (ESPCI), qui m'ont fait confiance pour mener à bien ce projet de thèse.

Alexandra, merci pour ta disponibilité ainsi que pour ton soutien scientifique et humain au long de ces années. Cela a été une réelle chance, pour moi, d'avoir eu l'opportunité de partager avec toi ta passion pour la science. Tu m'as aidée à grandir et à m'épanouir scientifiquement. Et puis ...ces années n'auraient pas été les mêmes sans les trains ou les avions « presque » loupés, les pique-niques « à pas d'heures » et tous ces fou-rires que nous avons partagés.

Sophie, merci pour tes conseils avisés, ta sérénité à toute épreuve ainsi que pour nos discussions autour d'un petit japonais. Merci pour tes nombreux encouragements, surtout ces derniers mois.

Ensuite, je tiens aussi à remercier les personnes qui ont contribué de très près à la réussite de cette thèse. Tout d'abord, merci Noëlle pour l'intérêt que tu as porté à mon travail de thèse et pour nos échanges. Merci à Rachelle, qui, à travers un stage Master 2, par sa rigueur et sa persévérance a participé aux résultats obtenus pendant cette thèse. Puis un merci tout particulier à Christelle (alias « dede »), pour son aide et son soutien ainsi que pour tous les moments « le plus souvent musicaux » partagés. You are the best !

Je tiens ensuite à remercier l'ensemble des personnes que j'ai côtoyées à l'IRSN durant ces années de thèse au sein de l'ancien LRTE, pour nos échanges scientifiques, leur aide technique et nos discussions : Valérie H (ah ces heures passées dans la pénombre de la salle du confocal !), Bruno (merci pour ta disponibilité), Agnès (les mastocytes...il sont vraiment au centre de tout !), Fabien, Olivier, Claire, Valérie, Christine, Alain, Stéphan, George, Carine....mais aussi au sein du LRTOX. Je tiens aussi à remercier Patrick Laloi pour l'intérêt qu'il a porté à ma thèse depuis le début.

Remerciements

Merci également à toute l'équipe du GSEA : Anna, Mélanie, Amandine... pour avoir fait le maximum pour que les manips barostat se déroulent au mieux, pour leur gentillesse et pour nos discussions.

Je voudrais aussi adresser une pensée amicale à tous les stagiaires, doctorants et post-doctorants qui ont rendu ces années inoubliables.

Tout d'abord, merci à mes premiers compagnons de route, Raphaëlle et JV qui m'ont pris sous leurs ailes dès mon arrivée. Merci pour votre soutien et nos discussions!

Ensuite, j'ai vraiment apprécié partager ces moments de rires, de « craquage » et d'échange avec vous : Lara (vive Toulouse !), Émilie (courage pour la dernière ligne droite !), Elodie (merci pour ta bonne humeur) Benoit (ça a été un réel plaisir de se recroiser pour quelques mois !), Cyprien (BHL.. t'es juste énorme ! merci pour l'alliance de la folie et de la sensibilité), Clémentine (félicitation pour... tout !), Telmouch (merci pour nos discussions, j'ai beaucoup aimé notre petit séjour à Boston !) Brice, Maeva....

Un très grand merci à Yoann, Aurore et Clélia ! Yoann, merci d'avoir accepté que les manips changent jusqu'au dernier moment (suspens !) mais surtout merci pour nos discussions et pour ton écoute. Aurori, merci pour ton soutien indéfectible dans cette dernière année de thèse, nos délires... « Girls just want to have fun ! ». Ma Clé, ton enthousiasme, ta joie de vivre, nos voyages font partie de mes meilleurs souvenirs, juste inoubliable!

Je suis réellement heureuse d'avoir pu partager ces années avec vous !

Au cours de cette thèse, j'ai eu l'opportunité de collaborer avec Hélène Eutamene et Vassilia Théodorou, directrice du laboratoire de Neurogastroentérologie et nutrition de l'INRA de Toulouse. Je leur adresse mes remerciements pour m'avoir accueillie et intégrée au sein de leur laboratoire comme un membre à part entière de l'équipe. Merci à toutes les personnes que j'ai eu l'opportunité de côtoyer pour leur aide technique, leur gentillesse et les moments partagés. Merci Ambre, Marion, Cathy, Valérie T, Guylaine...

Ensuite je tiens à remercier particulièrement Vincent pour son soutien, pour être venu assister à ma soutenance et surtout pour son amitié, ceci depuis déjà de très nombreuses années.

Elsa, juste ... MERCI ! Merci pour ton soutien indéfectible en toutes circonstances, merci pour tes encouragements jusqu'à l'ultime moment ... et puis... merci pour tout le reste!

Merci à toute ma famille pour leur soutien et leur amour, gracias a toda la familia !

Plus particulièrement je tiens à exprimer toute ma gratitude et mon affection à ma maman. Merci pour avoir toujours eu confiance en mes capacités et pour m'avoir encouragée et soutenue depuis le début dans tout ce que j'ai pu entreprendre, et ceci, malgré les obstacles. Merci d'avoir toujours cru en moi ... plus que moi !

*Yoan, un **énorme** merci pour ton soutien pendant mes moments de doute et de stress et pour ta patience, au jour le jour, ...et même à 700 km. Tout ceci n'aurait pas été possible sans toi ...*

Enfin, merci à toutes les personnes qui ne sont pas citées mais que j'ai croisées durant ces années de thèse et qui m'ont apporté leur aide et avec qui j'ai eu plaisir à échanger!

RÉSUMÉ

Les douleurs viscérales chroniques font partie des effets secondaires des patients traités pour des cancers de la zone pelvienne. Elles sont notamment la conséquence des altérations biologiques qui apparaissent successivement à l'exposition de l'intestin aux rayonnements ionisants chez des patients soumis à la radiothérapie. Ces douleurs peuvent affecter grandement la qualité de vie de ces « survivants du cancer ». Dans les cas les plus graves, il n'existe pas de traitement analgésique efficace. Ainsi le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces constitue un enjeu majeur.

Au sein de notre laboratoire, le potentiel réparateur et immuno-modulateur des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) a déjà été démontré dans un modèle d'ulcération colorectale radio-induite chez le rat. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse était d'évaluer d'abord la pertinence de l'utilisation de ce modèle pour l'étude de l'hypersensibilité viscérale persistante radio-induite, puis, le bénéfice thérapeutique de l'utilisation des CSM comme agent antinociceptif.

Nous avons dans un premier temps démontré, dans ce modèle, le maintien au cours du temps d'une hypersensibilité viscérale associée à une sensibilisation centrale persistante après irradiation, validant ainsi le modèle. Nous avons ensuite montré l'implication des mastocytes (MC) et suggéré l'implication du neuromédiateur NO^{*} dans les mécanismes de la sensibilisation périphérique sous-tendant une telle hypersensibilité. Nous avons enfin mis en évidence que le traitement par des CSM permettait la réduction de l'hypersensibilité viscérale radio-induite persistante. La capacité des CSM à moduler l'activation des MC et/ou leurs interactions avec les fibres nerveuses pourrait être impliquée dans leur action antinociceptive. En outre, le traitement par des CSM a permis d'obtenir au sein des plexus myentériques une réduction du pourcentage des neurones nitrergiques, préalablement augmenté par l'irradiation, et de restaurer la contractilité musculaire du côlon. De tels processus pourraient également favoriser le bénéfice thérapeutique des CSM observé dans cette étude.

En conclusion, ce travail a permis d'élargir le spectre d'action thérapeutique des CSM dans notre modèle d'étude et de fournir un nouvel argument en faveur de leur utilisation dans un essai clinique à venir.

Mots clés : Radiothérapie, Cellules Stromales Mésenchymateuses, Hypersensibilité viscérale, Effet antinociceptif, Mastocytes.

ABSTRACT

Patients who undergo pelvic radiotherapy may develop significant incidence of undesirable chronic gastrointestinal complications resulting from radiation-induced damages around the tumour. Chronic visceral pain is one of the radiation-induced side effects that greatly affects the quality of life of “cancer survivors”. The lack of effective analgesic treatment highlights the importance of novel and effective therapeutic strategies. In our laboratory, mesenchymal stromal cell (MSC) based approach showed beneficial immunomodulatory and regenerative effects in a rat model of irreversible radiation-induced colonic ulcers. The goal of my work was to assess the relevance of this model to study radiation-induced visceral persistent hypersensitivity and its modulation by MSC treatment. We first demonstrated that this model is associated with long-lasting visceral hypersensitivity and central neuronal sensitization. In this context we showed then that mast cells (MC) are involved in the mechanism of peripheral sensitization. Moreover, we suggested the implication of the neuromediator NO[•] in the pathophysiology of persistent radiation-induced visceral hypersensitivity. We also suggested that MSC treatment reversed radiation-induced hypersensitivity by a mechanism that in part may involve the modulation of MC activation and/or the decrease in the number of MC and nerve fiber interactions. In addition, MSC treatment reduced the percentage of nitrinergic neurons, increased after irradiation, and restored colonic muscular contractibility. Such processes may promote the therapeutic benefit of MSC observed in our study.

In conclusion, this work provided new insights on the therapeutic benefit of MSC in our study model and a new argument in favour of their use in a future clinical trial to cure abdominopelvic radiotherapy side effects.

Key words : Radiation therapy, Mesenchymal stromal cells, Visceral hypersensitivity, Antinociceptive effect, Mast cells.

PUBLICATIONS ET CONGRÈS

Publications

Article accepté (annexe 3)

Mesenchymal stem cell therapy stimulates endogenous host progenitor cells to improve colonic epithelial regeneration. Sémont A, Demarquay C, Bessout R, Durand C, Benderitter M, Mathieu N. *Plos One*.

Article soumis

Persistent visceral hypersensitivity in rat exposed to radiation is mitigated by mesenchymal stromal cell treatment. Durand C, Pezet S, Eutamene H, Demarquay C, Mathieu N, Moussa L, Daudin R, Holler V, Sabourin JC, Milliat F, François A, Théodorou V, Benderitter M, Sémont A. *Gastroenterology*.

Communications orales et par affiches

Communications orales

Characterisation of a radio-induced colorectal chronic pain model. Durand C, Eutamene H, Mathieu N, Demarquay C, Daudin R, Holler V, Benderitter M, Pezet S, Sémont A. *Les 13èmes journées de l'école doctorale physiologie et physiopathologie, 2012, Paris*.

Mesenchymal stromal cell (MSC) therapy modulates radiation-induced visceral chronic pain in rats. Durand C, Pezet S, Eutamene H, Mathieu N, Demarquay C, Moussa L, Holler V, Benderitter M, Sémont A. *Xème Symposium National du Réseau Inserm de Recherche sur la Douleur, 2014, Montpellier*.

Communications par affiches

Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells on colon damages: Application to radiotherapy side effects. Semont A, Mathieu N, Durand C, Demarquay C, Benderitter M. *NGM – Joint International Neurogastroenterology and Motility Meeting, 2012, Bologne, Italie*.

Characterisation of a radio-induced colorectal chronic pain model. Durand C, Eutamene H, Daudin R, Mathieu N, Demarquay C, Benderitter M, Pezet S, Sémont, A. *NGM – Joint International Neurogastroenterology and Motility Meeting, 2012, Bologne, Italie*.

Mesenchymal Stromal Cell (MSC) Therapy Restores Radiation-Induced Dysfunction In Neurally Control Of Colonic Circular Muscle Contractibility Through Antioxidant Effects. Durand C, Mathieu M, Demarquay C, Bessout R, Benderitter M and Sémont A. *The 11th annual meeting of the International Society for Stem Cell Research, 2013, Boston, USA*.

SOMMAIRE

RÉSUMÉ.....	i
ABSTRACT.....	iii
PUBLICATIONS ET CONGRÈS	v
SOMMAIRE	vii
TABLE DES FIGURES	xiii
TABLE DES TABLEAUX.....	xvii
LEXIQUE.....	xix
AVANT PROPOS	1
CHAPITRE I ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1 La « pelvic radiation disease » : conséquence néfaste de la radiothérapie des cancers pelviens.....	7
1.1 Les rayonnements ionisants en radiothérapie	7
1.1.1 Les différents types de rayonnements ionisants	8
1.1.2 Les mécanismes d'action des radiations ionisantes sur la matière vivante	10
1.1.3 Les unités de mesure de la radioactivité.....	14
1.2 L'optimisation des traitements de radiothérapie.....	14
1.2.1 La notion d'équilibre de la balance bénéfice / risque.....	14
1.2.2 L'optimisation des protocoles de radiothérapies par les facteurs radio-biologiques	16
1.2.3 L'optimisation des protocoles de radiothérapie par les techniques de radiothérapie.....	17
1.3 L'effet des rayonnements ionisants sur les tissus sains de la zone abdomino-pelvienne	18
1.3.1 Nécessité de la définition d'un nouveau formalisme.....	19
1.3.2 L'irradiation du tractus digestif au cœur de la « pelvic radiation disease » ..	20
1.3.3 L'origine, les symptômes et les traitements associés des complications gastro-intestinales radio-induites.....	21

1.3.4	Les Pathologies intestinales.....	24
2	Le côlon comme « organe sensoriel »	26
2.1	Les rôles du côlon	28
2.2	L'anatomie fonctionnelle du côlon	29
2.2.1	La muqueuse.....	30
2.2.2	La sous-muqueuse	32
2.2.3	La musculature	33
2.2.4	La séreuse	33
2.2.5	Le système immunitaire et le microbiote	33
2.3	L'innervation intrinsèque et extrinsèque du côlon.....	34
2.3.1	Le système nerveux intrinsèque	34
2.3.2	Le système nerveux extrinsèque.....	37
2.4	Le rôle de l'innervation nerveuse dans la modulation de l'activité fonctionnelle colique	39
2.4.1	Les arcs réflexes de contrôle nerveux.....	40
2.4.2	L'activité d'absorption et de sécrétion	41
2.4.3	L'activité contractile.....	43
3	La douleur viscérale	46
3.1	La terminologie et les caractéristiques associées à la douleur viscérale.....	47
3.1.1	Quelques définitions et notions générales	47
3.1.2	Lorsque la douleur devient une pathologie.....	48
3.1.3	Les différents types de douleurs	49
3.1.4	L'évaluation de la sensibilité viscérale.....	51
3.2	La neurotransmission du message douloureux	53
3.2.1	Les nocicepteurs	53
3.2.2	Le relais, l'intégration et la modulation du message nociceptif au niveau spinal	59
3.2.3	La transmission de l'information nociceptive au niveau supra-spinal	62
3.2.4	Les contrôles inhibiteurs régulateurs de la nociception.....	66

3.3	Les caractéristiques cliniques et spécificités de la douleur viscérale.....	68
4	La douleur viscérale radio-induite chronique et le manque de stratégies thérapeutiques et expérimentales associées.....	70
4.1	Les origines mécanistiques probables de la douleur chronique induite par les rayonnements ionisants	71
4.1.1	L'hypothèse d'une origine inflammatoire	71
4.1.2	L'hypothèse d'une origine neuronale	71
4.2	Les données épidémiologies	73
4.2.1	La Prévalence et la sévérité	73
4.2.2	L'intérêt des études cliniques et leurs facteurs limitant	75
4.3	Les stratégies thérapeutiques de lutte contre les douleurs viscérales chroniques ..	77
4.3.1	Les traitements pharmaceutiques.....	77
4.3.2	Les traitements non-médicamenteux	80
4.4	Les modèles d'étude des pathologies douloureuses coliques	81
4.5	Les enjeux sociétaux et scientifiques	83
5	Les mécanismes périphériques de l'hypersensibilité viscérale	84
5.1	Les mastocytes et leurs interactions avec les fibres nerveuses	84
5.1.1	Notions générales sur les mastocytes et les fibres nerveuses	85
5.1.2	Implication dans les mécanismes périphériques de l'hypersensibilité viscérale	88
5.1.3	Implication dans les mécanismes de la fibrose intestinale radio-induite.....	95
5.2	L'altération de la motricité intestinale	101
5.2.1	Notions générales sur les contractions migratoires géantes	101
5.2.2	Implication dans les mécanismes périphériques de l'hypersensibilité viscérale	101
5.2.3	Observations dans le contexte de l'irradiation intestinale	102
6	Vers l'utilisation des CSM pour moduler l'hypersensibilité viscérale chronique radio-induite ?	103
6.1	La thérapie cellulaire ou médecine régénérative.....	104

6.1.1	Le principe et les objectifs de la thérapie cellulaire	104
6.1.2	Les différents types de greffes cellulaires	104
6.1.3	Le choix du type de cellules : cellules souches versus cellules différenciées.....	104
6.2	Les cellules souches et leur utilisation en thérapie cellulaire	105
6.2.1	Les notions générales sur les cellules souches et leur rôle physiologique ...	105
6.2.2	Les différentes classes de cellules souches et leurs caractéristiques biologiques spécifiques	106
6.2.3	Les intérêts et les difficultés de l'utilisation des cellules pluripotentes en thérapie cellulaire	108
6.2.4	Le choix des CSM en thérapie cellulaire.....	110
6.3	Les arguments en faveur de l'utilisation des CSM pour moduler l'hypersensibilité viscérale radio-induite	120
6.3.1	Les bénéfices thérapeutiques des CSM sur les altérations biologiques radio-induites abdomino- pelviennes.....	121
6.3.2	L'utilisation des CSM comme agent antinociceptif	125
6.3.3	Le cas de l'accident d'Epinal.....	127
CHAPITRE II	OBJECTIFS ET STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE	129
CHAPITRE III	ARTICLE1 : PERSISTENT VISCERAL HYPERSENSITIVITY IN RAT EXPOSED TO RADIATION IS MITIGATED BY MESENCHYMAL STROMAL CELL TREATMENT LES CELLULES STROMALES MÉSENCHYMATEUSES MODULENT L'HYPERSENSIBILITÉ VISCÉRALE PERSISTANTE DANS UN MODÈLE D'ULCÉRATION COLORECTALE RADIO-INDUITE CHEZ LE RAT (SOUMIS A GASTROENTEROLOGY)	135
CHAPITRE IV	RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	183
1	Introduction	185
2	Matériels, méthodes et procédures expérimentales.....	186
2.1	Le test de contractibilité musculaire <i>ex-vivo</i>	186
2.2	L'immunohistochimie permettant de mettre en évidence les neurones à monoxyde d'azote (NO [•]) ou neurones nitrergiques.	187
2.3	Procédure expérimentale.....	187

2.3.1	Les expériences de contractibilité <i>ex vivo</i>	187
2.3.2	Les expériences de viscérosensibilité motrice <i>in vivo</i>	189
2.3.3	L'expérience d'immuno-histochimie	190
2.4	L'expression des résultats et le test statistique utilisé.....	190
3	Les études expérimentales.....	191
3.1	Les CSM résorbent l'effet de l'irradiation sur la contractibilité musculaire du côlon et sur la sensibilité viscérale.	191
3.2	L'altération radio-induite de la contractibilité musculaire est en outre liée à une augmentation du contrôle inhibiteur du SNE, effet modulé par les CSM.....	193
3.3	Le NO [•] joue également un rôle dans la physiopathologie de l'hypersensibilité viscérale radio-induite	195
3.4	Les CSM réduisent l'augmentation du pourcentage de neurones nitrergiques observée après irradiation au niveau des plexus myentériques.....	196
4	Récapitulatif des résultats obtenus et discussion.....	198
4.1	Recapitulatif des résultats	198
4.2	Discussion des résultats	200
4.2.1	Le rôle du NO [•] et la sensibilité viscérale	200
4.2.2	L'implication des fibres musculaires lisses dans les réponses de contractibilité musculaires coliques observées.....	201
4.2.3	Le double bénéfice thérapeutique des CSM	203
CHAPITRE V	DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	205
1	Le choix des stratégies expérimentales	210
1.1	La pertinence du modèle d'étude de la « pelvic radiation disease ».....	210
1.1.1	Le choix de l'application d'une dose d'irradiation forte et unique au niveau intestinal	210
1.1.2	Le choix d'un modèle d'irradiation localisée au niveau colorectal.....	211
1.2	Le choix des CSM et des conditions expérimentales de leur utilisation.....	212
1.2.1	Le choix de la voie d'injection systémique des CSM	213
1.2.2	Le choix de la quantité de CSM injectées	214
1.2.3	Le choix du moment de l'injection des CSM	215

2	Les caractéristiques de la douleur viscérale radio-induite et de sa physiopathologie	217
2.1	Des hypothèses pour expliquer l’hypo-réponse obtenue lors du test au barostat	217
2.1.1	L’hypothèse d’une désensibilisation des fibres sensorielles afférentes au côlon	218
2.1.2	L’hypothèse d’une désensibilisation des fibres nerveuses au niveau du système nerveux central	222
2.2	Les mécanismes périphériques de l’hypersensibilité viscérale radio-induite	222
2.2.1	Le rôle des MC	222
2.2.2	Comment, dans notre modèle, la sensibilisation périphérique <i>via</i> les mastocytes pourrait-elle s’expliquer ?	225
2.2.3	Récapitulatif sur la manière dont les MC pourraient être impliqués dans l’hypersensibilité viscérale radio-induite	229
3	Pour quelles raisons les CSM seraient-elles plus adaptées à moduler l’hypersensibilité viscérale persistante?	229
3.1	La comparaison des stratégies thérapeutiques testées.....	229
3.2	Les diverses raisons validant l’utilisation des CSM	230
3.2.1	Une action qui peut être décrite comme « directement » antinociceptive....	231
3.2.2	Les bénéfices multiples engendrés par l’action des CSM au niveau du côlon irradié favorisent probablement la modulation de l’hypersensibilité viscérale radio- induite	232
4	Quel avenir pour les biothérapies dans le traitement de la « pelvic radiation disease » ?	235
5	Conclusion.....	236
	RÉFÉRENCES	237
	TABLE DES ANNEXES.....	263

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Mécanismes d'interactions physiques des photons avec un atome	10
Figure 2: Effet déterministe des rayonnements ionisants électromagnétiques sur les tissus : une étape physique, chimique et biologique (moléculaire et cellulaire).	11
Figure 3 : Origines des complications précoces et tardives abdomino-pelviennes, successives à l'exposition aux rayonnements ionisants de la zone pelvienne, et les traitements associés (Andreyev, 2007; Kountouras and Zavos, 2008; Stone et al., 2003) et la SFRO 2013.	23
Figure 4 : Représentation systémique des divers systèmes de régulation et niveaux de contrôle nerveux qui permettent la régulation des fonctions coliques (adapté de (Prins, 2011; Wood, 2007)).	27
Figure 5 : Représentation chez l'homme de l'anatomie colique.	29
Figure 6 : Structure colique (A. Structure pariétale du colon, B. Coupe circulaire de colon (coloration hématoxyline-éosine-safran (HES))).	29
Figure 7 : Schéma des cellules de la crypte colique.	31
Figure 8 : Innervation sensorielle intrinsèque et extrinsèque du côlon (adapté de (Furness et al., 1998))	37
Figure 9 : Mécanisme du reflexe péristaltique entérique (Benarroch, 2007b).	45
Figure 10 : Courbes évaluant la sensation douloureuse viscérale en réponse à différents types de stimuli (Adapté de (Gebhart, 2000)).	52
Figure 11 : Liste des médiateurs et récepteurs impliqués dans la transmission des messages nociceptifs viscéraux depuis la périphérie jusqu'à la corne dorsale de la moelle épinière. AMPA.	56
Figure 12 : Organisation cytoarchitectonique de la substance grise de la moelle épinière.	59
Figure 13 : Trajet des faisceaux ascendants spinothalamiques et des colonnes dorsales.	63
Figure 14 : Trajet des faisceaux spinothalamiques latéral et médian.	64
Figure 15 : Trajet des faisceaux spino-parabrachiaux.	65
Figure 16 : Contrôle segmentaire spinal ou théorie du « gate control » (d'après (P. Wall et R.Melzack, 1965)).	67

Figure 17 : Modèle traduisant l'augmentation de la sensation douloureuse, successivement à un traitement aux opiacés, chez un patient atteint de « proctitis » induite par son exposition pelvienne aux rayonnements ionisants (d'après (Khosla et al., 2013)).	79
Figure 18 : Représentation non exhaustive des médiateurs biologiques et des récepteurs associés impliqués qui permettent la communication entre les MC et les fibres nerveuses (adapté de (Kleij and Bienenstock, 2005)).	87
Figure 19 : Les récepteurs aux protéines séras (PARs) sur les terminaisons des fibres nerveuses sensorielles (Vergnolle et al., 2001).	95
Figure 20 : Les différents types de cellules souches et leur potentialité associée (Les Echos n° 19278 du 03 Novembre 2004 • page 14).	106
Figure 21 : Immunomodulation induite par les CSM <i>in vitro</i> (Larghero et al., 2009).	116
Figure 22 : Effet paracrine des CSM <i>in vitro</i> (Da Silva Meirelles et al., 2009).	119
Figure 23 : Procédure expérimentale et exemple associé du type de réponse obtenue lors de l'expérimentation visant à évaluer la part de l'implication du SNE dans la réponse contractile du muscle circulaire colique lorsqu'une stimulation au CCh ($5.10^{-6}M$) est pratiquée.	189
Figure 24 : Effet de l'irradiation sur le tonus du muscle circulaire colique en réponse à des doses croissantes de CCh, et, bénéfice thérapeutique de l'injection de CSM. Les CSM (5 millions) ont été injectées 3 semaines après l'irradiation (n= 7 à 8 par groupe).	191
Figure 25 : Effet de l'irradiation sur la sensibilité viscérale et bénéfice thérapeutique des CSM. Les CSM (5 millions) ont été injectées 3 semaines après l'irradiation (n=5 à 7 par groupe).	192
Figure 26 : Effet de l'inhibition de la transmission nerveuse, par la TTX, sur la réponse contractile du muscle circulaire colique lorsqu'une stimulation de CCh ($5.10^{-6} M$) est pratiquée, dans les trois groupes d'animaux testés. Les CSM (5 millions) ont été injectées 3 semaines après l'irradiation (n= 6 à 8 animaux par groupe).	193
Figure 27 : Effet de l'inhibition de la NOS, par le L-NAME, sur la réponse contractile du muscle circulaire colique lorsqu'une stimulation de CCh ($5.10^{-6} M$) est appliquée, dans les trois groupes d'animaux testés. Les CSM (5 millions) ont été injectées 3 semaines après l'irradiation (n= 6 à 8 animaux par groupe).	194

Figure 28 : Effet de l'inhibition de la NOS sur l'hypersensibilité viscérale radio-induite. Le L-NAME est injecté chez les animaux irradiés (10^{-3} M) deux heures avant le passage au barostat (n= 5 à 6 par groupe).	195
Figure 29 : Effet de l'irradiation avec ou sans traitement par CSM sur les variations du pourcentage de neurones nitrergiques au sein des plexus myentériques entre les groupes. (A. Photos représentatives des marquages immuno-histochimiques obtenus, B. Quantification du pourcentage de neurones (Huc/D) positifs pour le marquage de la nNOS par rapport au nombre total de neurones Huc/D positifs). Les CSM (5 millions) ont été injectées 3 semaines après l'irradiation (n= 8 à 10 animaux par groupe).....	197
Figure 30 : Schéma récapitulatif des différents résultats présentés dans cette partie et de leurs intrications supposées.....	199
Figure 31 : Vue de dessous d'un rat (275 grammes) et délimitation de la fenêtre d'irradiation colorectale. L'application de la dose de 27 Gy se fait via une source de cobalt 60 sous anesthésie gazeuse (rayonnement γ , 1 Gy/ min).	210
Figure 32 : Hypothèse pour expliquer les profils de courbes de RVM obtenus chez les animaux irradiés qui sont soumis à l'application de DCR au barostat : la modification de la soupe inflammatoire pourrait favoriser la désensibilisation des fibres nerveuses en périphérie..	219

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Dose de tolérance pour les OAR de la zone abdomino-pelvienne (source : Guide des Procédures de Radiothérapie Externe SFRO 2007).	15
Tableau 2 : Grade d'évaluation clinique des complications gastro-intestinales radio-induites (Source : Association Française d'urologie 2006).	21
Tableau 3 : Différents types de fibres nerveuses sensorielles, leurs caractéristiques anatomiques, morphologiques, électriques et fonctionnelles.....	54
Tableau 4 : Fréquence des douleurs chez les patients ayant subi une radiothérapie pelvienne à partir de 3 mois après la fin de leur traitement pour différents types de cancers, et, impact de ces douleurs sur la qualité de vie des patients (d'après (Andreyev, 2007)).	75
Tableau 5 : Echelle d'emploi des analgésiques selon l'intensité de la douleur évaluée chez les patients (palier de l'OMS).	78

LEXIQUE

Ach : Acétylcholine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADSC : Cellule stromale dérivées du tissu adipeux

AINS: Anti-inflammatoires non stéroïdiens

AMPA : Acide- γ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

ASIC : Acid Sensing Ion Channels

ATP: Adénosine-5'-triphosphate

ATPase: enzymes qui hydrolysent l'ATP

BDNF : Brain-derived Neurotrophic Factor

Bq : Becquerels

CANs : Neurones Afférents Colospinaux

CD : Crohn Disease ou Maladie de Crohn

CCh : Carbacol

CCK : Cholécystokinine

CFU-F : Fibroblasts Colony-Forming Unit

CGRP : Calcitonin Gene-Related Peptide

CGRP1 : Récepteur au CGRP de type 1

CIC: Cellules Interstitielles de Cajal

Cl⁻ : ion chlorure

CMH I ou II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I ou II

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

CSM : Cellule Stromale Mésoenchymateuse

CTMC : Connective Tissue Mast Cell ou mastocyte conjonctif

DC : Cellule Dendritique

DCR : distension colrectale

DSS : Dextran Sulfate Sodium

EMG : électromyographie

ENK : Enképhaline

ES cells : Embryonic Stem cells ou Cellules Souches Embryonnaires

FcεR1α : Fc fragment of alpha subunit high-affinity (I) IgE receptor

GABA : Acide γ -Aminobutyrique

GABAA : Récepteur de l'acide γ-aminobutyrique de type A

GDNF : Glial-derived neurotrophic factor

GRD : Ganglion Rachidien Dorsal

GVHD : Graft-versus-host disease ou réaction de l'hôte contre le greffon

Gy : Grays

HES : Hematoxylin-eosin-safran

HLA-DR : Human leukocyte antigen-DR

IASP : International Association for the Study of Pain ou Association Internationale pour l'étude de la Douleur

IB4 : isolectine B4

IBD : Inflammatory Bowel Disease ou Maladie Inflammatoire du tube digestif (MICI)

IBS : Irritable Bowel Syndrome ou Syndrome de l'Intestin Irritable (SII)

IBS-D : Syndrome de l'Intestin Irritable avec diarrhée

IFANs : Neurones Sensoriels Afférentes Intestinofugaux

IMRT : Radiothérapie avec Modulation d'Intensité

i.p. : intra-péritonéale

IPANs : Neurones Sensorielles Primaires Afférents

iPS Cells: induced Pluripotent Stem Cells ou cellules souches pluripotentes induites

ISC : Cellule Souche Intestinale

ISCT : International Society for Cellular Therapy (Société Internationale pour la Thérapie Cellulaire)

i.v. : intra-veineux

Lgr5 : Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5

L-NAME : L-NG-Nitroarginine Methyl Ester

LP : Lamina Propria

MAPKinases : Mitogen-activated protein kinases

MC : Mastocyte

MMC : Mucosal Mast Cell ou Mastocyte Muqueux

MPO : Myéloperoxidase

Na⁺-K⁺ATPase : pompe sodium-potassium

NGF : Nerve Growth Factor

NK : Neurokinine

NKA : Neurokinine A

NKB : Neurokinine B

NK (1,2,3) : Récepteurs aux tachykinines (de type 1, 2,3)

NMDA : N-méthyl D-aspartate

NO^{*} : Monoxyde d'azote

NOS : NO synthase

NPY : Neuropeptide Y

NRM : Noyau du Raphé Magnus

OAR : Organe à Risque

OL: Onde Lente

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORL : Oto-Rhino-Laryngologie

PAR (1,2,4) : Proteinase-activated Receptor (de type1,2,4)

PGE2 : Prostaglandine

PS : Système Nerveux Parasymphique

P2X : Canaux Purinergiques

S : Système Nerveux Sympathique

SDF-1 : Stromal derived Factor 1

SFRO : Société Française de Radiothérapie Oncologique

SNC : Système Nerveux Central

SNE: Système Nerveux Entérique

SNP : Système Nerveux Périphérique

RVM : Réponse Viscéro-sensibilité Motrice

SOX9: SRY-box containing gene 9

SP: Substance P

SPGA : Substance Grise Périaqueducale

Sv : Sieverts

TFI : Troubles Fonctionnels Intestinaux

TNBS : Acide 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonique

TrkA : Tropomyosin receptor kinase A

TRP : Transient Receptor Potential

TRPC : Transient Receptor Potentiel Canonical

TRPV1 : Transient Receptor Potential Valinoïd 1

UC: Ulcerative colitis ou Rectocolite Hémorragique

VEGF : Vascular endothelial growth factor (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)

VIP : Polypeptide Vasoactif Intestinal

VPL : Noyaux Ventraux Posterolatéraux

WDR : Wide Dynamic Range neurones

Y : Neuropeptide Y

5-HT: 5-hydroxytryptamine

AVANT PROPOS

En France, la moitié des 350 000 patients diagnostiqués pour un cancer en 2012 ont été soumis à un traitement par radiothérapie. Cette stratégie thérapeutique, dite loco régionalisée, s'appuie essentiellement sur la capacité des rayonnements ionisants à provoquer des lésions à l'ADN.

La recherche d'un compromis optimal entre le contrôle tumoral et les dommages aux tissus sains, situés autour de la tumeur et dans le champ d'irradiation, représente un enjeu majeur dans l'établissement d'un protocole de radiothérapie. Les nombreux progrès technologiques, réalisés ces dernières années, représentent un réel atout pour les radiothérapeutes afin de relever un tel défi. Cependant, l'exposition des tissus sains aux rayonnements ionisants, au cours des radiothérapies, ne peut être totalement évitée. Les complications aiguës et tardives qui en découlent sont particulièrement invalidantes pour ces patients dont la qualité de vie est considérablement dégradée.

Le nombre croissant des « survivants au cancer » et l'allongement de leur durée de vie, après leur traitement par radiothérapie, crée une nouvelle population de patients souffrant de ces complications tardives, et, traduit ainsi un enjeu nouveau et important en terme de santé publique. Une telle réalité sociétale impose alors la mise en place de stratégies thérapeutiques inédites adaptées aux spécificités de la physiopathologie de ces complications. L'effet des rayonnements ionisants sur les tissus sains a d'ailleurs été intégré en tant que thématique dans le plan cancer 2013. Dans ce contexte, le laboratoire de recherche en régénération des tissus sains irradiés (LR2I), dans lequel j'ai effectué ma thèse, propose de développer des approches thérapeutiques innovantes, notamment en termes de thérapies cellulaires, et ce, pour traiter les lésions induites par les rayonnements ionisants aux tissus sains.

Plus précisément, mon travail doctoral s'inscrit dans l'axe de recherche du laboratoire qui vise à élaborer de nouvelles stratégies de traitement pour lutter contre les complications gastro-intestinales tardives successives au traitement de cancers pelviens. La prise en charge de ces patients est fondamentale à double titre. D'une part, parce qu'il existe une forte prévalence des cancers pelviens dans la population. D'autre part, en raison de la présence dans le champ d'irradiation d'organes abdomino-pelviens sains extrêmement radiosensibles, comme l'intestin dont l'altération radio-induite est particulièrement sévère et engendre des complications extrêmement invalidantes pour les patients. Pour une meilleure prise en charge de tels individus, une nouvelle pathologie a ainsi d'ailleurs été définie : la « **Pelvic radiation disease** » (Andreyev et al., 2010, 2011).

Parmi ces « survivants au cancer » de la zone pelvienne jusqu'à 50% sont susceptibles de développer des douleurs viscérales chroniques. Les co-morbidités psychiatriques qui en résultent sont considérables, et ceci, de manière encore plus significative dans le cas des patients ayant subi des accidents de surdosage d'irradiation au cours de leur traitement, comme à Epinal (Ash, 2007). De telles douleurs exigent ainsi le développement de stratégies thérapeutiques adaptées à leurs physiopathologies. A notre connaissance, pourtant, aucune étude expérimentale n'a, à ce jour, été menée sur cette problématique.

Toutefois, 3 patients sur-irradiés d'Epinal ont décrit une diminution de leur sensation douloureuse, successivement à l'injection, à titre compassionnel, de cellules stromales mésenchymateuses (CSM) (Voswinkel et al., 2013). Même si cette étude s'avère prometteuse, des travaux complémentaires sont nécessaires, à l'échelle laboratoire, afin d'identifier et de caractériser les mécanismes biologiques mis en jeu. Cette étape est notamment indispensable en vue d'une optimisation de leur utilisation, dans l'hypothèse où leur effet analgésique serait confirmé.

Mon projet doctoral visait ainsi à valider un modèle pertinent de douleur viscérale chronique radio-induite chez le rat ; puis à évaluer dans ce modèle le potentiel thérapeutique des CSM en tant qu'« agents antalgiques » ; et, enfin, le cas échéant, à étudier les mécanismes d'action impliqués, respectivement, dans sa physiopathologie et ceux sous-tendant un tel bénéfice.

L'analyse bibliographique réalisée en introduction, à l'interface de plusieurs disciplines, permet: (i) de replacer mon étude expérimentale ainsi que ses enjeux dans le contexte sociétal, (ii) de légitimer les choix stratégiques expérimentaux définis au cours de ma thèse, et, (iii) de favoriser la compréhension et l'interprétation des résultats obtenus au cours de cette recherche doctorale.

Dans un premier temps, les effets des rayonnements ionisants utilisés en radiothérapie sur les tissus sains et la « pelvic radiation disease » sont décrits. Ensuite, le côlon, organe au centre de mon étude, ainsi que ses fonctions sont présentés. Puis, la partie 3 précise la physiologie de la douleur viscérale et ses caractéristiques. Dès lors, la douleur viscérale radio-induite et les failles des stratégies thérapeutiques en clinique sont décrites. Enfin, dans les parties 5 et 6 de cette introduction, nos choix expérimentaux sont explicités, tant pour l'étude des mécanismes périphériques sous-tendant la douleur viscérale radio-induite que pour son traitement par les CSM.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1 LA « PELVIC RADIATION DISEASE » : CONSÉQUENCE NÉFASTE DE LA RADIOTHÉRAPIE DES CANCERS PELVIENS

En France, en 2012 environ 350 000 nouveaux cas de cancers ont été diagnostiqués. Dans ce cadre, 175 000 patients ont bénéficié d'un traitement par radiothérapie (source : Institut National du Cancer 2013 et SFRO 2013). Pour la prise en charge des pathologies cancéreuses de la zone pelvienne, la radiothérapie à visée curative reste incontournable. La radiothérapie utilise la capacité des rayonnements ionisants à engendrer des lésions à l'ADN intracellulaire et, *in fine* la mort des cellules irradiées dans les cas où le processus de réparation ne peut avoir lieu.

L'objectif de ce traitement loco-régionalisé est de parvenir à la stérilisation totale des cellules tumorales tout en préservant le mieux possible les tissus ou organes sains l'environnant. Les cellules tumorales sont classiquement plus radiosensibles et ont des capacités de réparation des radiolésions moindres que les cellules normales. Cet effet « différentiel » est le principe de base sur lequel reposent les traitements par radiothérapie.

L'exposition aux rayonnements ionisants des organes ou tissus sains situés autour de la tumeur peut être malgré tout largement dommageable, et, engendre des complications ou effets secondaires (à court et à long terme) chez les patients traités par radiothérapie. Ces complications, lorsqu'elles apparaissent suite à une radiothérapie pelvienne, sont définies par le clinicien Andreyev comme une nouvelle pathologie : « la pelvic radiation disease ».

L'objectif de cette première partie est d'abord de décrire les mécanismes physiques et biologiques par lesquels les rayonnements ionisants utilisés en radiothérapie produisent des atteintes cellulaires et tissulaires. Puis, une brève description des protocoles et progrès technologiques réalisés en radiothérapie, permettant de limiter les dommages radio-induits aux tissus sains, est donnée. Enfin l'impact sociétal certain de la « pelvic radiation disease » ainsi que ses caractéristiques biologiques et physiologiques sont précisés.

1.1 Les rayonnements ionisants en radiothérapie

La radiothérapie utilise principalement les propriétés physiques des rayons de haute énergie, comme ceux des rayons X et γ , afin de stériliser les zones tumorales chez des patients atteints de cancer. Les caractéristiques physiques de ces rayons ont un impact délétère considérable sur les cellules cancéreuses mais aussi sur la matière vivante « saine ». Leurs

interactions physiques avec la matière vivante impactent en effet l'ensemble des composants cellulaires. Les dommages causés à l'ADN cellulaire représente la cause originelle principale de la destruction tumorale et joue un rôle majeur dans la mise en place des dommages radio-induits des tissus sains.

1.1.1 Les différents types de rayonnements ionisants

1.1.1.1 Définitions et caractéristiques

Un rayonnement ou radiation correspond à un processus d'émission ou de transmission d'énergie. Il s'agit d'un rayonnement ionisant lorsque celui-ci est susceptible de provoquer l'arrachement et/ou l'excitation des électrons des atomes de la matière qu'il traverse, provoquant son ionisation. Plus exactement, deux types de rayonnements sont à distinguer : les rayonnements α et β qui sont directement ionisants et les rayonnements X et γ qui sont indirectement ionisants.

Les rayonnements α et β sont constitués de particules chargées respectivement des noyaux d'hélium et des électrons/positrons. Ces radiations ont une capacité faible de pénétration dans la matière car elles interagissent fortement avec celle-ci permettant l'ionisation et/ou l'excitation directe des atomes la composant. Les rayons α correspondent à de grosses particules d'hélium qui sont arrêtées par une simple feuille de papier de quelques millimètres. Ils cèdent ainsi de grosses quantités d'énergie sur de petits volumes, ce qui peut les rendre très dommageables pour la matière. Concernant les rayons β , leur capacité de pénétration est un peu plus grande que celle des rayons α , ils vont être absorbés par une feuille d'aluminium de quelques millimètres. La distance qu'ils peuvent parcourir dépend du milieu qu'ils traversent et de leur énergie cinétique initiale.

Les rayonnements électromagnétiques X et γ se caractérisent par l'émission de photons. Ces rayons sont non chargés et ont une capacité de pénétration importante dans la matière, plusieurs centimètres de plomb sont nécessaires pour les retenir. De plus, les rayonnements X et γ ionisent de manière indirecte les atomes de la matière cible. L'importance relative des différents processus d'interaction des photons avec la matière dépend de deux paramètres : l'énergie des photons incidents et le numéro atomique du milieu d'absorption.

1.1.1.2 L'intérêt de l'utilisation et l'obtention des rayons X et γ en radiothérapie

L'objectif en radiothérapie est de pouvoir appliquer des quantités d'énergie importantes en profondeur dans les tissus. Les rayons X et γ , de par leurs propriétés physiques, sont des candidats privilégiés. En effet, comme exposé précédemment, les photons émis ont une très bonne capacité de pénétration dans la matière. De plus, leur utilisation en radiothérapie à des longueurs d'ondes faibles, i.e. avec une énergie importante, leur permet de causer des dommages importants aux tissus en profondeur. Ces dommages sont la conséquence finale d'un ensemble de phénomènes (cf. 1.1.2) dont l'événement initial consiste encore une fois en l'ionisation des molécules composant les tissus cibles.

L'effet des rayonnements sur l'atteinte cellulaire et tissulaire dépend de la distribution d'énergie incidente des radiations impactant effectivement les tissus visés. A énergie égale, les photons X et γ émis ont un impact identique sur les tissus biologiques (Geraci et al., 1974; Trott and Herrmann, 1991).

Seul le mode de production de ces rayons diffère. Les rayons ou photons X utilisés lors des traitements par radiothérapie sont obtenus à partir d'accélérateurs linéaires de particules ou tubes à rayons X. Plus exactement, lorsque des électrons accélérés sont projetés sur des surfaces composées d'éléments de numéro atomique élevé (plaque métallique d'or ou de tungstène), il se produit des transitions électroniques favorisant entre autre l'apparition de photons X. Les rayons ou photons γ proviennent, quant à eux, de sources radioactives (Cobalt⁶⁰ pour les appareils de télécobalt) et sont le produit de désintégrations radioactives des noyaux des atomes de la source.

Remarque : Les électrons, particules chargées négativement participent aussi à ces événements physiques initiaux d'ionisation et/ou d'excitation de la matière et sont aussi largement utilisés en radiothérapie. En effet, ils sont produits de manière indirecte lors des interactions photon-matière que nous allons évoquer par la suite. Mais ils peuvent aussi être utilisé directement et sont dans ce cas créés par des appareils de traitement comme les accélérateurs linéaires, utilisés sans filtre d'or ou de tungstène.

Dans le cadre de ce travail de thèse les effets observés seront ceux créés par des photons γ obtenus à partir d'une source de Cobalt⁶⁰.

1.1.1.3 L'interaction des photons X et γ avec la matière

Les photons utilisés en radiothérapie sont utilisés dans une gamme d'énergie qui favorise :

- l'effet Compton : l'énergie du photon incident permet d'arracher un électron périphérique de l'orbite atomique à proximité de laquelle il passe, puis le photon peut diffuser avec son énergie restante (figure 1A), et
- l'effet photoélectrique : l'intégralité de l'énergie du photon incident est transférée à un électron qui est arraché de la couche interne d'un atome entraînant un réarrangement électronique avec émission d'un photon de « fluorescence » ou d'un électron d'Auger.

Ce sont ces électrons ainsi éjectés qui sont responsables de l'ionisation de la matière, d'où l'appellation de rayonnement indirectement ionisant (figure 1B).

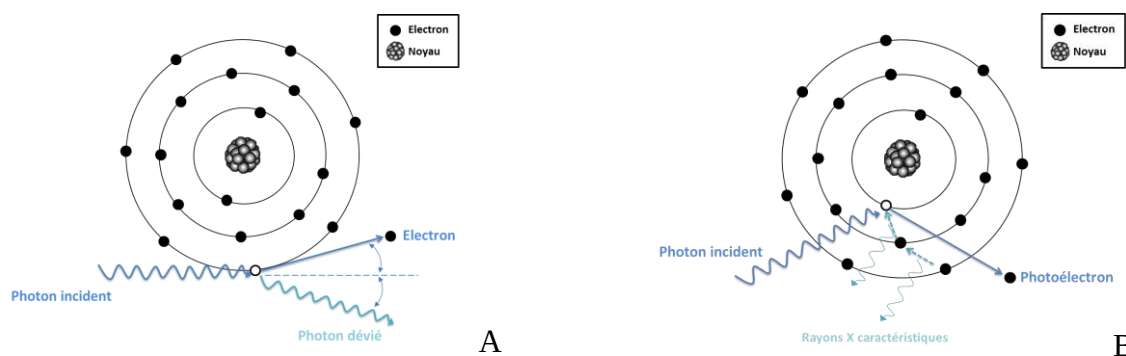


Figure 1 : Mécanismes d'interactions physiques des photons avec un atome (A. Effet Compton, B. Effet photoélectrique).

1.1.2 Les mécanismes d'action des radiations ionisantes sur la matière vivante

Le transfert d'énergie des rayonnements ionisants à la matière qui permet son excitation est extrêmement rapide (entre 0,1 et 1 femtoseconde). A la suite de cette interaction physique avec la matière, un ensemble de phénomènes physico-chimiques va intervenir et favoriser la mort des cellules tumorales. Néanmoins, les tissus sains environnant la tumeur et dans le champ d'irradiation sont aussi soumis à de tels phénomènes, entraînant ainsi des modifications phénotypiques et fonctionnelles de ces tissus (Denham et al., 2001).

Cette partie vise à décrire l'ensemble de ces processus, depuis l'atteinte moléculaire jusqu'à l'atteinte cellulaire, puis, tissulaire (figure 2).

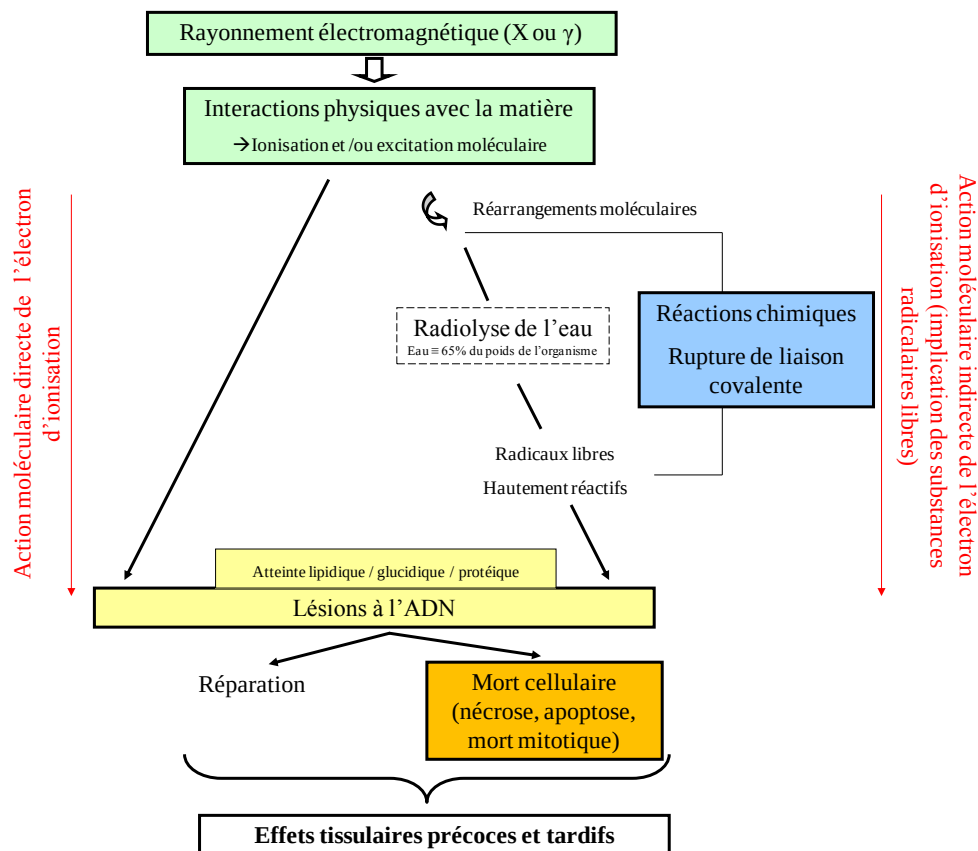


Figure 2: Effet déterministe des rayonnements ionisants électromagnétiques sur les tissus : une étape physique, chimique et biologique (moléculaire et cellulaire).

1.1.2.1 Des interactions physiques aux dommages à l'ADN

Les lésions à l'ADN sont les effets biologiques moléculaires les plus importants des radiations ionisantes. Ces radiolésions sont l'objectif recherché lors des traitements par radiothérapie pour détruire la tumeur.

Deux types de phénomènes peuvent être à l'origine de ces altérations moléculaires :

- Les phénomènes d'altérations moléculaires directes lorsque les électrons d'ionisation interagissent directement avec les différents composants cellulaires, à savoir les lipides, les protéines, les glucides et surtout l'ADN intracellulaire. En ce qui concerne l'ADN, les dommages induits se traduisent par des lésions de bases ou de sucres, des pontages, ou encore des lésions simples ou doubles brin (entre 10⁻⁵ et 1 seconde après l'irradiation).

- Les phénomènes d'altérations moléculaires indirectes lorsque les électrons d'ionisation n'interagissent pas directement avec les composants cellulaires mais avec les molécules d'eau. Dans ce cas, suite à l'ionisation de la matière et /ou l'excitation électronique, des réarrangements moléculaires sont opérés. Des radicaux libres hautement réactifs sont alors générés et des réactions chimiques peuvent avoir lieu. L'eau représentant environ 70% de la masse d'un individu, la radiolyse de l'eau est alors le phénomène prépondérant. L'action délétère de ces radicaux libres ainsi créés est considérable sur l'ADN cellulaire (Gillespie, 1981). Ce type de phénomène est notamment responsable de 80% des radiolésions provoquées à l'ADN.

1.1.2.2 L'atteinte cellulaire

L'ADN endommagé représente la principale cause de lésions cellulaires au sein du tissu irradié (Warters and Hofer, 1977). Ceci peut d'ailleurs entraîner la mort des cellules touchées.

Il existe différents types de morts radio-induites qui interviennent dans les heures suivant l'irradiation :

- (i) la nécrose cellulaire qui est la mort immédiate des cellules recevant une dose trop importante d'irradiation,
 - (ii) l'apoptose ou la mort programmée des cellules, et enfin,
 - (iii) la mort mitotique ou clonogénique qui correspond à une mort différée des cellules.
- Plus précisément, ce sont des cellules qui ont accumulé des modifications ou aberrations qui n'entraînent pas directement leur mort mais qui rendent impossible leur division cellulaire, que ce soit dès la première division ou au bout de quelques divisions.

La réponse cellulaire aux radiations ionisantes se traduit par l'activation de systèmes de réparation enzymatique de l'ADN et de systèmes de vérification au niveau des « checkpoints » du cycle cellulaire. Selon l'efficacité de ces activations, cela conduit soit à la mort des cellules soit à leur survie ((ii) et (iii)). La survie de ces cellules dépend alors de leur capacité à réparer l'ADN lésé. L'effet potentiellement létal des rayonnements ionisants sur les cellules, pour une dose identique, dépend donc de leurs propriétés biologiques intrinsèques.

1.1.2.3 L'atteinte tissulaire

Elle est la conséquence des lésions cellulaires et advient dans les jours et les années suivant l'exposition aux rayonnements ionisants.

Ces lésions tissulaires radio-induites sont le résultat d'interactions complexes impliquant trois types d'effets :

(i) L'effet dit « cytocide » des rayonnements ionisants rend compte de la mort des cellules et de l'organisation du tissu considéré. Cet effet est ainsi lié aux caractéristiques intrinsèques des cellules du tissu, à savoir leur sensibilité à l'irradiation, leur capacité de réparation et de prolifération. Si le tissu est composé de cellules à renouvellement rapide, il est alors radiosensible, (épithéliums intestinaux et cutanés ou système hématopoïétique par exemple). Les effets tissulaires apparaissent rapidement et on parle alors d'effets tissulaires précoces. Pour les tissus composés de cellules à renouvellement lent (tissus conjonctifs, osseux, musculaires ou nerveux), la mort cellulaire radio-induite peut avoir lieu des mois voire des années après l'irradiation au moment où la cellule tente de se réengager dans le cycle cellulaire. Ce phénomène participe ainsi aux effets tissulaires tardifs.

(ii) L'effet tissulaire indirect des rayonnements ionisants correspond à l'impact sur les tissus de médiateurs vasoactifs, pro-coagulants et inflammatoires (cytokines, facteurs de croissance et chemokines) qui sont la conséquence de la mort nécrotique des cellules irradiées.

(iii) L'effet fonctionnel des rayonnements ionisants résulte de l'irradiation non létale de certaines cellules du tissu. Cette irradiation non létale se traduit par des changements d'expression génique et des modifications protéiques dans des molécules intra/extracellulaires exprimées (activation protéasique activation de facteurs latents de croissance...). Ces modifications engendrent une diminution de la capacité répliquative du tissu et induisent une accélération de la sénescence tissulaire.

C'est la combinaison complexe de ces trois effets qui permet d'expliquer et de comprendre les lésions tissulaires radio-induites. Par exemple, la fibrose radio-induite trouve des implications associées à (i) l'effet cytocide du fait de la mort des cellules endothéliales, des cellules épithéliales et du parenchyme, à (ii) l'effet indirect à cause de la dévascularisation tissulaire induite suite à l'irradiation ainsi qu'à (iii) l'effet fonctionnel par la libération de

facteurs impliqués dans la coagulation, l'inflammation et le développement de matrice extracellulaire (Denham et al., 2001).

1.1.3 Les unités de mesure de la radioactivité

L'activité d'une source radioactive est le nombre de désintégration des noyaux de ses atomes par seconde. Elle est mesurée en becquerels (Bq). Afin d'évoquer la quantité de rayonnement absorbée par la matière vivante, le terme de dose est employé. Elle est exprimée en Grays (Gy). Un Gray correspond à l'absorption d'un joule d'énergie pour un kilogramme de matière. La dose efficace de radioactivité reçue prend en considération la dose et les effets biologiques au tissu. Elle est exprimée en sieverts (Sv).

Dans la suite de cette partie 1, les informations données seront abordées en considérant la radiothérapie des cancers de la zone pelvienne ainsi que les effets biologiques et complications gastro-intestinales qui leur sont associés.

1.2 L'optimisation des traitements de radiothérapie

La radiothérapie à visée curative est un traitement locorégional des cancers qui vise à (i) bloquer la prolifération des cellules tumorales et à provoquer leur mort tout en (ii) préservant au mieux les tissus sains qui se trouvent autour de la tumeur et dans le champ d'irradiation. Elle peut ou non être associée à d'autres stratégies thérapeutiques que sont la chimiothérapie ou la chirurgie.

L'objectif de cette sous-partie est de mettre en avant l'ensemble des avancées scientifiques et technologiques qui permettent l'optimisation des protocoles de radiothérapie en favorisant l'objectif (i) et surtout (ii). Pour cela, dans un premier temps, quelques notions générales sur le principe de la radiothérapie et quelques données sur les facteurs clés qui lui sont associés sont proposées.

1.2.1 La notion d'équilibre de la balance bénéfice / risque

Les tissus sains ont une meilleure capacité de réparation que les tissus tumoraux. La balance bénéfice/risque du traitement en radiothérapie est un équilibre délicat à trouver dans l'application de la dose. Le but est :

- de délivrer au volume tumoral une dose dite de contrôle tumoral, i.e. qui permet d'obtenir dans 90% des cas la stérilisation locale totale de la tumeur ;
- de limiter la dose aux tissus sains ou organes à risque (OAR), à proximité de la tumeur et dans le champ d'irradiation. Une dose de tolérance maximale est donnée pour chaque OAR en fonction de la dose maximale tolérée pour un volume irradié donné. Cette dose de tolérance est souvent le facteur limitant de la dose applicable à la tumeur. Le tableau 1 indique les doses de tolérance acceptées pour certains OAR de la zone abdomino-pelvienne pouvant être exposés aux rayonnements ionisants au cours des radiothérapies pelviennes (SFRO 2007).

Tableau 1 : Dose de tolérance pour les OAR de la zone abdomino-pelvienne (source : Guide des Procédures de Radiothérapie Externe SFRO 2007).

Organe sain (organe à risque)	Dose de tolérance
Intestin grêle	Dose maximale de 50 Gy Dose maximale de 40 Gy sur un grand volume
Estomac / Duodénum	Dose maximale de 45 Gy Dose maximale de 54 Gy dans un petit volume
Vessie	Dose maximale de 60 Gy sur un volume $\leq$ à 50% du volume total Dose maximale de 70 Gy sur un volume $\leq$ à 20% du volume total
Cols, têtes fémorales	Dose maximale de 50 Gy sur un volume $\leq$ à 10% du volume total
Rectum (paroi rectale)	Dose maximale de 60 Gy sur un volume $\leq$ à 50% du volume total Dose maximale de 70 Gy sur un volume $\leq$ à 25% du volume total Dose maximale de 74 Gy sur un volume $\leq$ à 5% du volume total

Pour atteindre ce double objectif, les cliniciens adaptent leur traitement en développant essentiellement des protocoles d'irradiation spécifiques et appropriés. Surtout, ils peuvent aussi s'appuyer sur les progrès technologiques réalisés ces vingt dernières années.

1.2.2 L'optimisation des protocoles de radiothérapies par les facteurs radio-biologiques

Un certain nombre de facteurs radio-biologiques est à considérer pour optimiser les protocoles car ils influent sur les effets des radiations ionisantes et donc sur l'efficacité des traitements.

La sensibilité de la tumeur à l'irradiation dépend de son type histologique, de son stade, de ses propriétés morphologiques (volume tumoral) et anatomiques (extension), ainsi que de sa profondeur au sein du tissu. Ces facteurs sont donc à considérer au moment de déterminer la dose efficace (totale) à appliquer. Par exemple, plus le volume tumoral est important et/ou plus la tumeur est située en profondeur (tumeur infiltrante), plus la dose efficace à appliquer devra être importante.

L'optimisation de l'efficacité biologique du traitement passe donc par un choix de paramètres opératoires clés : (i) la dose par séance, (ii) le nombre total de séances (fractionnement) et, (iii) la durée du traitement (l'étalement). En effet, en plus de la dose totale et de la dose par séance, les paramètres fréquentiels et temporels ont également une incidence sur l'effet la destruction tumorale mais aussi sur l'effet biologique engendré par les radiations aux tissus sains.

L'objectif est de permettre la destruction tumorale et de laisser le temps au tissu sain de se réparer, avant l'application d'une nouvelle dose. Classiquement, en radiothérapie externe, une dose par séance de 1,8 à 2 Gy est appliquée, les séances sont quotidiennes avec une fréquence de 5 jours sur 7 pendant une durée totale de traitement qui ne dépasse pas quelques semaines (en moyenne de l'ordre de 7 semaines).

Dans certains cas, comme les cancers de la prostate ou les cancers de la sphère ORL, il est intéressant d'adapter la dose par fraction et le temps entre deux séances. Ainsi des protocoles (i) d'hypo fractionnement (diminution du nombre de fractions avec une augmentation de la dose par fraction) ou (ii) d'hyper fractionnement (augmentation du nombre de fractions par jour en diminuant la dose mais sans réduction de l'étalement du traitement) peuvent être mis en place.

Dans le passé, l'hypo fractionnement a montré ses limites avec une augmentation des complications tardives chez les patients. Cependant, des études récentes tendent à démontrer

pour certains cancers, notamment celui de la prostate, le bénéfice thérapeutique de ce type de stratégie. Pour des cancers de la prostate avancés ou graves, il a pu être observé une meilleure efficacité anti-tumorale du traitement en hypo-fractionnement par rapport au traitement avec un protocole classique, sans pour autant remarquer une aggravation des complications à court et moyen terme. (Arcangeli et al., 2010, 2011; Supiot et al., 2013). De plus l'application de ce type de protocole permettrait d'engendrer moins de fatigue chez les patients en limitant le nombre de déplacements et serait financièrement intéressante (Cosset et al., 2013). Excepté dans le cas de radiothérapies palliatives à visée antalgique, l'utilisation de l'hypo fractionnement reste cependant toujours controversée. En effet, le manque de recul sur les effets de l'hypo fractionnement à long terme (dans les cas spécifiquement cités) suscite un débat au sein de la communauté des radiothérapeutes quant à son usage en clinique.

L'hyper fractionnement est utilisé dans le cas des cancers de la sphère ORL car il permet un meilleur contrôle de ce type de tumeurs (Stuschke and Thames, 1997).

1.2.3 L'optimisation des protocoles de radiothérapie par les techniques de radiothérapie.

L'amélioration des connaissances en radiobiologie a permis de mettre en place des stratégies thérapeutiques adaptées. Cependant, ce sont principalement les progrès techniques qui ont permis d'améliorer la stérilisation tumorale tout en minimisant la dose délivrée aux tissus sains l'environnants.

Il existe trois grands types de radiothérapies : la radiothérapie externe, la curiethérapie et la radiothérapie interne (une description est fournie en annexe 1). L'option thérapeutique sélectionnée par le corps médical est étroitement liée aux caractéristiques de la tumeur ainsi qu'aux OAR sains avoisinant cette dernière.

La radiothérapie externe est la technique de radiothérapie la plus utilisée. Cette technique utilise une source de rayonnement située à l'extérieur du patient. Dans 93% des cas, la radiothérapie externe est conformationnelle (situation des cancers en 2011-Institut National du Cancer). Plusieurs faisceaux d'intensités moindres convergent au niveau de la zone tumorale. Cette approche permet de réduire l'intensité des rayonnements au niveau des tissus sains.

Les progrès technologiques réalisés en imagerie médicale et en informatique ces dernières années ont aussi permis des améliorations notables pour (i) une meilleure définition de la cible tumorale (imagerie utilisée dans la préparation des traitements), (ii) une optimisation de la distribution de la dose délivrée au volume à irradier (Radiothérapie avec modulation d'intensité ou IMRT,...), (iii) une prise en compte des variations anatomiques en cours d'irradiation (radiothérapie guidée par l'image, adaptation du volume pendant l'irradiation, mouvement du patient pendant l'irradiation,...) (cf. annexe 2 pour une description plus détaillée de ces techniques).

La spécificité balistique ainsi obtenue permet la diminution de la dose reçue par les tissus sains, limitant *in fine* les effets secondaires.

L'amélioration de la prise en charge thérapeutique des patients traités pour un cancer permet d'augmenter le nombre de « survivant du cancer » ainsi que la durée de leur survie après traitement. Bien que la toxicité aux tissus sains ait été grandement réduite lors des traitements par radiothérapie, l'exposition des zones saines aux rayonnements ionisants reste inévitable. Ces dommages radio-induits aux tissus sains engendrent des effets secondaires néfastes, notamment tardifs, qui impactent grandement la qualité de vie de ces « survivants du cancer ». Ceci est particulièrement notable chez les patients ayant été traités par radiothérapie pour un cancer de la zone pelvienne. L'incidence des personnes souffrant de ce type de complications étant grandissante, la compréhension de leur physiopathologie en vue de leur traitement représente donc un enjeu majeur dans les années à venir.

1.3 L'effet des rayonnements ionisants sur les tissus sains de la zone abdomino-pelvienne

Dans cette partie 1.3, l'enjeu sociétal que représentent les complications tardives abdomino-pelviennes successives au traitement par radiothérapie des cancers pelviens est précisé. La prise en considération de ces éléments a d'ailleurs amené à la définition d'une nouvelle pathologie multi-organes, « la pelvic radiation disease ». Les dommages radio-induits au tractus digestif représentent l'étiologie principale de cette pathologie, ils sont donc ensuite plus précisément caractérisés.

1.3.1 Nécessité de la définition d'un nouveau formalisme

Les cancers pelviens sont des cancers qui impliquent à la fois des structures et organes de la zone du bassin : vessie, anus, rectum, chondrosarcome, ostéosarcome ainsi que les organes reproducteurs que sont la prostate, les testicules, les ovaires, l'utérus, l'endomètre, le vagin et la vulve. Les OAR radiosensibles de la zone abdomino-pelvienne qui peuvent être exposés aux rayonnements ionisants au cours des radiothérapies pelviennes sont nombreux : le foie, les ovaires, l'intestin grêle, le côlon, le rectum... (tableau 1).

Les cancers pelviens sont ceux qui affectent le plus de personnes dans la population. Le cancer de la prostate est notamment celui qui a la plus forte prévalence chez l'homme (avec 56 800 nouveaux cas diagnostiqués en 2012) devant le cancer colorectal (23 200 pour homme, 18 900 pour Femme) (Source : Institut National du Cancer 2012). Son traitement par radiothérapie externe ou interne impacte les OAR à proximité comme la vessie et le rectum.

L'exposition des tissus sains aux rayonnements ionisants lors du traitement par radiothérapie des tumeurs pelviennes, entraîne l'apparition :

- d'effets secondaires (ou complications) immédiats, précoces ou aigus au cours du traitement et juste après la fin du traitement pour 80% des patients (Ballas et al., 2006). Différents tissus, comme les os ou la peau pelvienne ainsi que diverses fonctions organiques, telles que la miction ou le fonctionnement d'organes sexuels, peuvent ainsi être impactés.
- d'effets (ou complications) tardifs qui peuvent survenir plusieurs mois voire années après la fin du traitement. Ce dernier type de complications réduit considérablement la qualité de vie des patients. De plus, la meilleure survie des patients après leur traitement a entraîné une augmentation du nombre de personnes affectées par ces complications à moyen et long terme (environ 5% à 5 ans et 20 % à 20 ans) (Andreyev et al., 2011).

Bien que tous les mécanismes physiopathologiques associés à ces effets secondaires ne soient pas encore élucidés, leur spécificité est avérée. Le nombre croissant de personnes affectées fait de cette problématique un enjeu de santé publique.

Ainsi pour une prise en charge adaptée à la spécificité des syndromes de ces « survivants au cancer », Andreyev, médecin spécialisé en gastroentérologie a récemment défini une nouvelle maladie la « Pelvic radiation disease » (Andreyev et al., 2011). Selon cet auteur, il s'agit de « problèmes transitoires ou persistants, d'intensités modérées à très sévères, survenant dans des tissus non cancéreux et résultant du traitement par radiothérapie d'une tumeur localisée au niveau du pelvis ».

A noter qu'au-delà du type d'organe considéré, le risque, la sévérité et la nature des effets secondaires dépendent de différents facteurs précédemment cités (cf. 1.2.2), mais aussi d'autres paramètres tels que la susceptibilité individuelle du patient, son état général, la technique (radiothérapie externe, curiethérapie) ainsi que les traitements associés (Stone et al., 2003).

1.3.2 L'irradiation du tractus digestif au cœur de la « pelvic radiation disease »

Les symptômes gastro-intestinaux sont ceux qui ont l'impact le plus important sur la qualité de vie des patients (Andreyev, 2007; Andreyev et al., 2011). En effet, la perte de l'intégrité de la muqueuse intestinale, successive à l'exposition aux rayonnements ionisants de la zone pelvienne provoque dans 90% des cas, chez les patients traités, des changements chroniques de leurs fonctions intestinales. Un patient sur deux affirme avoir vu sa qualité de vie affectée par ces symptômes gastro-intestinaux. Vingt à 40% des patients décrivent un effet de moyen à modéré de leur qualité de vie (Andreyev, 2007).

L'importance de l'incidence de ces complications chez les patients peut s'expliquer par les caractéristiques anato-morphologiques du tractus digestif. D'une part, le renouvellement rapide de la muqueuse affecte considérablement la sensibilité des différents segments intestinaux aux rayonnements ionisants. D'autre part, l'organisation structurelle en série du tube digestif, en opposition à l'organisation parallèle d'un organe (par exemple les reins), implique que la détérioration d'une sous-unité a une incidence sur toute la fonction de cet organe.

Au-delà des caractéristiques biologiques précédemment citées, le tube digestif, et plus particulièrement le côlon distal et le rectum, sont des structures majeures dans l'étude des complications successives aux traitements par radiothérapie de la zone pelvienne ; en effet ce

sont des OAR de cancer de haute incidence dans la population et leur position fixe dans le pelvis implique la réception d'une dose à chaque séance. Le côlon et plus spécifiquement le côlon distal est notamment pour ces différentes raisons l'organe d'étude de ma recherche doctorale.

1.3.3 L'origine, les symptômes et les traitements associés des complications gastro-intestinales radio-induites

La sévérité des complications gastro-intestinales chez les « survivants au cancer » est donnée par leur grade clinique. Son évaluation est basée sur des critères anatomo-physiopathologiques, comme précisé dans le tableau 2.

Tableau 2 : Grade d'évaluation clinique des complications gastro-intestinales radio-induites (Source : Association Française d'urologie 2006).

Grade 1	Aucun changement.
Grade 2	Diarrhées légères ; quelques douleurs coliques ; moins de 5 selles par jour ; selles glaireuses.
Grade 3	Diarrhées modérées ; plus de 5 selles par jour ; rectite glaireuse ou hémorragique.
Grade 4	Obstruction ou rectorragie nécessitant une chirurgie.
Grade 5	Nécrose, perforation, fistule, décès.

De manière plus précise la figure 3 donne une vue d'ensemble non exhaustive des causes, des symptômes et des traitements associés à l'entérite ou la rectite radique (respectivement lésions / altérations de la paroi intestinale et rectale successives à l'exposition au rayonnement ionisants,) précoce et tardive.

Tout d'abord, une description histologique, plus détaillée que dans la figure 3, de l'entérite et de la rectite radique est proposée. Pour les temps précoces, une dénudation épithéliale avec la formation de micro-abcès au niveau des cryptes ainsi qu'une ulcération de la muqueuse sont observées. Associées à ces modifications structurelles biologiques, une perte des cellules souches épithéliales ainsi qu'une infiltration de cellules immunitaires dans la lamina propria sont caractérisées. Pour les temps tardifs, des occlusions vasculaires, traduisant l'ischémie et

la nécrose tissulaire, ainsi que la mise en place d'une fibrose au niveau du compartiment sous-muqueux, et, une dilatation des vaisseaux lymphatiques sont observées (Theis et al., 2010).

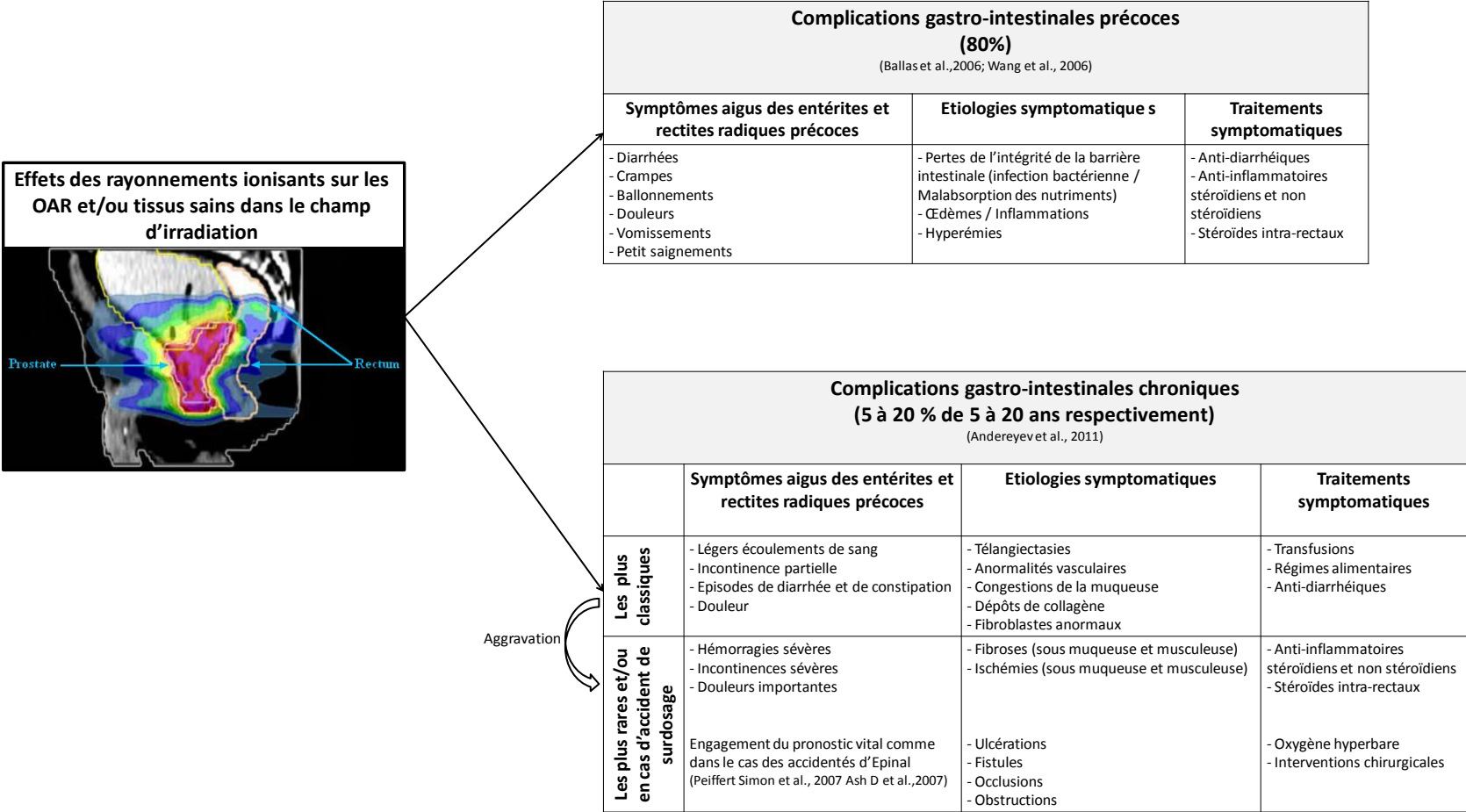
Les symptômes cliniques des patients souffrant d'entérite ou de rectite radique sont maintenant explicités. Pour les temps précoces, l'apparition notamment de diarrhées, de douleurs, de ballonnements, de vomissements et de petits saignements sont signalés par les patients. Puis, plusieurs mois voire plusieurs années après la fin du traitement, les principaux symptômes tardifs décrits sont, de légers écoulements de sang, une incontinence partielle, des épisodes de diarrhées et de constipation mais aussi des **douleurs viscérales chroniques**. La fréquence et la sévérité de ces complications sont d'ailleurs considérablement aggravées dans le cas d'accidents, lorsque les patients, comme ceux d'Epinal, reçoivent un surdosage d'irradiation au cours de leur traitement. Dans les cas les plus graves, le pronostic vital de ces patients peut d'ailleurs être engagé (Peiffert et al., 2007).

Les symptômes chroniques décrits ci-dessus découlent directement des dommages structurels tissulaires tardifs radio-induits (dépôt de collagène, congestion de la muqueuse et anomalies vasculaires notamment) qui altèrent les fonctions intestinales (motilité, perméabilité, absorption) (Harb et al., 2014; Theis et al., 2010). Leurs traitements sont seulement symptomatiques, permettant d'atténuer ou de faire disparaître temporairement certains symptômes, mais ils ne s'attaquent pas directement aux causes qui les provoquent.

L'effet des rayonnements ionisants sur les tissus sains n'est cependant pas le seul facteur qui contribue à l'apparition de telles complications. Des traitements complémentaires (chimiothérapie et/ou interventions chirurgicales), la variabilité individuelle du patient associée à sa radiosensibilité, et le fait qu'il souffre d'autres pathologies peuvent influencer significativement sur la nature et la sévérité de ces effets tardifs.

Chapitre I : Etude bibliographique

Figure 3 : Origines des complications précoces et tardives abdomino-pelviennes, successives à l'exposition aux rayonnements ionisants de la zone pelvienne, et les traitements associés (Andreyev, 2007; Kountouras and Zavos, 2008; Stone et al., 2003) et la SFRO 2013.



Dans ce contexte, il est donc nécessaire d'améliorer la compréhension des causes moléculaires et cellulaires des symptômes gastro-intestinaux radio-induits pour pouvoir les traiter efficacement. Mon travail de thèse s'intègre donc dans cette logique en visant, notamment, à étudier la douleur viscérale engendrée par l'irradiation des tissus sains du côlon distal, et, à en étudier les mécanismes physiopathologiques associés.

Parmi les diverses maladies qui affectent le tube digestif, certains symptômes sont comparables à ceux de la « pelvic radiation disease ». L'étude des mécanismes physiologiques, cellulaires et moléculaires qui leur sont associés sont autant de pistes de réflexion pour la compréhension des mécanismes à l'origine des complications gastro-intestinales radio-induites. Je serai donc, au cours de mon manuscrit, amenée à les évoquer. Dans la sous-partie 1.3.4 je me propose ainsi de décrire les principales caractéristiques histologiques et cliniques de telles pathologies.

1.3.4 Les Pathologies intestinales

L'objectif de ce paragraphe est d'introduire de manière non exhaustive les pathologies gastro-intestinales les plus fréquentes et celles qui ont le plus d'intérêt dans le cadre de mon étude ; et ceci en décrivant brièvement dans chaque cas à la fois leurs caractéristiques anatomopathologiques ainsi que leurs symptomatologies.

Parmi ces pathologies, se distinguent :

- Les Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales (MICI) ou Inflammatory Bowel Disease (IBD) qui sont le résultat d'une dérégulation de la réponse immunitaire (muqueuse) intestinale face à la microflore de l'hôte. Ces maladies sont marquées par une inflammation chronique et incontrôlée au niveau du tractus digestif. Le diagnostic est basé sur la présence transmurale ou superficielle de « patches » d'infiltration granulomaires et/ou de cellules inflammatoires. Ces pathologies apparaissent comme étant liées à des facteurs génétiques et environnementaux (Hanauer, 2006 ; Abraham and Cho, 2009).

Les deux IBD les plus connues sont la maladie de Crohn ou « Crohn's Disease » (CD) et la rectocolite hémorragique ou encore « Ulcerative Colitis » (UC). Les différences entre ces deux formes de MICI sont notamment anatomiques (régions du tractus digestif impliquées dans la pathologie) et macroscopiques/histologiques

(localisation de l'inflammation). Dans le cas de la CD, certaines parties de l'intestin, comme l'iléum ou le côlon, sont atteintes par une inflammation transmurale. Chez ces patients, les zones enflammées, ulcérées sont discontinues et parfois la présence de granulomes peut être observée. S'agissant de l'UC, l'inflammation est localisée dans la muqueuse. Les régions du tractus digestif touchées sont alors le rectum et une partie du colon, voire son intégralité (Abraham and Cho, 2009; Hanauer, 2006; Strober et al., 2007).

Les IBD sont marquées par des périodes de rémission et de rechute. Dans le dernier cas cité, les symptômes qui apparaissent sont : des douleurs abdominales, de la diarrhée, des saignements rectaux, une perte de poids, de la fièvre ainsi que de la fatigue. Chez les patients atteints de CD on peut aussi noter la présence d'obstructions et de fistules (Strober et al., 2007).

- Les Troubles Fonctionnels Intestinaux (TFI) sont diagnostiqués sur la base de symptômes décrits dans les critères de Rome et sont attribuables au tractus gastro-intestinal moyen et bas. Le diagnostic est posé lorsque le patient décrit avoir ressenti ces symptômes au moins 12 semaines durant les 12 derniers mois, et, sans qu'aucune explication structurelle ou biochimique n'ait pu être donnée (Thomsen et al., 1998).

Parmi ces TFI, le plus connu, le Syndrome de l'Intestin Irritable (SII) ou Irritable Bowel Syndrome (IBS) est caractérisé par des douleurs abdominales chroniques et des modifications dans le fonctionnement du tractus digestif qui se traduisent par l'apparition d'épisodes de diarrhées, de constipation ou une alternance des deux (Thomsen et al., 1998).

Le contexte général de l'étude étant établi, la partie 2 vise à décrire l'organe central de ce mon travail de recherche : le côlon, premier site de genèse du message douloureux dans notre contexte.

2 LE CÔLON COMME « ORGANE SENSORIEL »

L'intestin est la portion de l'appareil digestif qui relie l'estomac, où les aliments ont été brassés, prédigérés et stérilisés, à l'anus. Il est divisé en deux parties : d'abord, l'intestin grêle puis, en aval, le gros intestin ou côlon. L'intestin grêle est à la fois le lieu de la dernière étape de digestion et d'absorption des nutriments, et une structure capable d'absorber de grandes quantités d'eau. Le côlon correspond au siège d'absorption d'eau et d'électrolytes pour le maintien de l'équilibre hydrominéral de l'organisme et pour la formation des matériaux solides non digestibles, les fèces. Ces deux parties sont structurellement proches. Les rôles fonctionnels distincts qui leur sont attribués sont le produit de différences ultra-structurelles (type cellulaire, présence de microvillosité au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle...).

Dans le cadre de mon travail de thèse, je me suis plus spécifiquement intéressée au côlon qui représente ainsi le sujet central de cette partie 2. Cependant, des études menées au niveau de l'intestin grêle sont aussi abordées dans cette étude bibliographique, lorsqu'elles permettent d'apporter un éclairage scientifique utile à mon étude.

J'ai souhaité aborder cette étude du côlon en m'appuyant sur une approche systémique, et, en mettant en avant les acteurs biologiques majeurs de notre étude (figure 4).

En effet, l'organisation structurale et cellulaire du côlon au travers d'une description anatomique traduit sa fonctionnalité, et ces aspects sont d'ailleurs abordés ici. Toutefois le côlon est une unité intégrée, caractérisée par différents systèmes de contrôle et de régulation (figure 4) : un système endocrinien, un système immunitaire et un système nerveux intrinsèque ou système nerveux entérique (SNE) (système nerveux de contrôle local) ainsi qu'un système nerveux extrinsèque, organisés en réseau (Prins, 2011; Wood, 2007). Une modification de l'environnement luminal ou du milieu interne peut ainsi être « détectée » par le biais de ces systèmes de contrôle en interaction. Le côlon est ainsi défini comme un organe qui « sent » (Furness et al., 2013). Le traitement intégré de cette information se traduit ensuite par des modifications dans l'activité des systèmes effecteurs (cellules épithéliales de la muqueuse, muscle, vaisseaux sanguin) du côlon. Ces différents systèmes régulateurs et effecteurs permettent ainsi de produire une réponse biologique, telle que l'absorption ou la motilité, coordonnée et adaptée aux conditions de l'environnement intestinal. En revanche,

une dérégulation de ces systèmes favorise la mise en place d'un « fonctionnement pathologique » de l'organe.

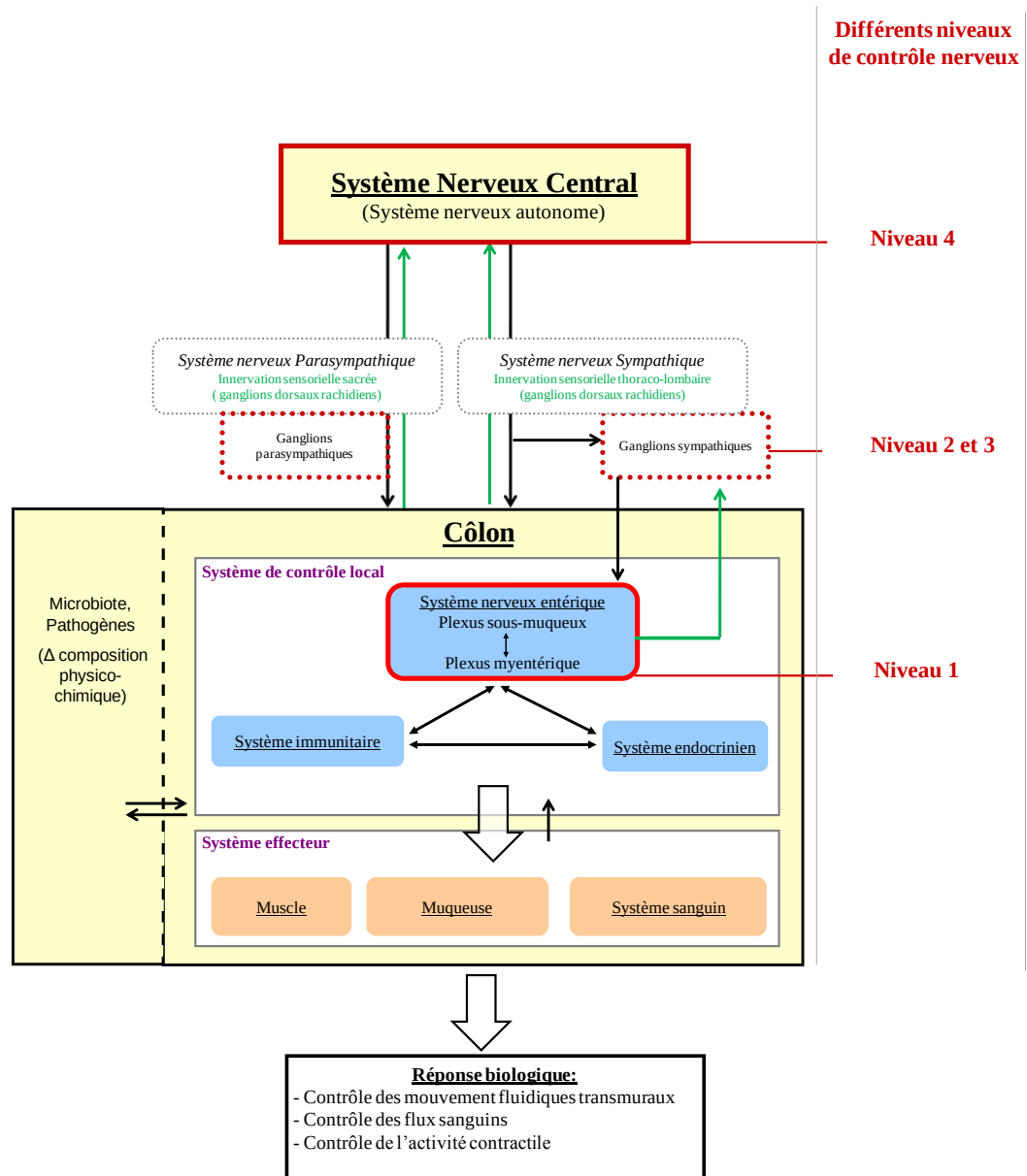


Figure 4 : Représentation systémique des divers systèmes de régulation et niveaux de contrôle nerveux qui permettent la régulation des fonctions coliques (adapté de (Prins, 2011; Wood, 2007)).

Les niveaux de contrôle nerveux du côlon : Niveau 1-contrôle local du SNE indépendant du système nerveux extrinsèque ; Niveau 2-contrôle périphérique réflexe qui peut être influencé par les fibres sympathiques pré-ganglionnaires de la moelle épinière ; Niveau 3-contrôle nerveux du côlon par le système nerveux parasympathique et sympathique, déterminé, en partie, par des réflexes avec les fibres sensorielles qui remontent le long du système nerveux autonome ; Niveau 4- Les centres supérieurs intègrent les informations en provenance des niveaux 2 et 3 et envoient des signaux vers le côlon. L'innervation sensorielle est représentée par des flèches vertes.

Dans ce contexte, l'objectif de cette partie est :

- d'introduire l'organisation structurelle et les grandes fonctions coliques,
- de décrire son innervation intrinsèque et extrinsèque. Les rôles joués par ces systèmes nerveux dans le contrôle et la régulation des fonctions intestinales sont d'ailleurs précisés, de manière non exhaustive. Et enfin,
- d'introduire, parmi les afférences nerveuses sensorielles, celles qui sont directement impliquées dans les processus douloureux.

2.1 Les rôles du côlon

Le côlon se subdivise en cinq parties à partir du caecum : le côlon ascendant (ou droit), le côlon transverse, le côlon descendant (ou gauche ou distal), le côlon sigmoïde, et enfin le rectum qui s'ouvre par un orifice entouré d'un sphincter, l'anus (figure 5). Cette organisation est identique chez l'homme et le rongeur, à la différence près que le caecum murin a proportionnellement une taille beaucoup plus importante chez le rongeur.

Par ailleurs, les grandes fonctions coliques sont :

- la défense de l'organisme contre les éléments nuisibles présents au sein de la lumière intestinale. La muqueuse colique joue en effet un rôle de barrière intestinale,
- le maintien de l'équilibre de la balance hydrominérale de l'organisme ainsi que la régulation de la composition des fèces (i.e. des composés solides, non digérables, dépourvus de nutriment et qui correspondent à un mélange de chyles, de mucus et de bactéries) en eau et en sels minéraux, et
- la propulsion des fèces le long du tube digestif jusqu'à l'anus, ce que l'on nomme la motricité intestinale.

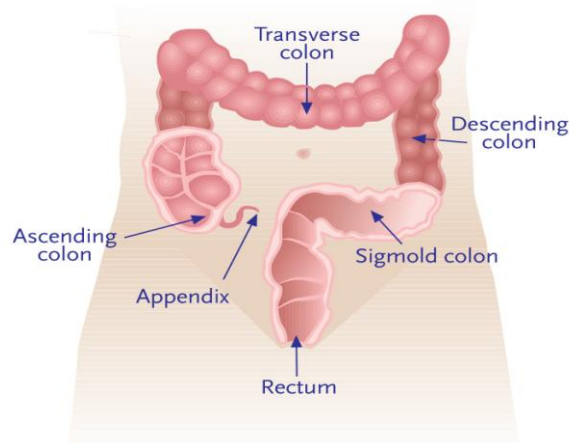


Figure 5 : Représentation chez l'homme de l'anatomie colique.

(<http://www.cancercare.ns.ca/en/home/preventionscreening/coloncancerprevention/faq.aspx>)

2.2 L'anatomie fonctionnelle du côlon

La structure pariétale du côlon consiste en l'association de quatre couches concentriques associées. Cette structure est conservée le long de l'intestin (Smith and Calhoun, 1968) (figure 6 A). De la lumière intestinale (a) vers l'extérieur du côlon, se situent : la muqueuse (b), la sous muqueuse (c), la musculaire (ou muscularis externa) (d) et la séreuse (ou adventitia) (e). Ces compartiments sont interconnectés morphologiquement, nerveusement et fonctionnellement pour une action coordonnée de la structure.

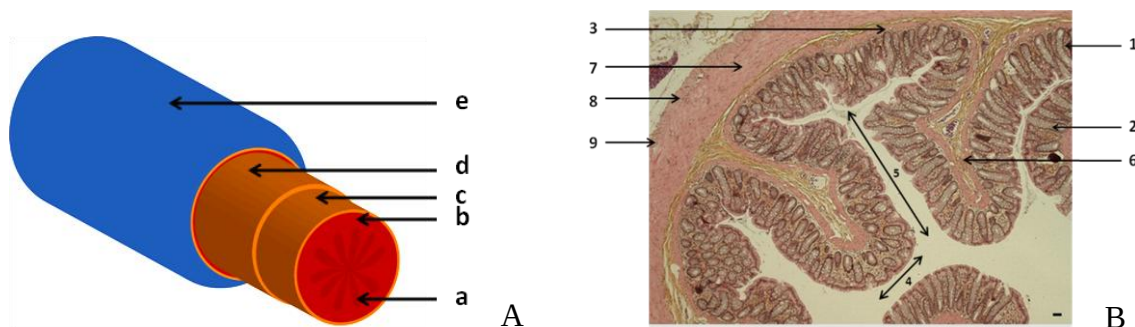


Figure 6 : Structure colique (A. Structure pariétale du colon, B. Coupe circulaire de colon (coloration hématoxyline-éosine-safran (HES))). (a) : lumière intestinale ; (b) : muqueuse ; (c) : sous-muqueuse) ; (d) : musculieuse ; (e) : séreuse ; (1) : épithélium ; (2) : lamina propria ; (3) : *muscularis mucosa* ; (4) : surface épithéliale ; (5) : crypte de Lieberkühn ; (6) : plexus de Meissner ; (7) : couche musculaire circulaire interne ; (8) : couche musculaire externe longitudinale ; (9) : plexus d'Auerach. Echelle : 100 μm.

En s'appuyant sur la figure 6B, l'organisation structurale, cellulaire et ultra-structurale de chacun des compartiments coliques est décrite précisément dans la suite de cette partie :

2.2.1 *La muqueuse*

La muqueuse colique est formée d'un épithélium (1) monostratifié qui repose sur une couche basale composée de collagène (type IV), de protéoglycanes, de laminine et de fibronectine (Simoneau et al., 1998). Les intégrines des cellules épithéliales interagissent directement avec cette couche favorisant l'adhésion et la cohésion épithéliale (Beaulieu, 1999). Cette cohésion épithéliale est renforcée par la présence de jonctions serrées et adhérentes entre les cellules polarisées de la muqueuse colique.

La couche basale sur laquelle reposent les cellules épithéliales est disposée sur un tissu conjonctif de soutien, la lamina propria (ou chorion) (2). Cette lamina propria (LP) est composée de protéoglycanes entre lesquels s'intercalent collagène, réticuline et fibroblastes. Ce tissu est également riche en cellules immunitaires, notamment des lymphocytes T et B, des Natural Killers (NK), des macrophages, des cellules dendritique (DC), des neutrophiles et des mastocytes.

Par ailleurs, la LP repose elle-même sur un autre tissu : la *muscularis mucosa* ou musculaire muqueuse (3) qui est lui-même constitué de deux feuillets de cellules musculaires longitudinales et circulaires.

De plus, l'épithélium colique, structure de la muqueuse en contact direct avec la lumière intestinale est replié sur lui-même. Deux régions structurellement différentes sont ainsi distinguées : la surface épithéliale (4) et les cryptes de Lieberkühn (5), zones d'invagination de l'épithélium. Au niveau de ces prolongements, se retrouvent à la fois la LP et la *muscularis mucosa*.

Les différentes cellules épithéliales spécialisées (figure 7), qui appartiennent au système effecteur, jouent un rôle primordial dans les différentes fonctions coliques. Elles sont responsables : (i) du renouvellement cellulaire de la barrière épithéliale, (ii) de l'absorption d'eau pour la déshydratation du chyle et, (iii) de la sécrétion de mucus. Le mucus favorise la lubrification intestinale (en vue de l'avancée des fèces) et, en association avec l'épithélium, constitue la barrière intestinale de protection de l'organisme contre les éléments toxiques de la lumière.

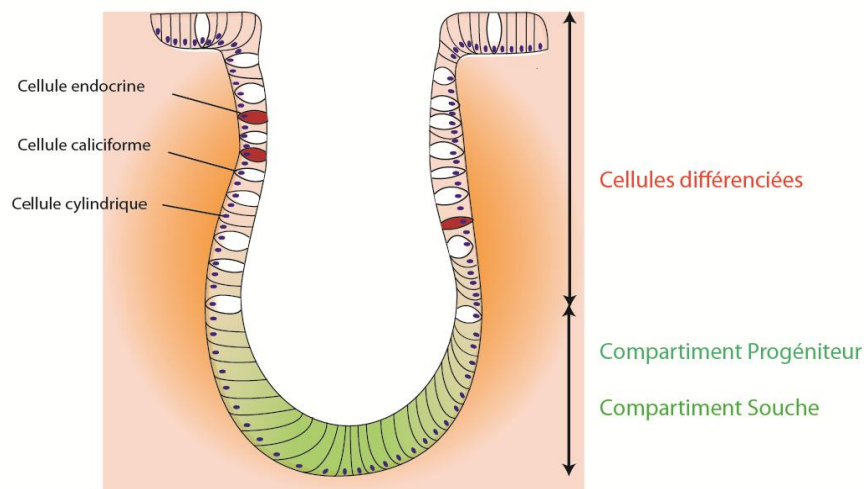


Figure 7 : Schéma des cellules de la crypte colique.

2.2.1.1 Les cellules souches et progénitrices

Ces cellules se situent au niveau du tiers inférieur des cryptes et sont responsables du renouvellement des différentes lignées de cellules épithéliales différenciées qui migrent le long de la crypte jusqu'à la surface épithéliale. La mort naturelle des cellules épithéliales différenciées au niveau de la surface épithéliale est ainsi compensée, assurant le maintien physiologique de l'homéostasie tissulaire de l'épithélium colique.

Le manque de marqueur biologique a rendu la mise en évidence de ces cellules souches difficile pendant longtemps. Cependant, dans les années 1990, des études les décrivent au niveau de l'intestin grêle chez la souris uniquement. Elles seraient entre 4 et 6 cellules, et se situeraient en position +4 (par rapport à la position des cellules de Paneth) au sein des cryptes (Bjerknes and Cheng, 1999; Potten et al., 1997).

La communauté scientifique a dû attendre 2007 pour qu'une population cellulaire, exprimant le marqueur Lgr5 (leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5) et qui correspondrait aux cellules souches intestinales (ISC) soit mise en évidence à la fois au niveau de l'intestin grêle mais aussi du côlon chez la souris (Barker et al., 2007). Barker *et al.*, ont d'ailleurs démontré que ces ISC coliques seraient plus quiescentes que les ISC intestinales, expliquant ainsi le renouvellement épithélial colique plus lent (Barker et al., 2007). Dès lors, la caractérisation phénotypique de ces cellules se fait de plus en plus précise. Récemment une distinction a été introduite entre les différentes cellules Lgr5^+ de la base des

cryptes coliques fondée sur leur aptitude à exprimer plus ou moins le marqueur SOX9 (SRY-box containing gene 9). Les SOX9 « high » seraient les « vraies ISC » capables de former des organoïdes *in vitro* et les SOX9 « low » appartiendraient au compartiment progéniteur (Ramalingam et al., 2012). Ces dernières, appelées aussi des précurseurs sont déjà engagées vers un des lignages des cellules épithéliales différenciées et sont capables de se multiplier.

2.2.1.2 Les cellules cylindriques

Ces cellules de l'épithélium bordant permettent l'absorption des sels et de l'eau *via* un transport dépendant de la concentration en sodium. Ces cellules possèdent, en effet, au niveau basolatéral de leurs membranes de nombreuses pompes sodium-potassium $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$.

2.2.1.3 Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes présentent au niveau de leur cytoplasme apical des granules contenant la mucine, protéine du mucus qu'elles vont pouvoir excréter vers le milieu extérieur. Chez le rat, ces cellules représentent environ 50% des cellules des cryptes (Robert et al., 2001). Ce mucus est un des composants de la barrière intestinale et facilite le transit.

2.2.1.4 Les cellules endocrines

Les cellules endocrines sécrétrices au niveau du côlon sont peu nombreuses. Elles ont été caractérisées au niveau du côlon et du rectum humain. Une classification exhaustive reposant sur le type de molécules sécrétées existe mais n'est pas évoquée ici. De manière non exhaustive, parmi les divers types de médiateurs biologiques qu'elles libèrent se distinguent : la sérotonine (5HT), la substance P (SP), le Glucagon, la somatostatine, la neurotensine. Ces médiateurs biologiques contribuent entre autre à la régulation des processus d'absorption et de sécrétion intestinale (Buffa et al., 1978).

2.2.2 La sous-muqueuse

Enveloppant la *muscularis mucosa* de la muqueuse, se trouve un tissu conjonctif lâche : la sous-muqueuse. Ce tissu est constitué majoritairement de fibres de collagène et de quelques fibres élastiques qui favorisent le glissement des compartiments sous-muqueux / muqueux l'un par rapport à l'autre. Il est riche en vaisseaux sanguins, artériels et lymphatiques (système effecteur). Au sein de ce compartiment, les 2 types de cellules immunitaires les plus

représentés sont les macrophages et les mastocytes. Enfin, au sein de ce compartiment se trouvent le plexus sous muqueux ou plexus Meissner (6) ainsi que des fibres nerveuses.

2.2.3 La musculuse

Puis, vers l'extérieur du côlon, la musculuse est constituée de deux couches effectrices de cellules musculaires lisses : une couche musculaire circulaire interne (7) et une couche musculaire externe longitudinale (8). Entre ces deux couches de muscles est localisé le plexus myentérique ou plexus d'Auberach (9). Les cellules musculaires lisses, contrairement aux cellules striées, sont dotées d'automatismes. Ce compartiment, effecteur, est directement responsable de l'avancée des fèces.

Au sein de ces couches musculaires, des réseaux interconnectés de cellules musculaires spécifiques, les cellules interstitielles de Cajal (CIC), permettent la dépolarisation, calcique dépendante, des fibres musculaires sans aucune stimulation préalable (Thomsen et al., 1998). A elles seules, elles créent des variations spontanées du potentiel de membrane du tube digestif, appelées ondes lentes (OL), mais pas de réelle activité mécanique.

Ces réseaux sont situés à proximité des plexus nerveux et permettent un lien physique et fonctionnel entre les plexus nerveux (et plus précisément les motoneurones) et les cellules musculaires lisses, cellules avec lesquelles elles sont connectées *via* des jonctions serrées (Wood, 2007).

2.2.4 La séreuse

La séreuse consiste en une tunique fine de cellules mésothéliales en lien avec le mésentère qui adhère avec la musculaire, favorisant ainsi les changements de volume de l'intestin. Ce tissu est caractérisé par la présence de veines, artères et vaisseaux lymphatiques (système effecteur) qui peuvent ensuite traverser l'ensemble des différents compartiments coliques.

2.2.5 Le système immunitaire et le microbiote

Le système immunitaire du côlon est formé de follicules lymphoïdes et de cellules immunocompétentes résidentes. En tant que système de contrôle local, son objectif est la protection de l'organisme vis-à-vis des organismes pathogènes. Deux types de réponses immunitaires complémentaires peuvent être mis en place : (i) une réponse « innée » ou « non spécifique » et (ii) une réponse « adaptative ». La mise en place de la réponse non spécifique est rapide et non ciblée contre un antigène spécifique. En revanche la réponse « adaptative »

est plus longue la première fois mais gardée en « mémoire » et elle est dirigée contre un antigène en particulier.

La flore intestinale est particulièrement riche en micro-organismes non pathogènes. Il n'existe pas moins de 10^{11} à 10^{12} microorganismes au niveau du côlon chez l'homme (Sartor, 2008). La présence d'un grand nombre de bactéries commensales et symbiotiques permet, d'une part, d'éviter que les populations pathogènes ne prennent numériquement le dessus au niveau de la flore bactérienne, et, d'autre part, la digestion de certains composés encore non digérés comme la cellulose. Le système immunitaire intestinal est capable de moduler sa réponse face aux organismes commensaux non pathogènes.

2.3 L'innervation intrinsèque et extrinsèque du côlon

L'ensemble des couches coliques est innervé. Se distinguent une innervation intrinsèque ou SNE et une innervation extrinsèque constituées de neurones dont les corps cellulaires se situent, respectivement intégralement dans la paroi digestive ou en dehors.

L'innervation sensorielle, constituée de neurones sensitifs mécano-, thermo- ou chémorécepteurs, est plus précisément caractérisée dans cette partie 2.3.

2.3.1 Le système nerveux intrinsèque

Le SNE assure de façon autonome la régulation de l'ensemble des fonctions intestinales. Il est, à lui seul, capable de coordonner les différents systèmes effectifs de l'intestin : la muqueuse épithéliale, la musculature, les vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que la régulation des processus immuns et inflammatoires, pour un fonctionnement intégré de l'organe (figure 4) (Furness, 2012; Prins, 2011; Wood, 2007).

Cent millions de neurones sont dénombrés au sein du tractus digestif, ce qui correspond à un nombre de neurones équivalent à celui évalué au niveau de la moelle épinière (Prins, 2011). De plus, les neurotransmetteurs du SNE sont identiques à ceux du système nerveux central (SNC). Parmi ceux qui sont les plus classiquement évoqués : l'acétylcholine (ACh), la SP, le monoxyde d'azote (NO), le peptide vasoactif intestinal (VIP) et la 5HT.

L'ensemble de ces raisons est donc à l'origine de l'appellation de « little brain of gut » qui est classiquement donnée au SNE (Prins, 2011).

Structurellement, l'innervation intrinsèque est organisée en deux plexus nerveux. Le plexus sous-muqueux régule les processus de sécrétion et d'absorption colique ainsi que le débit sanguin local alors que le plexus myentérique assure majoritairement la régulation de la contractibilité musculaire. Les neurones de ces ganglions nerveux sont interconnectés *via* des synapses chimiques pour former des réseaux fonctionnels, indépendants, capables d'intégrer et de traiter les informations du milieu. Des connexions fortes existent entre les deux plexus qui forment un large réseau de fibres dans la paroi du côlon (Furness, 2012; Prins, 2011; Wood, 2007).

Cet ensemble de fibres nerveuses projette à la fois vers les cellules épithéliales, les fibres musculaires et les vaisseaux sanguins (système effecteur). De plus, ce réseau nerveux est aussi en interaction avec les cellules immunitaires du tractus digestif. Ces interactions sont indispensables au fonctionnement de l'organe dans des conditions physiologiques normales (Furness, 2012; Prins, 2011; Wood, 2007). A l'inverse, leur dysfonctionnement peut entraîner le développement ou le maintien de pathologies (Wood, 2007).

De manière constitutive, le système nerveux entérique est composé de trois catégories de fibres: les fibres effectrices (sécrétomotrices, motrices, ou vasomotrices), les interneurones et les fibres sensorielles.

2.3.1.1 L'innervation intrinsèque motrice

En premier lieu, les fibres effectrices ou les neurones moteurs entériques reçoivent des informations nerveuses en provenance des interneurones, des fibres sensorielles primaires afférentes (IPANs) mais aussi de l'innervation extrinsèque. Ils adaptent ensuite leurs réponses fonctionnelles sécrétoires, motrices et vasodilatatrices en libérant notamment de l'Ach, de la SP, du NO, de l'ATP et du VIP (Furness, 2003, 2012).

Suivant le type de neurotransmetteurs sécrétés et la fonction considérée associée, ces neurotransmetteurs sont soit excitateurs soit inhibiteurs. Plus précisément, l'activation de l'activité sécrétoire est favorisée par la libération d'Ach, du VIP et d'ATP. L'Ach et la SP sont impliqués dans les phénomènes de contraction musculaire alors que le NO, le VIP et l'ATP permettent le relâchement musculaire (Wood, 2007).

2.3.1.2 L'innervation intrinsèque sensorielle

Ensuite, parmi les fibres sensorielles intrinsèques qui sont des neurones sensitifs mécano-, thermo- ou chémorécepteurs, plusieurs sous-populations sont caractérisées (figure 8). Différents paramètres permettent de distinguer ces neurones sensoriels. Dans cet exposé nous les évoquons en fonction de leurs zones de projection ainsi que de leurs rôles biologiques.

Les fibres sensorielles primaires afférentes (IPANs) sont des neurones sensitifs capables de répondre à des distorsions de la muqueuse, des changements chimiques et des changements de tensions et/ou de compression des muscles dans des conditions physiologiques (Furness, 2003). Elles réalisent des connections synaptiques avec : des interneurones, des motoneurones entériques, des fibres musculaires, et avec elles-mêmes, au sein de la paroi intestinale. Elles constituent donc le premier maillon de ce réseau coordonné de fibres qui permettent au SNE de fonctionner comme un microcircuit capable à lui seul de réactions réflexes, au niveau local (Furness, 2003, 2006; Furness et al., 1998, 2004). A titre d'exemple, certains stimuli mécaniques et chimiques de la lumière sont détectés par les cellules endocriniennes de la muqueuse intestinale qui sécrètent alors au niveau basolatéral des neuromédiateurs, permettant ainsi l'activation des IPANs (Furness et al., 2004).

Par ailleurs, certaines fibres nerveuses sensorielles dont le corps cellulaire est localisé au niveau des plexus nerveux sont capables de projeter vers le système nerveux central. Ces fibres nerveuses sont appelées les neurones sensoriels afférents intestinofugaux (IFANs). Les IFANs projettent au niveau du SNC (cerveau ou moelle épinière), des ganglions sympathiques ou d'autres organes (pancréas, vésicule biliaire) (Furness, 2006). Ils participent directement aux réflexes entéro-entériques et à la communication entre différents organes abdomino-pelviens.

Parmi les neurones sensoriels intrinsèques développant des projections vers la moelle épinière, une population particulière, les neurones Afférents Colospinaux (CANs) a été caractérisée chez le rat au niveau du côlon mais aussi dans le rectum (Doerffler-Melly and Neuhuber, 1988; Suckow and Caudle, 2008). Ils pourraient être directement impliqués dans les processus d'hypersensibilité douloureuse, et, plus précisément, dans les processus de maintien de la douleur (Suckow and Caudle, 2008, 2009; Suckow et al., 2012).

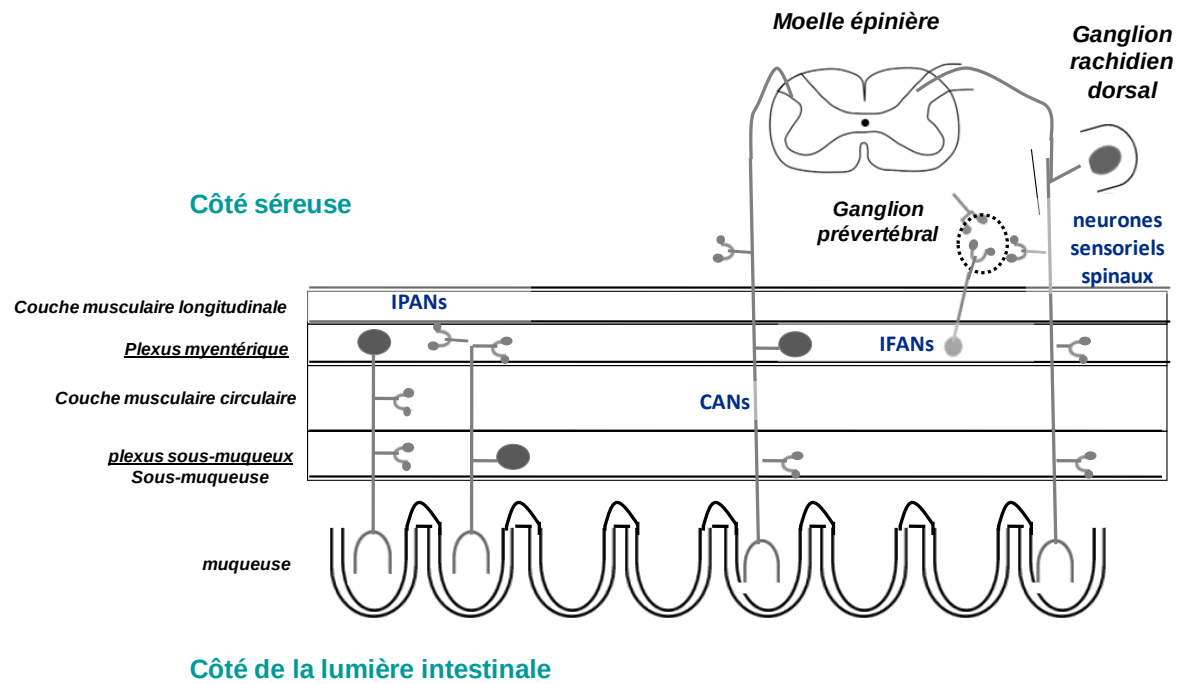


Figure 8 : Innervation sensorielle intrinsèque et extrinsèque du côlon (adapté de (Furness et al., 1998))

IPANs : fibres sensorielles primaires afférentes ; CANs : neurones afférents colospinaux ; IFANs : neurones sensoriels afférents intestinofugaux. Le corps cellulaire des CANs peut se situer au niveau des deux plexus nerveux. Les IFANs peuvent projeter leurs afférences vers le SNC et aussi vers d'autres organes abdomino-pelviens.

Bien qu'elles ne soient pas l'objet de mon propos dans ce manuscrit, les cellules gliales présentes au sein des plexus entériques ont un rôle fondamental. Elles sont en effet notamment impliquées dans les processus de neurotransmission, de protection neuronal et de maintien de la barrière épithéliale (Neunlist et al., 2007).

2.3.2 Le système nerveux extrinsèque

Le système nerveux périphérique (SNP), via le système nerveux autonome parasympathique (PS) et sympathique (S), ajuste l'action du SNE, affinant ainsi les réponses fonctionnelles coliques. Les fibres sensorielles extrinsèques au côlon circulent dans les nerfs splanchniques et transmettent les informations émanant de la sensibilité viscérale.

L'innervation intestinale extrinsèque motrice puis l'innervation sensorielle sont décrites de manière constitutive et fonctionnelle dans cette sous-partie.

2.3.2.1 L'innervation extrinsèque motrice

La dualité de l'innervation extrinsèque motrice est complexe et traduit sa fonctionnalité. En effet, l'innervation PS a plutôt un rôle d'activation des fonctions coliques alors que l'innervation S est plutôt impliquée dans les phénomènes d'inhibition de ces mêmes fonctions (cf. partie 2.4).

D'un point de vue structurel, l'innervation PS correspond à la fois à l'innervation vagale (corps cellulaires des neurones pré-ganglionnaires dans le tronc cérébral) et à l'innervation par les nerfs pelviens de la moelle sacrée (corps cellulaires des neurones pré-ganglionnaires dans la moelle sacrée). Pour ce qui est du côlon distal, cette innervation PS met seulement en jeu les nerfs pelviens de la moelle épinière sacrée (Al-Chaer and Traub, 2002; Sikandar and Dickenson, 2012).

L'innervation S du côlon distal implique quant à elle les afférences splanchniques de la moelle épinière thoraco-lombaire (corps cellulaires des neurones pré-ganglionnaires dans la moelle thoraco-lombaire) (Al-Chaer and Traub, 2002; Sikandar and Dickenson, 2012).

En ce qui concerne les corps cellulaires des neurones post-ganglionnaires, ils se situent, respectivement pour l'innervation PS et S, dans des ganglions intramuraux (en périphérie de l'organe ou dans l'organe innervé) et dans des ganglions paravertébraux (Al-Chaer and Traub, 2002; Sikandar and Dickenson, 2012).

2.3.2.2 L'innervation extrinsèque sensorielle

Les fibres sensorielles extrinsèques viscérales (figure 8) renseignent notamment sur l'état de contraction et de distension des muscles ainsi que sur l'état de dilatation des vaisseaux sanguins. Cette innervation extrinsèque transmet ainsi les informations de la sensibilité viscérale, et, participe ainsi à la mise en place d'arc réflexe visant à la régulation fonctionnelle colique (figure.4). De plus, elle est aussi responsable de la transmission des informations sensorielles douloureuses.

Les fibres nerveuses extrinsèques peuvent se définir en fonction de la localisation de leur corps cellulaire, et, de la zone du SNC vers laquelle elles envoient leurs projections.

Les corps cellulaires des fibres nerveuses extrinsèques afférentes sont localisés dans le ganglion nodose pour les afférences vagales (qui ne concernent pas le côlon distal) et dans les Ganglions Rachidiens Dorsaux (GRD) pour des afférences spinales ou splanchniques (innervation pelvienne du PS et thoraco-lombaire du S) (Furness, 2006).

Les afférences splanchniques sont les premiers acteurs impliqués dans la mise en place d'arcs reflexes autonomes, jouant un rôle dans la modulation des fonctions coliques (Sikandar and Dickenson, 2012). Les afférences sensorielles spinales sont aussi susceptibles de transmettre des informations sensorielles capables d'évoquer une sensation consciente d'inconfort ou de douleur (Sikandar and Dickenson, 2012). Cette transmission nerveuse est le résultat d'une situation pathologique qui, le plus souvent, favorise l'apparition de stimuli nociceptifs (douloureux). Ces stimuli peuvent (i) être mécaniques ou chimiques, et, être provoqués successivement à une lésion tissulaire, une ischémie ou une inflammation du tissu et/ou (ii) être liés à une altération fonctionnelle (Bueno et al., 1997; Jänig and Morrison, 1986; Ness and Gebhart, 1990).

Les différentes propriétés biologiques des fibres sensorielles et leur caractérisation en tant que nocicepteurs sont précisées dans la partie 3.2.1.

2.4 Le rôle de l'innervation nerveuse dans la modulation de l'activité fonctionnelle colique

L'ensemble des fonctions physiologiques du côlon est contrôlé par l'innervation intrinsèque et extrinsèque colique. Les interactions que ce réseau neuronal entretient avec les autres systèmes de contrôle locaux (immunitaire et endocrinien) ainsi qu'avec les différents systèmes effecteurs permet la modulation des fonctions coliques (figure 4).

L'objectif de cette partie est d'abord de présenter brièvement les arcs réflexes neuronaux qui sont impliqués dans ces processus de régulation fonctionnelle intestinale (figure 4). Puis les activités coliques d'absorption, de sécrétion, et de contractibilité intestinales sont présentées. De telles activités fonctionnelles sont notamment responsables du contrôle des grands rôles fonctionnels coliques (barrière intestinale, équilibre hydrominéral de l'organisme, composition des fèces, motilité). Pour chacune de ces activités, leur modulation par l'innervation intrinsèque et extrinsèque, dans des conditions physiologiques ou

pathologiques, avec notamment l'implication des mastocytes (MC) (Wood, 2004), est mise en avant.

L'objectif est d'envisager, dans des conditions pathologiques (comme après irradiation), qu'une dérégulation des systèmes de contrôle, et plus particulièrement de l'activité des fibres nerveuses peut modifier les fonctions coliques. Ces processus étant intriqués, un dysfonctionnement colique peut aussi avoir un effet sur les systèmes de contrôle. Or, l'ensemble de ces phénomènes sont impliqués (sensibilisation des fibres nerveuses, dysfonctionnement de la motilité) ou corrélés (augmentation de la perméabilité membranaire) aux mécanismes périphériques impliqués dans la douleur viscérale.

2.4.1 Les arcs réflexes de contrôle nerveux

Les différents arcs réflexes de contrôle qui influent sur l'activité fonctionnelle du côlon se situent à plusieurs niveaux (figure 4). Se distinguent au niveau intestinal (Prins, 2011) :

- Une voie réflexe « locale » (Niveau 1) qui dépend directement du SNE. Les IPANs sont les premiers acteurs dans la détection et la transduction de l'information sensorielle pour une intégration fonctionnelle via un réflexe interne entièrement contenu dans la paroi intestinale (Furness et al., 2004).
- Une voie réflexe dite entéro-entérique périphérique (Niveau 2) impliquant le système nerveux S. Les IFANs sont un des premiers maillons de la chaîne responsable de ce type de réflexe, qui met ainsi en relation différentes parties du tractus digestif et favorise la coordination fonctionnelle de l'ensemble des régions de ce tractus digestif (Furness, 2003). Ce type de réflexe peut être modulé par les fibres sympathiques pré-ganglionnaires de la moelle épinière (Prins, 2011).
- Une voie réflexe (Niveau 3) qui met en jeu des neurones dont le corps cellulaire se situe dans des ganglions pré-vertébraux et qui projettent dans l'intestin et des fibres sensorielles qui suivent le système nerveux autonome.
- Une voie réflexe contrôlée directement par le SNC (Niveau 4), en réponse à l'influence des fibres sensorielles qui suivent le système nerveux autonome (exemples : les réflexes gastro-coliques ou recto-anal excitateurs).

2.4.2 L'activité d'absorption et de sécrétion

Cette activité colique consiste en l'absorption d'eau, d'ion sodium (Na^+) et chlorure (Cl^-) ainsi qu'en la sécrétion d'ions bicarbonate ($\text{K}^+ \text{CO}_3\text{H}^-$) et de mucus. Elle permet au côlon de jouer son rôle de barrière intestinale, de maintien de l'équilibre hydrominéral de l'organisme et dans la composition des fèces. Dans cette partie 2.4.2 les échanges ioniques et le transfert d'eau sont définis précisément alors que la sécrétion de mucus est seulement abordée.

2.4.2.1 Les mécanismes de l'absorption et de la sécrétion

Au sein de l'épithélium colique, le Na^+ de la lumière intestinale pénètre dans les cellules épithéliales et est préférentiellement dirigé vers la LP. En effet, la présence des pompes Na^+/K^+ ATPases au niveau basolatéral des cellules épithéliales favorise le maintien d'une concentration sodique intracellulaire faible (ce processus est aussi sous le contrôle notamment de l'aldostérone). Parallèlement, les absorptions d'eau, par osmose, et de Cl^- , principalement par voie paracellulaire, suivent ce gradient électrochimique de Na^+ .

Dans le colon, l'entrée de Cl^- depuis la lumière intestinale au travers de la membrane épithéliale est favorisée par un mécanisme antiport qui est couplé à la libération de HCO_3^- vers la lumière intestinale. L'acidité de la lumière intestinale, provoquée par la fermentation bactérienne, peut ainsi être compensée.

Dans des conditions physiologiques, la réponse sécrétomotrice produit une stimulation du pompage de Na^+ , de Cl^- et d'eau depuis la lumière intestinale et une sécrétion de mucus par les cellules caliciformes (Furness, 2003).

A l'inverse, dans des conditions « pathologiques », les sécrétions d'eau et de Na^+ vers la lumière intestinale sont associées à une libération d'ions Cl^- vers la lumière intestinale. Ce transport de Cl^- vers l'extérieur est favorisé par une hausse au sein de la muqueuse de la concentration d'Adénosine Monophosphate cyclique (AMPc) ou d'agents susceptibles d'augmenter sa concentration tels que les prostaglandines PGE2, la toxine de choléra ou encore le VIP (Frizzell et al., 1979; Welsh et al., 1982).

Cette régulation de l'activité sécrétoire et absorptive dans des conditions physiologiques et « pathologiques » est réalisée *via* les neurones moteurs sécréteurs dont l'effet fonctionnel dépend du type de neuromédiateurs qu'ils libèrent suite à leur activation. La libération de Neuropeptide Y (NPY), de noradrénaline et d'enképhalines favorise les phénomènes d'absorption alors que la libération de VIP, d'ACh, de SP ou de sérotonine entraîne la libération de Cl⁻ dans la lumière intestinale, favorisant ainsi la sécrétion d'eau et de Na⁺ (Furness, 2003, 2012).

2.4.2.2 Le contrôle nerveux

Cette régulation est largement influencée par les réflexes sécrétomoteurs (comme les réflexes vasodilatateurs) déclenchés par des IPANs. Elle est par ailleurs modulée par l'innervation extrinsèque mais aussi par d'autres composants du milieu intérieur comme des médiateurs libérés par les cellules épithéliales et inflammatoires (Wood, 2004, 2006, 2007). Le but de cette sous-partie 2.4.2.2 est de décrire ces phénomènes.

a) Le rôle de l'innervation intrinsèque

Au niveau intrinsèque, deux mécanismes de fonctionnement mettant en jeu les IPANs sont à considérer dans les processus de sécrétion / absorption.

D'une part, les IPANs sous-muqueux peuvent être considérés comme de véritables neurones sécrétomoteurs. En effet, un IPAN semble être capable suite à sa propre activation de mettre en place un réflexe mononeuronal qui traverse son soma et se traduit par la libération de l'ACh à l'extrémité opposée (Furness, 2003).

D'autre part, les IPANs sous-muqueux forment un large réseau neuronal en interconnexion avec des neurones des plexus myentériques et sous-muqueux, afin de produire une réponse fonctionnelle intégrée. La présence de toxines bactériennes au sein de la lumière intestinale entraîne ainsi la mise en place d'un arc réflexe « local » qui implique à la fois les neurones sécrétomoteurs des plexus sous-muqueux et les motoneurones des plexus myentériques (Castro, 1989; Cowles and Sarna, 1990, 1991; Wang et al., 1991). Cet arc réflexe, dans les études précédemment citées, permet ainsi d'augmenter entre autre la sécrétion d'eau et d'électrolytes ainsi que l'activité motrice pour favoriser l'élimination des toxines.

b) Le rôle de l'innervation extrinsèque

L'action des neurones sécrétomoteurs, dans des conditions physiologiques, est plutôt inhibée par les fibres nerveuses extrinsèques avec lesquelles ils sont en contact direct. Par exemple, les fibres nerveuses sympathiques libèrent de la noradrénaline, ce qui favorise les processus liés à l'absorption de Na^+ et d'eau (Wood, 2007).

Cependant, ces mécanismes de contrôle nerveux locaux ou émanant de l'innervation extrinsèque sont aussi modulés par d'autres facteurs environnants, comme les cellules immunitaires. Lorsque des processus anormaux prennent place, comme l'apparition d'un processus inflammatoire, ces activités fonctionnelles sont ainsi directement impactées.

c) L'effet des médiateurs mastocytaires

L'implication fonctionnelle des mastocytes (MC) et de la communication bidirectionnelle de ces cellules immunitaires avec les fibres nerveuses entériques et extrinsèques a été mis en évidence notamment par Perdue *et al.*,. La stimulation des MC se traduit en effet par une augmentation de la sécrétion d'ions Cl^- au niveau de la muqueuse chez la souris. Cette augmentation du courant transduit est abolie lorsque des antagonistes des médiateurs mastocytaires (histamine et sérotonine) ou de la tetrodoxine (neurotoxine) sont utilisés (Perdue *et al.*, 1991).

L'excitabilité des neurones moteurs sécréteurs est en effet augmentée suite à la libération, par exemple, d'histamine par les mastocytes. Ce phénomène est lié à l'action de ce médiateur mastocytaire à deux niveaux : (i) une action directe de l'histamine qui active les neurones sécrétomoteurs en se liant sur leurs récepteurs membranaires et, (ii) une action indirecte de la molécule qui en agissant au niveau présynaptique inhibe la libération de substances comme la norépinéphrine par les fibres sympathiques (Wood, 2007).

2.4.3 L'activité contractile

La motricité colique est caractérisée par deux types de contractions : les contractions segmentaires et péristaltiques. Les contractions segmentaires permettent le brassage du bol alimentaire au niveau de l'intestin grêle alors que le péristaltisme est nécessaire à la progression du contenu luminal (chyle puis fèces) le long du tractus intestinal.

L'activité de contractibilité est rendue possible par la présence des deux couches musculaires lisses (la circulaire et la longitudinale), la présence des CIC, et, par un contrôle nerveux précisément adapté à la fonction de motilité.

2.4.3.1 Les mécanismes de la contractibilité musculaire

Les couches musculaires lisses sont douées d'automatisme grâce à la présence des CIC. Cependant, c'est le SNE, et plus particulièrement le plexus myentérique qui contrôle et module l'activité de motilité dans le sens oral-aboral. Il permet en effet la coordination des deux couches musculaires l'une par rapport à l'autre (Benarroch, 2007a).

Le rôle de l'innervation intrinsèque sur cette fonction est prépondérant par rapport à celui de l'innervation extrinsèque (Furness et al., 1995). En effet, une défaillance ou une absence du SNE se traduit par des phénomènes de pseudo-obstruction, respectivement chez les patients atteints de la maladie de Cagas (pathologie neurodégénérative du SNE) (Matsuda et al., 2009) ou du syndrome de Hirschprung (pathologie congénitale au niveau du côlon et du rectum) (Swenson, 2002). Ce phénomène de pseudo-obstruction n'est en revanche pas observé lors d'une perte du système nerveux sympathique ou parasympathique.

2.4.3.2 Le contrôle nerveux

a) Le rôle de l'innervation intrinsèque

Les mécanismes de ce réflexe péristaltique mettent en jeu les trois types de neurones du SNE. (figure 9).

Des expérimentations menées suite à une distension ou une distorsion de la muqueuse au niveau de l'intestin grêle de cochon d'inde ont mis en évidence l'implication des IPANs dans le réflexe péristaltique (Furness et al., 1995). Plus précisément, la stimulation mécanique des IPANs sous-muqueux et myentériques (par l'arrivée du chyle par exemple), induit un double réflexe. Un réflexe ascendant excitateur et un réflexe descendant inhibiteur modulés par l'intermédiaire d'interneurones. La libération de médiateurs chimiques comme la SP ou l'Ach par les motoneurones excitateurs et la libération de NO, VIP par les motoneurones inhibiteurs permettent respectivement la contraction musculaire au niveau oral ainsi que le relâchement des muscles au niveau anal. Ces phénomènes sont rendus possibles par la présence des CIC qui constituent le lien fonctionnel entre les neurones moteurs et les fibres musculaires (figure 9).

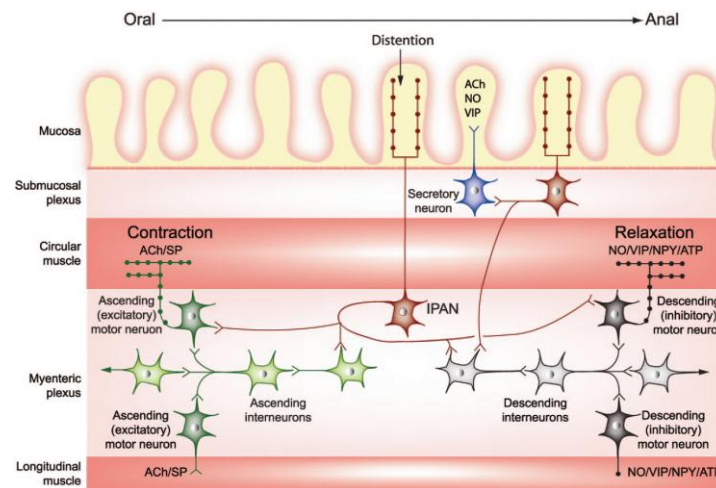


Figure 9 : Mécanisme du réflexe péristaltique entérique (Benarroch, 2007b).

Dans le cadre du réflexe pour la propulsion du chyle, la modulation de l'activité de contractibilité des muscles est aussi soumise au réflexe entéro-entérique (deuxième niveau de contrôle nerveux). Ce contrôle est décrit comme étant plutôt inhibiteur dans le sens aboral, ce qui facilite l'activité de propulsion.

Les IFANs initient ce phénomène mais ne sont vraisemblablement pas les seuls impliqués. En effet, l'innervation S est susceptible de moduler cette réponse fonctionnelle par une action au niveau du ganglion sympathique spinale où les IFANs projettent (Niveau 3) (figures 4 et 8) (Furness, 2003; Prins, 2011).

b) Le rôle de l'innervation extrinsèque

De manière générale, en ce qui concerne l'effet de l'innervation extrinsèque sur la motricité intestinale :

L'innervation PS favorise l'augmentation de l'activité motrice alors qu'une activation par le système S favorise une relaxation et une diminution du tonus digestif au niveau du côlon et du rectum.

Au niveau des processus de motilité, le SNP, et plus particulièrement l'innervation PS sacrée, provenant d'ailleurs majoritairement des ganglions coeliaques ou mésentériques, joue un rôle fondamental dans les processus de défécation.

c) L'effet des médiateurs mastocytaires

Entre autre, Serna *et al.*, ont démontré dans un modèle d'inflammation colique chez le rat que le traitement pharmacologique par un stabilisateur des MC permettait de prévenir l'apparition d'hyper-motilité (Serna et al., 2006).

Les MC, entre autre, *via* leur lien avec le système nerveux, favorisent comme on l'a vu les processus de sécrétion (comme les processus de circulation sanguine qui ne sont pas évoqués dans cette thèse) mais aussi l'activité motrice propulsive (Rijnierse et al., 2007; Wood, 2004, 2007). Ces mécanismes participent d'ailleurs à la défense de l'organisme en favorisant l'évacuation de substances ou de bactéries nocives de la lumière intestinale (précédemment évoqué dans le cas des réflexes entériques de la partie traitant des processus d'absorption et sécrétion).

La partie qui suit se propose de définir les notions ayant trait aux douleurs viscérales chroniques et d'identifier les mécanismes de neurotransmission des messages douloureux depuis leur lieu de genèse, le côlon, jusqu'à leur intégration au niveau des structures supérieures du SNC.

3 LA DOULEUR VISCÉRALE

La douleur viscérale émane des organes internes du corps comme le cœur, les organes reproducteurs, les structures des voies respiratoires, de l'abdomen supérieur, des voies urinaires, et bien-sûr du tractus gastro-intestinal.

Différents phénomènes peuvent être étiologiquement responsables de sa survenue :

- l'existence de processus inflammatoires aigus ou chroniques,
- l'apparition de dysfonctionnements dans les processus mécaniques classiques de ces organes (exemple : les troubles de la motilité gastro-intestinale),
- la génération de tumeurs, ou bien encore,
- la présence d'altérations des fibres nerveuses sensorielles extrinsèques impliquées dans les processus de transmission de ces messages douloureux.

Les caractéristiques cliniques de la douleur viscérale rendent son interprétation et son traitement complexe. En effet, sa localisation est diffuse, et, elle se traduit par des sensations référées / projetées aux structures somatiques. Il est alors souvent difficile de la mettre en rapport direct avec une pathologie.

Les caractéristiques spécifiques de la douleur viscérale sont la traduction de l'organisation neuro-anatomique des réseaux nerveux qui transmettent le message douloureux. Ainsi, dans cette partie 3 après avoir introduit quelques notions générales sur la douleur viscérale, une description de la transmission du message nerveux douloureux est présentée. Une telle description permet entre autre la mise en évidence des spécificités de ces douleurs.

3.1 La terminologie et les caractéristiques associées à la douleur viscérale

C'est l'Association Internationale pour l'étude de la Douleur (IASP) qui a défini une terminologie adaptée de la douleur viscérale chronique en fournissant notamment à la communauté scientifique le « dictionnaire scientifique » des termes associés à la douleur.

3.1.1 Quelques définitions et notions générales

La douleur correspond à un mécanisme d'alarme qui permet à l'organisme d'assurer sa protection. Elle est définie comme «une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles ou décrites en termes de telles lésions» (IASP). C'est une expérience complexe qui intègre à la fois une composante sensori-discriminative (analyse de la localisation et de l'intensité du stimulus), une composante affective et émotionnelle, et une composante cognitive et comportementale. Elle est donc subjective, personnelle.

Par ailleurs, le terme nociception est employé lorsque le seul aspect sensori-discriminatif de la douleur est considéré. La nociception correspond donc au processus neuronal d'encodage des stimuli qui provoquent la douleur.

Les récepteurs sensoriels périphériques à l'origine des messages nerveux provoquant la douleur sont appelés nocicepteurs, selon le terme proposé par Sherrington en 1906. Ces nocicepteurs, essentiellement des terminaisons nerveuses libres amyéliniques (fibres A δ et C

(cf. partie 3.2.1.1)) qui innervent les tissus cutanés, musculaires et articulaires, répondent à des stimulations d'intensité forte, généralement lésionnelle.

Dans le contexte de la douleur viscérale, la distinction est faite entre les stimuli nocifs qui peuvent léser les tissus sans engendrer forcément de sensation douloureuse et les stimuli nociceptifs qui sont à l'origine de sensations d'inconfort ou douloureuses (Cervero and Merskey, 1996).

Les messages nociceptifs sont donc codés au niveau des terminaisons libres des fibres nerveuses afférentes nociceptives. Ces fibres nerveuses, dont le corps cellulaire se situe majoritairement au niveau des GRD, transmettent l'influx nociceptif depuis la périphérie jusqu'au deutoneurone, situé dans la corne dorsale de la moelle épinière, qui est le deuxième neurone impliqué dans la transmission du message sensoriel. L'information relayée par ce type de fibre nerveuse est ensuite transférée vers le cerveau où elle sera intégrée et transformée en message conscient de douleur (Queneau et al., 2003) (figure 8).

3.1.2 Lorsque la douleur devient une pathologie

3.1.2.1 La douleur aiguë

La douleur aiguë assure une fonction d'alarme pour l'organisme. Elle permet le maintien de son intégrité en associant un stimulus nociceptif à une sensation d'inconfort ou de douleur, en liaison avec la zone stimulée.

3.1.2.2 La douleur chronique

Une douleur chronique est une douleur qui dure dans le temps. Elle correspond à un état pathologique qui a perdu sa signification physiologique. Chez l'homme, cette dernière se définit comme étant une douleur perdurant au-delà de trois à six mois et qui entraîne des états d'anxiété et de dépression. Ces douleurs pathologiques peuvent persister même après la résolution d'un dommage tissulaire.

Les douleurs chroniques sont souvent caractérisées et sous-tendues par des phénomènes de neuroplasticité tant au niveau du système nerveux périphérique que central (Petersen-Felix and Curatolo, 2002) :

- les changements neuroplastiques au niveau périphérique correspondent à des modifications neuroanatomorphologiques, neurochimiques et neurofonctionnelles (hyperplasie, synaptogénèse...) (Bueno and Fioramonti, 2002; Demir et al., 2013).
- les changements neuroplastiques au niveau du système nerveux central sont inhérents notamment à un maintien d'un processus nociceptif accru. C'est ce phénomène de sensibilisation centrale qui contribue aux douleurs durables ou persistantes. Cette sensibilisation centrale se caractérise par une augmentation de l'excitabilité des neurones du SNC, du champ récepteur de la douleur, et, par des réponses augmentées à l'application de stimuli (Latremoliere and Woolf, 2009). Cette hyperexcitabilité neuronale qui perdure dans le temps correspond à l'empreinte mémoire des douleurs chroniques. Chez les patients atteints notamment du syndrome de l'intestin irritable (IBS) qui souffrent de douleurs viscérales abdominales chroniques, une activation anormale des neurones de la moelle épinière a d'ailleurs été identifiée (Coffin et al., 2004).

3.1.2.3 L'étiologie des douleurs chroniques

Lorsque la douleur viscérale chronique a pour étiologie une lésion pathologique détectable elle est dite « organique ». En revanche lorsqu'il s'avère difficile de mettre en évidence son origine, elle est dite « fonctionnelle ». La douleur pathologique des patients IBS par exemple est dite « fonctionnelle » car aucune réelle étiologie n'a pu lui être attribuée (Thompson et al., 1999).

3.1.3 Les différents types de douleurs

Il existe trois grands types de douleurs : la douleur par excès de nociception (ou nociceptive ou encore hyper-nociceptive), la douleur neuropathique (ou neurogène) et enfin la douleur psychogène. Cette dernière est essentiellement due à des facteurs psychologiques, émotionnels et nous ne l'évoquerons pas dans le cadre de ce travail doctoral.

3.1.3.1 La douleur par excès de nociception

La douleur par excès de nociception est définie comme une douleur dont l'origine est inflammatoire. Précisons ici d'ailleurs que cette définition n'admet pas une douleur initiée par un dommage neural (IASP).

Plus exactement, la libération de divers médiateurs sur un site de lésion et d'inflammation favorise l'activation et la sensibilisation des nocicepteurs. Cette sensibilisation périphérique se traduit par une diminution du seuil d'activation des nocicepteurs, une réponse accrue aux stimuli appliqués et est qualifiée d'hyperalgésie primaire. Ces substances qui permettent l'activation des nocicepteurs sont dites algogènes (bradykinines, histamine, ...) (Queneau et al., 2003).

De plus, une modification chimique du milieu qui perdure au niveau du site lésionnel se manifeste par une circulation antidromique de neuropeptides tels que la SP ou la CGRP le long des fibres nociceptives activées. Ce « réflexe d'axone » crée une inflammation neurogène au site de lésion mais aussi au niveau de tissus sains péri-lésionnels, amplifiant ainsi la sensibilisation et le champ de sensibilisé. La sensibilisation au niveau des tissus sains adjacents est nommée hyperalgésie secondaire (Queneau et al., 2003).

Enfin, les stratégies thérapeutiques mises en place pour ce type de douleur se concentrent surtout sur l'utilisation d'antalgiques (anti-inflammatoires non stéroïdiens et dérivés opioïdiques) (cf. partie 4.3.1).

3.1.3.2 La douleur neuropathique

La douleur neuropathique est définie comme « une douleur qui est initiée par une lésion primaire ou un dysfonctionnement du système nerveux ». Chez les patients elle se manifeste notamment par des picotements, des fourmillements, des épisodes de type « décharges électriques » et par des sensations de brûlures ou à l'inverse des sensations de froid douloureux.

Des modifications morphologiques, phénotypiques et biochimiques des afférences sensorielles sont alors observées. Plus précisément, une augmentation du diamètre des fibres, de l'expression de canaux sodiques et d'adreno-récepteurs α est observée (Lai et al., 2003). L'excitabilité fonctionnelle des fibres nerveuses est ainsi modifiée, traduisant une modification de l'excitabilité neuronale au niveau central.

Les stratégies les plus classiquement employées pour lutter contre ce type de douleurs sont les antidépresseurs et les anticonvulsants (cf. partie 4.3.1).

3.1.4 L'évaluation de la sensibilité viscérale

L'évaluation de la sensation douloureuse viscérale est très complexe. La réalisation de travaux scientifiques sur l'étude de la douleur d'origine viscérale s'est avérée pendant longtemps délicate. Ceci était notamment lié aux difficultés rencontrées pour accéder aux organes viscéraux et pour provoquer des stimuli naturels appropriés à ce type d'organe.

Le développement du barostat, technique permettant de reproduire des stimuli adaptés aux organes creux de manière non invasive a ainsi constitué une révolution dans ce domaine d'étude. Le barostat permet en effet l'application d'une pression constante dans un ballonnet (auquel il est relié par un cathéter) lorsqu'il est positionné dans une cavité creuse comme l'intestin ; et, ceci, grâce à un système de pompe pneumatique. C'est ainsi que ce système permet la reproduction, dans des organes creux, de stimuli naturels (distension, contraction ou d'étirement) qui peuvent être à l'origine de douleurs viscérales chez l'homme.

Le barostat a ainsi été utilisé chez des patients souffrant de pathologies intestinales pour mesurer la tension du tube digestif ainsi que pour évaluer la sensation de douleur et l'effet de traitement à visée antalgique (Klooker et al., 2010; Kuiken et al., 2006; Marshall and Irvine, 1998; Reinders et al., 2005). Le paramètre classiquement utilisé dans ces études est la valeur du seuil à partir duquel les patients disent ressentir une sensation désagréable.

Dans l'objectif de mener des études expérimentales permettant d'évaluer la douleur ressentie chez l'animal *in vivo*, des protocoles de distensions colorectales chez le rat ont été mis en place (Ness and Gebhart, 1988). De telles distensions provoquent une augmentation de la pression sanguine, du rythme cardiaque et des contractions des muscles striés de l'abdomen (Morteau et al., 1994). Cette contraction des muscles abdominaux, appelée réponse de viscéro-motrice (RVM), sert de niveau d'évaluation de la douleur d'origine viscérale dans les études expérimentales. Ce paramètre de réponse est en effet considéré comme étant le plus fiable et est donc le plus classiquement utilisé. D'un point de vue expérimental, ces RVM sont évaluées grâce à des enregistrements électromyographiques (EMG), et, nécessitent donc l'implantation d'électrodes chirurgicales, préalablement à l'expérimentation au barostat.

Des études utilisant les protocoles précédemment cités permettent d'obtenir des courbes de sensations douloureuses viscérales en réponse à différents types de stimuli, chez l'animal (figure 10). De telles courbes représentées sur la figure 10 révèlent l'état du système nociceptif dans son état basal. Elles permettent tout d'abord d'identifier le seuil d'apparition de la sensation douloureuse (i.e. la valeur du stimulus pour laquelle une sensation douloureuse est perçue). Puis, pour différentes intensités de stimuli appliqués, de quantifier la sensation douloureuse.

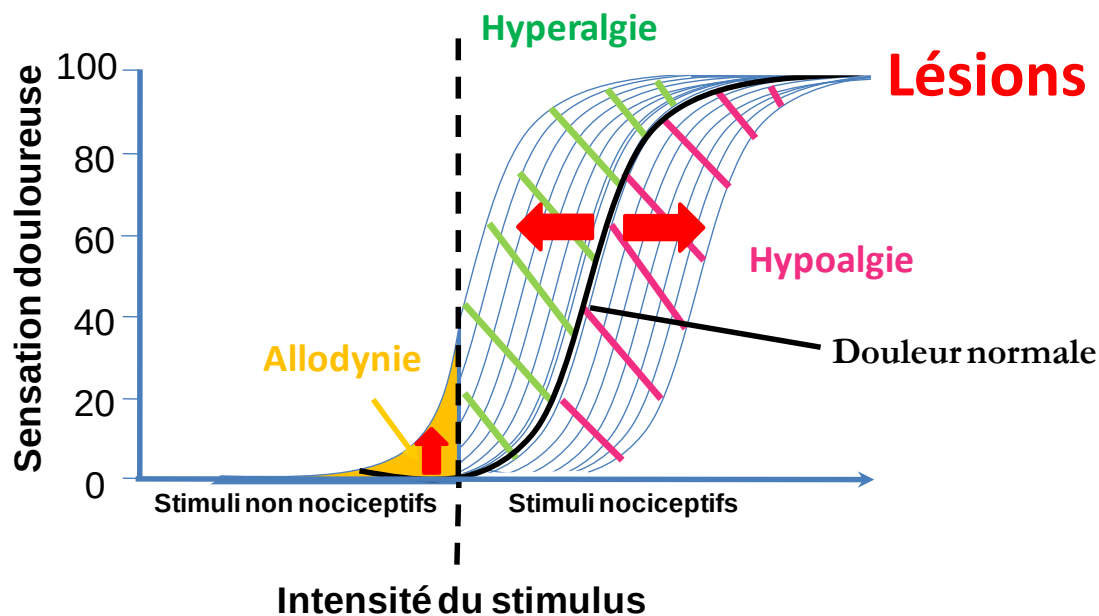


Figure 10 : Courbes évaluant la sensation douloureuse viscérale en réponse à différents types de stimuli (Adapté de (Gebhart, 2000)). La courbe noire et les courbes bleues peuvent être obtenues en évaluant la sensation de douleur, successivement à l'application consécutive de stimuli non nociceptifs et nociceptifs d'intensité croissante, respectivement pour des animaux témoins et pour des animaux dits « lésés » (i.e. en conditions pathologiques).

En comparant l'allure des courbes obtenues pour des animaux dits « lésés » par rapport à une courbe de douleur classique obtenue pour un animal témoin, il est possible d'identifier la nature de la perception douloureuse chez ce premier. On distingue (IASP) :

- une allodynie qui correspond à une douleur provoquée en réponse à une stimulation non nociceptive ;
- une hyperalgie qui est caractérisée par une exacerbation de la sensation douloureuse provoquée par une stimulation nociceptive donnée ;

- une hypoalgie qui est une réduction de la sensation douloureuse successivement à l'application de stimuli normalement nociceptifs.

Dès lors qu'une perception accrue de la sensibilité pour une stimulation expérimentale de l'intestin est observée, une hypersensibilité viscérale est définie.

3.2 La neurotransmission du message douloureux

Afin d'étudier les douleurs viscérales, il est nécessaire de considérer: (i) les différents acteurs à l'œuvre au niveau du site de genèse du message douloureux, (ii) les voies de transmission du message douloureux depuis la périphérie jusqu'à son intégration au niveau du système nerveux central et (iii) les voies de modulation qui lui sont associées.

3.2.1 Les nocicepteurs

Les nocicepteurs correspondent aux terminaisons libres, à savoir les parties distales des axones des fibres nerveuses. Ces derniers forment des arborisations plexiformes au niveau des structures qu'ils innervent et contribuent initialement à la transmission du message douloureux.

Les fibres sensorielles afférentes du côlon sont décrites classiquement comme ayant leurs corps cellulaires dans les GRD et projetant au niveau de la moelle épinière. Leur description et leur rôle sont l'objet principal de cette sous-partie.

3.2.1.1 Les caractéristiques des afférences sensorielles viscérales et plus spécifiquement de celles chargées de transmettre la douleur

De manière générale, il existe plusieurs types de fibres nerveuses sensorielles possédant des propriétés morphologiques, électriques et biologiques différentes (tableau 3) :

- les fibres nerveuses A β , de diamètres importants sont spécialisées dans le transport des informations tactiles et proprioceptives (i.e. de la sensation non douloureuse) ;
- les fibres C amyéliniques, qui représentent d'ailleurs 80% des fibres nerveuses sensorielles viscérales et ;
- les fibres A δ qui elles sont faiblement myélinisées.

Les caractéristiques biologiques distinctes de ces fibres nerveuses sont responsables à la fois de la rapidité avec laquelle un stimulus est perçu et aussi du type de sensation ressenti. Les fibres nerveuses C et A δ transmettent l'information sensorielle, à la fois avec des vitesses

de conduction bien plus faibles que celles des afférences A β , et, aussi, suivant des modalités très différentes. Alors que les fibres A β transmettent les informations sensorielles liées à la proprioception, les fibres C et A δ peuvent être impliquées dans la transmission d'informations sensorielles suscitant des sensations d'inconfort ou de douleur. Néanmoins, ces dernières ne sont pas équivalentes. En effet les fibres C transmettent des informations sensorielles plus lentement et de manière plus diffuse que les fibres nerveuses A δ .

Tableau 3 : Différents types de fibres nerveuses sensorielles, leurs caractéristiques anatomiques, morphologiques, électriques et fonctionnelles

Type de fibres	A β	A δ	C
Diamètre	7-15 μm	1-5 μm	0,3-1,5 μm
Gaine de myéline	+++	+	-
Vitesse de conduction	40-100 m/s	5-40 m/s	1-2 m/s
Caractéristiques de la sensation	Tact, proprioception	Douleur rapide, vive, de type pique	Douleur lente, sourde, de type brûlure

Les fibres nerveuses qui constituent majoritairement l'innervation sensorielle intestinale sont les fibres A δ et C alors que les fibres A β sont peu nombreuses.

De manière plus spécifique, l'innervation extrinsèque sensorielle viscérale joue un rôle d'une part dans la régulation des fonctions autonomes intestinales (absorption, sécrétion et propulsion), et d'autre part, dans l'évaluation des sensations conscientes. Le rôle de l'innervation sensorielle extrinsèque du côlon réside bien plus dans sa dualité fonctionnelle que dans la simple description de ses caractéristiques anatomiques, morphologiques et électriques. Cette dualité fonctionnelle dépend des seuils de réponse à la distension des mécanorécepteurs sensoriels de l'innervation extrinsèque sensorielle viscérale. Se distinguent ainsi (i) les afférences à bas seuil, (ii) les afférences à haut seuil et (iii) les afférences silencieuses. Certaines sont clairement des fibres nerveuses transmettant des informations nociceptives et d'autres peuvent le devenir dans des conditions pathologiques.

Plus exactement, il existe (Cervero and Laird, 2004; Wood, 2007) :

- (i) des afférences à bas seuil qui répondent et qui codent des variations minimales de la tension du côlon. La régulation permanente de la contractibilité colique est ainsi autorisée. De plus ces mécanorécepteurs peuvent aussi répondre à des stimuli d'intensité plus importante et/ou qui durent dans le temps (lorsque la motilité intestinale est altérée par exemple) et donc être responsables de la transduction de message d'inconfort ou de douleur, dans ce cas ils jouent le rôle de nocicepteurs. Dans ce contexte les fibres nerveuses afférentes transmettent alors des informations nociceptives.
- (ii) des afférences à haut seuil qui, pour être activées, nécessitent des stimulations importantes. Ces stimulations peuvent être successives à des distensions lumenales excessives ou à des contractions importantes des muscles. De telles fibres possèdent des nocicepteurs qui sont responsables des sensations douloureuses de modérées à intenses.
- (iii) des afférences silencieuses qui ne sont pas activées pour des contractions ou des distensions importantes dans des conditions physiologiques. Ces fibres sont en revanche activables et très sensibles à des stimuli du milieu les environnant dans des conditions inflammatoires (Xu et al., 2000).

Certains mécanorécepteurs, de ces afférences sensorielles, ne répondent pas seulement à des stimuli mécaniques, ils peuvent aussi posséder des récepteurs spécifiques qui les rendent sensibles à des stimuli chimiques et thermiques. Ce sont alors des nocicepteurs dits "polymodaux" (Su and Gebhart, 1998).

3.2.1.2 La neurochimie des nocicepteurs

Les nocicepteurs possèdent des caractéristiques moléculaires nécessaires à la transduction fonctionnelle des messages douloureux.

Il sont ainsi capables de synthétiser des neuropeptides, au niveau de leurs corps cellulaires et de les transporter pour qu'ils soient sécrétés au niveau de leurs extrémités en périphérie et au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière pour assurer la transmission du message douloureux (Levine et al., 1993).

Plus spécifiquement, une distinction a été réalisée entre les fibres C qui synthétisent des peptides et qui sont dites «peptidergiques» et celles qui n'en synthétisent pas, les fibres nerveuses «non-peptidergiques», qui expriment notamment la protéine isolectine B4 (IB4). Les principaux neuropeptides concernés sont la SP et le CGRP, substances qui peuvent également être synthétisées par les fibres A δ .

De manière non exhaustive, d'autres molécules sont aussi exprimées par les fibres afférentes viscérales et participent ainsi aux processus de nociception (figure 11). Citons à ce titre: le glutamate, la bradykinine, les prostaglandines (PGE₂), les neurotrophines, le NPY, la cholécystokinine (CCK), les enképhalines (ENK), la somatostatine, le VIP, la neurotensine ou encore les pro-dynorphines (Chayvialle et al., 1980; Chery-Croze et al., 1988; Schultzberg et al., 1980).

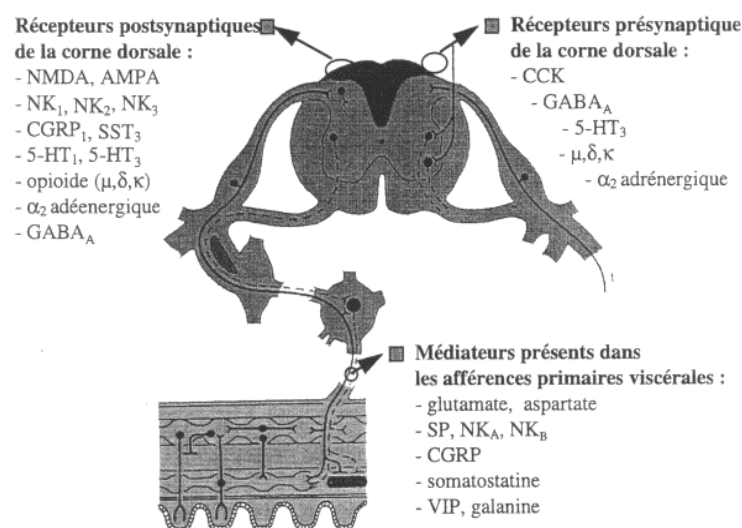


Figure 11 : Liste des médiateurs et récepteurs impliqués dans la transmission des messages nociceptifs viscéraux depuis la périphérie jusqu'à la corne dorsale de la moelle épinière. AMPA : acide- γ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole; CGRP : calcitonin gene-related peptide; CGRP₁ : récepteur au CGRP de type 1; GABA_A : récepteur à l'acide γ -aminobutyrique de type A; NKA : neurokinine A ; NKB : neurokinine B; NMDA : N-méthyl D-aspartate; NK₁, NK₂, NK₃ : récepteurs aux tachykinines de type 1, 2 et 3; 5-HT₁ et 5-HT₃ : récepteurs à la sérotonine de type 1 et 3; SST₃ : récepteur à la somatostatine de type 3; SP : substance P; VIP : Vasoactive intestinal polypeptide (Bueno et al., 2000).

De plus, l'expression par les nocicepteurs de canaux ioniques (Raybould et al., 1999; Su and Gebhart, 1998) possédant un seuil élevé d'activation aux stimuli mécaniques, chimiques et thermiques de l'environnement permet la transmission et la transduction membranaire de stimuli nociceptifs viscéraux vers le SNC.

Trois familles de récepteurs à canaux ioniques jouent ainsi ce rôle:

- Les canaux Transient Receptor Potential (TRP) qui sont activables par des stimulations mécaniques chimiques et thermiques. Des études expérimentales soulignent ainsi l'action du Transient Receptor Potential Vanilloïd 1 (TRPV1), premier TRP à avoir été découvert mais aussi du TRPV1 et TRPV4. Le rôle du TRPV1 et du TRPV4 a notamment été démontré dans des mécanismes de mécanonociception du côlon (Brierley et al., 2008; Holzer, 2004; Winston et al., 2007);
- Les canaux Acid Sensing Ion Channels (ASIC), sensibles aux diminutions de PH et qui sont impliqués dans la mécanosensation et la chimionociception ;
- Les canaux purinergiques dits P2X qui sont principalement activables par l'ATP.

3.2.1.3 La sensibilisation périphérique des nocicepteurs

Les mécanismes de cette sensibilisation ont déjà été décrits pour introduire les notions d'hyperalgie primaire et secondaire au paragraphe 3.1.3. L'objectif de cette sous-partie est de préciser certains des mécanismes moléculaires relatifs à ces processus.

Lors d'une lésion et/ou d'une inflammation, les fibres nerveuses du côlon se retrouvent en contact avec des médiateurs susceptibles d'augmenter leur excitabilité, en les activant directement et/ou en les sensibilisant i.e. en diminuant le seuil d'activation. Ceci se caractérise par une diminution du seuil d'activation du nocicepteur et par une augmentation de la réponse pour un stimulus appliqué. Parmi ces substances, on retrouve plusieurs types de molécules: les kinines telle que la bradykinine, les amines biogéniques comme l'histamine, les prostaglandines (PGE₂), les facteurs de croissances tels que le Nerve Growth Factor (NGF) et le Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) mais aussi des cytokines, des ions H⁺ et l'ATP (Bueno et al., 1997).

D'un point de vue moléculaire deux phases se distinguent au cours de la sensibilisation périphérique (Cervero, 1995; Knowles and Aziz, 2009) :

- Tout d'abord, l'activation des récepteurs membranaires des nocicepteurs se traduit par des modifications post-traductionnelles des protéines des nocicepteurs. Ces changements neuroplastiques participent ainsi à l'augmentation de l'excitabilité neuronale périphérique. En effet, l'activation des canaux ioniques favorise l'activation de la voie de signalisation des MAPKinases, ce qui se traduit par la phosphorylation de ces récepteurs et donc par la diminution de leur seuil d'activation.
- A cela s'ajoutent subséquemment des modifications pré-transcriptionnelles qui se manifestent par une variation à la fois de la quantité mais aussi du type de molécules synthétisées par les afférences sensorielles. Ces molécules sont au centre des phénomènes de neuroplasticité périphérique favorisant cette sensibilisation.

L'apparition de tels phénomènes réside dans la mise en place d'une neuro-inflammation qui met en relation directe les cellules immunitaires, et notamment les mastocytes (MC) et les fibres nerveuses. En effet, une communication réciproque s'établit *via* les divers médiateurs cités précédemment, entraînant *in fine* des modifications phénotypiques des fibres nerveuses. Plus précisément, les médiateurs mastocytaires potentialisent la libération de molécules (SP, CGRP...) par les fibres, et, ces substances activent, en retour, différents types de cellules (cellules épithéliales, cellules immunitaires) (Purcell and Atterwill, 1995). Les MC, notamment, libèrent en suivant des molécules comme le NGF. Les fibres peptidergiques exprimant le récepteur au NGF, le Tropomyosin receptor kinase A (TrkA), elles sont donc sensibles à son action (Bueno et al., 1997). La libération de NGF à proximité des fibres entraîne alors une hyperplasie nerveuse et induit une synthèse augmentée de substances et de récepteurs membranaires en périphérie. Ce switch phénotypique des fibres nerveuses participe donc aux mécanismes de la sensibilisation périphérique, et, c'est ainsi que les nocicepteurs coliques silencieux peuvent jouer un rôle dans la transmission des messages douloureux.

3.2.2 *Le relais, l'intégration et la modulation du message nociceptif au niveau spinal*

La transmission de l'information sensorielle véhiculée par les fibres nerveuses afférentes se fait au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière sur les deutoneurones. Ces deutoneurones représentent le premier relais de la transmission du message nociceptif qui est relayé ensuite vers les centres supérieurs où il est transformé en message douloureux conscient.

3.2.2.1 La projection des fibres nerveuses afférentes au niveau de la moelle épinière

Une organisation cytoarchitectonique, fondée sur la répartition fonctionnelle des fibres nerveuses de la substance grise de la moelle épinière a été proposée par Rexed en 1954. La substance grise est ainsi subdivisée en dix couches appelées laminae. Plus particulièrement, les laminae I à V et les laminae VII à IX correspondent respectivement à la corne dorsale (ou postérieure) et ventrale (ou antérieure) de la moelle épinière. Une zone intermédiaire est déterminée par les laminae VI et VII. Enfin, la lamina X est la zone qui entoure le canal épendymaire central (figure 12).

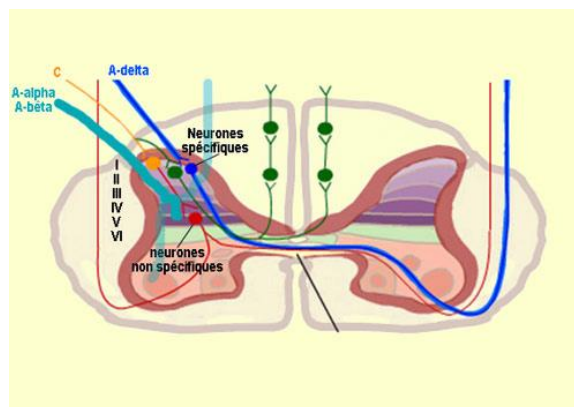


Figure 12 : Organisation cytoarchitectonique de la substance grise de la moelle épinière.

De plus, les fibres afférentes se séparent suivant leurs caractéristiques biologiques pour projeter au sein des diverses laminae. Parmi elles, se distinguent tout d'abord les fibres sensorielles A β . Ces fibres occupent une position dorso-médiane au niveau de la racine et projettent majoritairement dans les laminae III et IV. Ensuite, la transmission des informations nociceptives est assurée par des faisceaux de fibres A δ et C. Ces faisceaux

occupent une position ventro-latérale dans la racine et développent des projections principalement vers les couches superficielles (laminae I et II) et profondes (lamina V) de la corne dorsale de la moelle épinière. Plus précisément l'influx nociceptif est exclusivement véhiculé jusqu'aux laminae I et IIo (qui correspond à la partie la plus externe de la lamina II).

Bien plus, concernant les afférences viscérales, les fibres A δ projettent dans les laminae I et V et, dans une moindre mesure, dans les laminae IIo et X. Les fibres C projettent majoritairement au niveau des laminae I, V et VI. Chez le rat il semble que des afférences C puissent rejoindre la partie superficielle de la lamina II (Grant and Koerber, 2004). Finalement, les fibres cutanées projettent majoritairement dans les laminae I et IIo, et dans le cas des fibres A δ , elles peuvent aussi projeter vers la lamina V. En ce qui concerne les afférences sensorielles musculaires, elles projettent dans les laminae I, V et VI.

En résumé, la lamina V perçoit donc des informations nociceptives ou non nociceptives tandis que les informations venant de territoires somatiques et viscéraux sont transmises aux laminae I et V, traduisant ainsi une convergence de l'information sensorielle.

3.2.2.2 Les deutoneurones de la moelle épinière

La projection des afférences sensorielles sur les deutoneurones permet de les caractériser sur la base de deux critères :

- leur caractère nociceptif exclusif. En effet certains deutoneurones sont des neurones nociceptifs spécifiques, qui ne transmettent que des messages douloureux, leurs corps cellulaires étant situés préférentiellement dans les couches superficielles de la moelle épinière. D'autres deutoneurones sont des neurones nociceptifs non spécifiques qui sont aussi nommés neurones convergents, neurones polymodaux ou neurones à large gamme réceptive (« wide dynamic range neurones » - WDR), et, qui propagent des influx nociceptifs ainsi que non nociceptifs ;
- la multiplicité des territoires d'où leur viennent les informations sensorielles. Parmi ces deutoneurones, on trouve des neurones secondaires somatiques. Cependant, il n'existe pas de neurone secondaire dédié exclusivement à la transmission de l'information viscérale. Les neurones qui peuvent transmettre ce type d'informations sont des neurones viscéro-somatiques. Dans ce cadre, les deutoneurones des laminae I et V sont alors majoritairement concernés.

Au niveau spinal cette organisation anatomique des réseaux nerveux permet d'expliquer les caractéristiques spécifiques des douleurs viscérales (cf. partie 3.3).

3.2.2.3 Les acteurs impliqués dans la neurotransmission spinale

La transduction du message au niveau de la moelle épinière est initiée depuis les fibres C et A δ excitées par des neuromédiateurs tels que la SP, la CGRP, les neurokinines A et B, la somatostatine, le VIP, la CCK ou des acides aminés excitateurs comme le glutamate ou l'aspartate. Elle est d'ailleurs majoritairement glutamatergique (Cervero, 2000). La libération de ces molécules provoque l'activation des récepteurs post-synaptiques des deutoneurones (exemple : N-méthyl D-aspartate (NMDA), acide- γ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole (AMPA) neurokinine (NK)) et se traduit par une dépolarisation post-synaptique lente qui favorise la sommation temporelle des influx nociceptifs. Parallèlement, des neurones spinaux intrinsèques et des fibres nerveuses descendantes peuvent moduler le message en agissant depuis des récepteurs pré- ou post-synaptiques (figure 11).

3.2.2.4 La sensibilisation centrale

L'afflux continu de message nerveux de la périphérie vers les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière se traduit par une transmission synaptique élevée, avec comme conséquence une augmentation de l'excitabilité neuronale au niveau central.

La facilitation de la transmission nerveuse est bien sûr liée à une libération de médiateurs biologiques (glutamate, neuropeptides (SP, CGRP), modulateurs synaptiques (BDNF, NGF) plus importante au niveau pré-synaptique (Urban and Gebhart, 1998). L'implication de ces acteurs et de leurs récepteurs dans les phénomènes de sensibilisation centrale a d'abord été démontrée dans le cas de douleurs somatiques puis, plus récemment, viscérales. Bradesi *et al.*, ont, notamment, démontré dans un modèle de rat stressé une augmentation du nombre de récepteurs NK1 à la SP au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière ainsi que leur implication fonctionnelle dans le maintien de l'hyperalgie viscérale (Bradesi et al., 2006).

Parallèlement à ce qui a été décrit pour les étapes de la sensibilisation périphérique, deux phases moléculaires sont à distinguer au cours de la sensibilisation centrale (Cervero, 1995; Knowles and Aziz, 2009) :

- dans un premier temps, les protéines neuronales sont sujettes à des modifications post traductionnelles. Notamment, l'activation par le glutamate des récepteurs NMDA

post-synaptiques favorise l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, et, finalement, par ce biais, l'activation des protéines Kinases A et C. L'activation de ces protéines se traduit par la phosphorylation des récepteurs NMDA qui ont alors un seuil d'activation plus faible, augmentant ainsi leur réponse au glutamate.

- dans un deuxième temps, des modifications dans l'expression génique sont observées au niveau des fibres nerveuses, présentes au niveau du relais de la corne dorsale. Cette phase, plus tardive dans la sensibilisation centrale, se caractérise par une modification de la quantité de protéines produite (Exemple : la dynorphine, opioïde endogène qui augmente le niveau d'excitabilité neuronale). Par exemple, la libération par les fibres nerveuses de neurotrophines comme le NGF favorise les « sprouting » des fibres nerveuses ne transmettant habituellement pas la douleur vers les zones de la moelle épinière directement impliquées dans la transmission de l'information nociceptive.

La mise en place d'une sensibilisation centrale engendre alors des réponses amplifiées aux stimuli non nociceptifs (allodynie) et nociceptifs (hyperalgie). De plus, cette sensibilisation centrale génère également l'apparition d'une hyperalgie secondaire. Enfin, cette hyperexcitabilité neuronale qui dure dans le temps correspond à l'empreinte de cette transmission nociceptive accrue, et est impliquée dans la mémorisation de la douleur.

3.2.3 La transmission de l'information nociceptive au niveau supra-spinal

A partir des deutoneurones spinaux, la neurotransmission des messages nerveux viscéraux mais aussi somatiques est réalisée selon diverses voies ou divers faisceaux jusqu'aux centres supérieurs (Sikandar and Dickenson, 2012). Les messages nerveux sont alors intégrés au niveau de différentes aires corticales pour être transformés en message conscient.

De manière générale, on distingue les voies spinothalamiques et la voie des colonnes dorsales (ou lemniscale). Les voies spinothalamiques sont caractérisées par des fibres qui décussent au niveau de la commissure grise antérieure et qui cheminent dans le quadrant antéro-latéral de la moelle. La voie lemniscale envoie des projections directement *via* la colonne dorsale (figure 13).

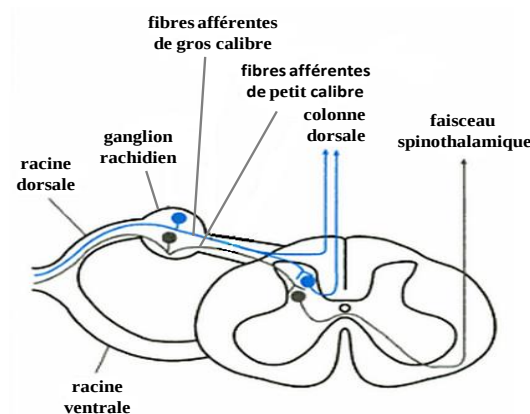


Figure 13 : Trajet des faisceaux ascendants spinothalamiques et des colonnes dorsales.

Plus exactement, quatre voies principales assurent la transmission des messages nerveux viscéraux au niveau supra-spinal. Les trois premières citées ci-après sont des voies spinothalamiques qui se distinguent en fonction des structures sur lesquelles se font le relais et la projection finale des faisceaux nerveux.

3.2.3.1 La voie spinothalamique (latérale)(figure 14)

Ce faisceau de transmission de l'information sensorielle implique des neurones secondaires des laminae I, IV et V. L'information sensorielle est relayée au niveau des noyaux ventro-postéro-latéraux et ventro-postéro-médians du thalamus avant d'être transmise vers les cortex. Les fibres sensorielles impliquées dans cette voie sont majoritairement de type A δ ou C, et favorisent l'évaluation de l'intensité de la douleur ainsi que de sa localisation (Giesler et al., 1979).

3.2.3.2 La voie spinoréticulaire (médiane) (figure 14)

Les fibres nerveuses spinales en provenance des laminae V-X de la moelle épinière projettent sur les noyaux de la formation réticulée du tronc cérébral qui intègrent cette information et la relaient au thalamus médian (Menétrey et al., 1984; Pezet et al., 1999). Ces faisceaux projettent au niveau du cerveau vers des structures impliquées dans les émotions et la mémoire, à savoir le cortex préfrontal et le système limbique. Cette voie serait donc responsable de la sensation désagréable de la douleur mais n'aurait pas de caractère sensori-discriminatif (Giesler et al., 1979; Peschanski and Besson, 1984).

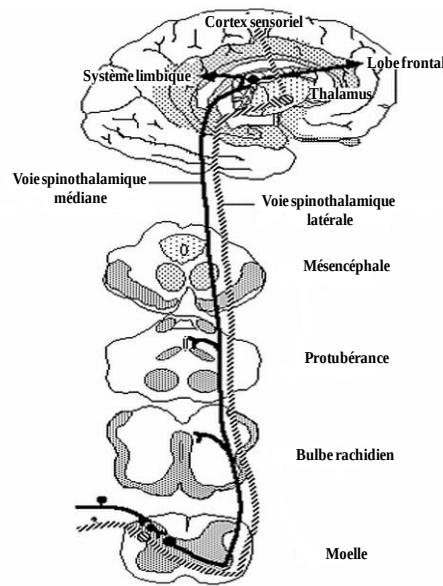


Figure 14 : Trajet des faisceaux spinothalamiques latéral et médian.

3.2.3.3 La voie spino-parabrachiale (figure 15)

La voie spinoparabrachiale fait intervenir des deutoneurones des couches I et II de la corne dorsale. Leurs projections s'établissent au niveau de l'aire parabrachiale, soit au niveau dorso-latéral du pont, soit au niveau du noyau parabrachial mésencéphalique.

Deux types de faisceaux ont ainsi été identifiés, le faisceau spino-parabrachio-amygdalien et le faisceau spino-parabrachio-hypothalamique qui projettent, respectivement, au niveau du noyau central de l'amygdale et au niveau du noyau ventromédian de l'hypothalamus. Les informations transmises sont d'origine viscérale et somatique. Cette voie de transmission est impliquée dans les composantes végétatives, endocriniennes et émotionnelles de la douleur (Bernard, 1999).

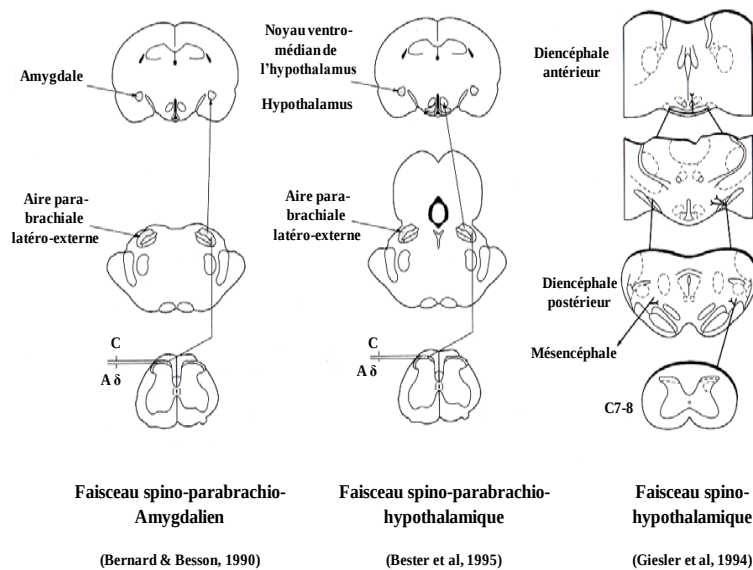


Figure 15 : Trajet des faisceaux spino-parabrachiaux.

3.2.3.4 La voie des colonnes dorsales

Ce faisceau permet la transmission de l'information sensorielle depuis les neurones secondaires spinaux des couches III, IV et X jusqu'au cortex par la voie des colonnes dorsales. Le relais de l'information sensorielle, après la moelle épinière, est réalisé au niveau du noyau gracile du bulbe ou des noyaux thalamiques.

L'importance de l'implication de cette voie dans les processus de douleurs viscérales a été mise en évidence tant d'un point de vue clinique qu'expérimental. Plusieurs études cliniques ont en effet démontré qu'une myélotomie limitée au niveau de la zone de la colonne dorsale permettait de réduire de manière importante la douleur de patients atteints de cancers abdomino-pelviens (Becker et al., 1999; Gildenberg and Hirshberg, 1984; Kim and Kwon, 2000; Nauta et al., 1997, 2000). De plus, une étude expérimentale, chez le singe, démontre que les neurones des noyaux ventraux posterolatéraux (VPL) du thalamus, qui sont activés suite à des stimulations nociceptives viscérales, sont majoritairement issus de la colonne dorsale (Al-Chaer et al., 1998). Chez le rat, l'activation des neurones des noyaux VPL suite à des stimulations nociceptives viscérales semble dépendante des voies spinothalamiques et des colonnes dorsales (Hirshberg et al., 1996). Enfin, une dernière étude menée chez le rat suggère l'implication du faisceau de la colonne dorsale comme potentialisateur des processus d'hypersensibilité viscérale dans des conditions pathologiques d'inflammation (Palecek and Willis, 2003).

3.2.4 Les contrôles inhibiteurs régulateurs de la nociception

Tout le long de son trajet, le message douloureux est soumis à des modulations facilitatrices (que nous n'évoquons pas ici) et inhibitrices. Bien plus que pour son rôle dans la transmission de l'influx nociceptif vers les centres supérieurs, la corne dorsale de la moelle épinière est déterminante pour son rôle dans les processus de modulation de l'intensité douloureuse. Plus précisément, cette modulation se fait notamment *via* (i) des contrôles inhibiteurs médullaires (ou contrôle segmentaires), (ii) des contrôles inhibiteurs descendants d'origine supra-spinale.

3.2.4.1 Le contrôle inhibiteur segmentaire

Les fibres A δ , C et A β envoient des projections sur des neurones à convergence mais aussi des collatérales vers les interneurons de la lamina II. Elles participent ainsi au contrôle de la balance activatrice / inhibitrice de la transmission nerveuse de l'influx douloureux au niveau spinal. Pour rendre compte de ce phénomène de contrôle, P. Wall et R. Melzack l'ont modélisé en 1965, c'est la théorie du portillon ou le « gate control » (Melzack and Wall, 1965) (figure 16).

Le rôle des interneurons inhibiteurs de la lamina II est fondamental dans ce schéma de modulation de la douleur. Lorsque les interneurons sont activés, ils libèrent de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) et de la glycine au niveau pré-synaptique des fibres nerveuses afférentes nociceptives et non nociceptives, en amont de la jonction qu'elles forment avec les neurones à convergence. C'est par ce biais que la modulation segmentaire s'exerce.

L'état d'activation des interneurons inhibiteurs dépend de l'activité des fibres nerveuses sensorielles. Lorsque les fibres A δ ou C sont stimulées, elles inhibent l'activité des interneurons inhibiteurs rendant possible l'ouverture de la porte du portillon et donc la transmission de l'information douloureuse. En revanche, les fibres A β activées stimulent l'activation des interneurons inhibiteurs, et, favorisent ainsi la fermeture de la porte du portillon.

Ainsi, au final, l'état d'activation du neurone à convergence dépend d'une balance entre l'état d'activation des fibres nociceptives et non nociceptives. Cette modulation segmentaire est aussi sous le contrôle de mécanismes inhibiteurs d'origine supra-médullaire.

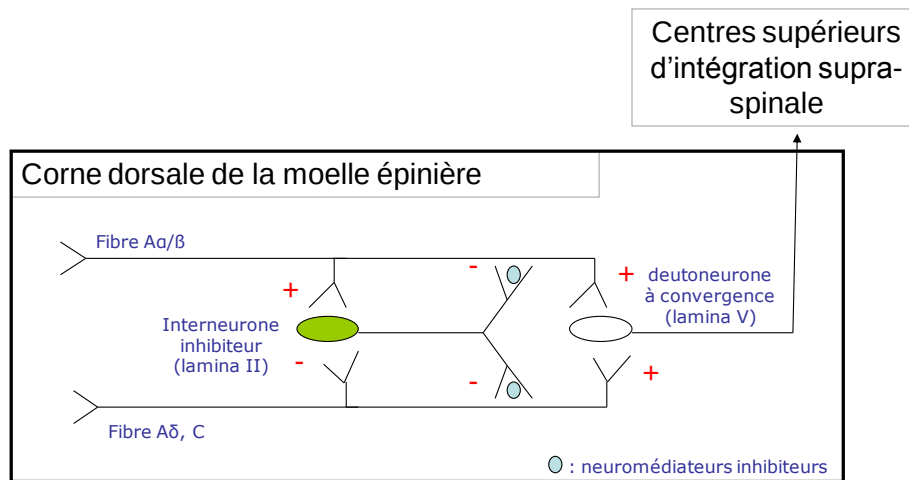


Figure 16 : Contrôle segmentaire spinal ou théorie du « gate control » (d'après (P. Wall et R.Melzack, 1965)).

3.2.4.2 Les voies inhibitrices descendantes

Les voies inhibitrices descendantes qui agissent au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière sont issues du tronc cérébral. Ces voies de contrôles descendantes sont sérotoninergiques, noradrénergiques et opioïdiques.

Bien que surtout décrites dans le cas des douleurs somatiques, des études expérimentales ont démontré l'implication de ces voies dans les processus de modulation des douleurs viscérales.

Plus précisément et schématiquement se distinguent:

- Les contrôles sérotoninergiques descendants sont médiés via une voie bulbo-spinale issue du noyau du raphé magnus (NRM) et certainement via une voie mésencéphalo-spinale à partir de la substance grise périaqueducale (SPGA). Ces contrôles inhibiteurs descendants agissent au niveau spinal en inhibant les neurones à convergence.
- Les voies noradrénergiques sont issues du locus subcoeruleus et du locus coeruleus. Une inhibition de la réponse viscéromotrice suite à des distensions colorectales est démontrée quand des stimulations électriques sont appliquées au niveau du locus coeruleus (Tsuruoka et al., 2005). Ces voies de contrôle agissent au niveau spinal via les neurones des laminae II et IV qui expriment les récepteurs α_2 -noradrénergiques (Bonnet and Vézinet, 1997).

3.3 Les caractéristiques cliniques et spécificités de la douleur viscérale

En dépit de caractéristiques communes, les douleurs viscérales et somatiques, en raison de leur neuro-anatomie distincte, ne sont pas équivalentes.

Les caractéristiques propres des douleurs viscérales sont (Cervero, 1988; Sikandar and Dickenson, 2012):

- d'être difficiles à localiser
- d'être référées à des structures somatiques,
- d'induire la sensibilisation de tissus somatiques et viscéraux,
- de produire des réponses motrices non spécifiques ou autonomes importantes, et
- d'être à l'origine de réponses affectives.

L'attribution de telles spécificités s'explique notamment par l'organisation structurelle de la transmission du message nociceptif viscéral vers la moelle épinière et par la quasi-absence de représentation somatotopique cérébrale des viscères au niveau des centres supérieurs.

De manière plus précise :

Tout d'abord, à l'inverse des douleurs somatiques qui sont bien localisées et ressenties rapidement après la stimulation, les douleurs viscérales sont diffuses et mal localisées. La perception de la douleur viscérale ou abdominale est en effet difficilement attribuable à un organe précis. Trois raisons majeures expliquent de telles différences :

- l'innervation sensitive somatique est beaucoup plus dense que l'innervation sensorielle viscérale,
- l'innervation sensorielle afférente viscérale est constituée en grande majorité (80 %) de fibres C amyéliniques, et
- l'existence du phénomène de convergence viscéro-viscérale, i.e. le fait que des neurones sensoriels spinaux reçoivent à la fois des informations sensorielles nociceptives d'un viscère mais aussi des influx nerveux sensoriels en provenance d'autres organes viscéraux, complique la localisation de la douleur. Les neurones lombo-sacrés notamment intègrent des stimuli en provenance du côlon, de la vessie et des organes génitaux.

Quant aux douleurs référées, douleurs d'origine viscérale projetées à d'autres zones du corps, elles sont la conséquence de phénomènes de convergence viscéro-somatique au niveau de la moelle épinière sur des neurones non spécifiques identiques. Ces phénomènes rendent ainsi encore plus complexe la discrimination spatiale de la douleur viscérale, même aiguë.

De plus, dès lors que la douleur viscérale perdure, la sensibilisation du système nociceptif au niveau central favorise l'irradiation somatique provoquée par la douleur viscérale ainsi que la sensibilisation des tissus somatiques (mais aussi viscéraux).

Deux mécanismes neurologiques majeurs seraient à l'origine de la projection de la douleur viscérale à des zones somatiques (peau et muscle) :

- des changements neuroplastiques, comme, notamment, l'augmentation de l'hyperexcitabilité neuronale apparaissent suite à la transmission soutenue de messages nociceptifs viscéraux vers la moelle épinière. Dès lors, l'effet d'une stimulation classique des afférences somatiques transmise, par exemple, sur un neurone à convergence viscéro-somatique déjà hyper-excité est augmenté, créant ainsi la douleur projetée à la zone somatique innervée.
- l'activation par les afférences viscérales des neurones spinaux de la moelle épinière favorise la mise en place d'arcs reflexes. La transmission d'un message nerveux vers les muscles favorise leur contraction, et crée ainsi aussi une sensibilisation des fibres sensorielles les innervant, favorisant donc le processus de douleur référée.

Enfin, ces phénomènes de convergence viscéro-viscérale mais aussi viscéro-somatique au niveau de la moelle épinière sont donc responsables de l'ensemble des réactions propres de la nociception viscérale. En effet, bien plus que l'activation du système nerveux sensoriel, les influx nerveux viscéraux nociceptifs entraînent aussi l'activation des systèmes moteur et autonome.

La description de cette partie dresse un inventaire des connaissances pertinentes et indispensables pour la compréhension de la neurophysiologie des douleurs viscérales.

La problématique des douleurs viscérales chroniques radio-induites ainsi que la complexité à définir des stratégies adaptées pour lutter contre les douleurs d'origine viscérale peuvent donc, désormais, être abordées.

4 LA DOULEUR VISCÉRALE RADIO-INDUITE CHRONIQUE ET LE MANQUE DE STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES ET EXPÉRIMENTALES ASSOCIÉES

La douleur viscérale chronique dont peuvent souffrir les patients traités pour un cancer, est un facteur prédominant dans la dégradation de leur qualité de vie. Elle s'accompagne de comorbidités psychiatriques comme l'anxiété, la dépression, et, dans les cas les plus graves elle peut entraîner le suicide de ces patients (Llorente et al., 2005). Dans ce contexte, la mise en place de stratégies thérapeutiques adaptées représente un enjeu important pour l'amélioration de la qualité de vie des « survivants au cancer ».

L'étiologie de ces douleurs est généralement multiple, elles peuvent résulter de douleurs : (i) existantes avant le cancer, liées par exemple à d'autres pathologies, (ii) provoquées par la présence de la tumeur, et enfin (iii) provoquées par les stratégies thérapeutiques mises en place pour lutter contre le cancer. Sur ce dernier point, les toxicités liées à chacune des stratégies thérapeutiques mises en place pour lutter contre la tumeur (chirurgie et/ou chimiothérapie et/ou la radiothérapie) sont à prendre en compte de manière additive ou même synergique dans la compréhension et la meilleure prise en charge de ce type de douleur (Burton and Hamid, 2007).

Dans ce cadre, un des objectifs de ce travail doctoral est d'étudier les douleurs viscérales chroniques liées aux effets des rayonnements ionisants sur les tissus sains de la zone abdomino-pelvienne, et, plus particulièrement du côlon.

Dans cette partie, un bilan des connaissances apportées par les études cliniques traitant des douleurs chroniques viscérales chez les « survivants au cancer » de la zone pelvienne est dans un premier temps proposé. Leurs étiologies radio-induites probables, la fréquence des patients affectés, l'intensité des douleurs et leurs caractéristiques sont entre autres détaillées. L'éventail des stratégies thérapeutiques à disposition des médecins pour lutter contre les douleurs est ensuite explicité. Des données concernant le traitement des douleurs viscérales sont présentées et discutées pour mettre notamment en avant leurs insuffisances et/ou leurs risques. Enfin, une brève description des modèles d'études développés pour l'étude des pathologies coliques douloureuses est proposée.

4.1 Les origines mécanistiques probables de la douleur chronique induite par les rayonnements ionisants

Dans la littérature, la physiopathologie des douleurs chroniques radio-induites est très peu décrite.

L'étiologie, classiquement attribuée aux douleurs chroniques est inflammatoire et/ou neuropathique. Ainsi, dans le contexte radio-induit, les connaissances actuelles concernant les origines inflammatoires et neuropathiques **probables** dans la mise en place et le maintien de tel processus douloureux sont ici présentées.

4.1.1 L'hypothèse d'une origine inflammatoire

Le maintien d'une inflammation radio-induite intestinale ou rectale à long terme chez les patients soumis à une radiothérapie est, à ma connaissance, peu évoqué dans les publications scientifiques.

En revanche, chez des patients traités pour différents types de cancers, l'apparition lors de la phase précoce de mucosites est souvent décrite (Avritscher et al., 2004; Keefe et al., 2007). Ces mucosites correspondent à « des inflammations douloureuses et à des ulcérations des membranes muqueuses » qui bordent le tractus gastro-intestinal. Ces douleurs et/ou processus inflammatoires (Harb et al., 2014; Theis et al., 2010) dans la phase aiguë pourraient favoriser l'apparition de douleur en chronique. En effet, il est admis qu'une douleur aiguë importante favorise l'apparition d'une douleur chronique chez les « survivants au cancer » (Burton and Hamid, 2007). De plus, l'inflammation pendant la phase aiguë, peut provoquer la mise en place d'une sensibilisation périphérique, entraînant à plus long terme une hypersensibilité douloureuse. Un tel phénomène peut notamment être observé chez des patients développant une pathologie IBS avec une hypersensibilité successivement à une infection bactérienne.

4.1.2 L'hypothèse d'une origine neuronale

Les dommages neuronaux au niveau du tractus gastro-intestinal, comme conséquence tardive des traitements par radiothérapie ont été décrits (Hirschowitz and Rode, 1991). Cependant, à ma connaissance, de telles altérations n'ont jamais été corrélées aux douleurs viscérales radio-induites.

En revanche, dans le cadre du traitement du cancer du sein par radiothérapie, une telle relation a déjà été mise en évidence dans différentes études (Fathers et al., 2002; Olsen et al., 1993). Les symptômes sensoriels décrits par ces « survivantes au cancer », à savoir, des sensations de brûlures mais aussi des troubles de la sensibilité tactile, ont en effet été corrélés à des modifications neuroplastiques (Stoll and Andrews, 1966; Westling et al., 1972). Dans ces études, les symptômes ont été observés dans l'année suivant le traitement (Stoll and Andrews, 1966; Westling et al., 1972). De plus, dans une autre étude, Father *et al.*, démontrent que l'apparition de douleurs, la diminution du contrôle moteur et le déficit sensoriel peuvent se manifester jusqu'à 20 ans après la fin du traitement par radiothérapie (Fathers et al., 2002). Dans un tel contexte, la relation étiologique est alors difficile à mettre en lien avec le traitement anti-tumoral (Burton and Hamid, 2007).

D'un point de vue mécanistique, la neuropathie observée chez ces patientes au niveau des plexus cervicaux et brachiaux pourrait s'expliquer au moins de deux façons. L'irradiation aurait tout d'abord un effet direct sur les fibres nerveuses en créant des dommages axonaux et une démyélinisation des fibres nerveuses. Mais, les rayonnements ionisants agiraient également de manière indirecte sur les fibres nerveuses. En effet, plusieurs années après la fin du traitement, des changements neuroplastiques irréversibles apparaissent progressivement. Une telle plasticité serait liée à l'écrasement des structures neuronales successif à la mise en place de la fibrose et aux dommages neuronaux occasionnés par l'ischémie tissulaire (Delanian et al., 2012; Fathers et al., 2002; Olsen et al., 1993; Stoll and Andrews, 1966; Westling et al., 1972).

Ces résultats obtenus dans le contexte du traitement du cancer du sein suggèrent que l'origine des douleurs viscérales radio-induites chroniques pourraient notamment être liée notamment aux processus inflammatoires et aux dommages neuronaux radio-induits au sein des tissus sains. Cependant, il semblerait aussi que l'apparition de ces douleurs viscérales soit corrélée à d'autres phénomènes biologiques. En effet, des fractures osseuses et un dysfonctionnement des organes viscéraux, observés après une radiothérapie, de manière tardive, sont susceptibles de jouer un rôle dans l'apparition de telles douleurs (Ogino et al., 2003; Small and Kachnic, 2005).

4.2 Les données épidémiologies

Dans cette sous-partie les données épidémiologiques concernant les patients qui ont survécu à un cancer de la zone pelvienne et qui sont en rémission sont précisées. L'objectif principal, malgré le peu de données à notre disposition est l'évaluation de la prévalence, de la sévérité et de l'impact de ces syndromes douloureux successifs aux traitements anticancéreux sur la qualité de vie des patients.

4.2.1 La Prévalence et la sévérité

4.2.1.1 Etudes cliniques concernant les patients ayant survécu à un cancer de la prostate

Les stratégies thérapeutiques, utilisant les rayonnements ionisants afin de traiter le cancer de la prostate, sont la curiethérapie et/ou la radiothérapie externe (cf. annexe 1).

D'une part, l'utilisation de la curiethérapie seule provoque l'apparition de dysuria, définie dans les études cliniques comme une sensation de brûlure à la miction, et ceci dans les semaines suivant l'implantation de la sonde radioactive chez ces patients (Arterbery et al., 1993; Kleinberg et al., 1994; Merrick et al., 2003). La moitié des patients de l'étude de Merrick *et al.*, était atteint de dysuria un mois après l'implant radioactif (Merrick et al., 2003). Chez ces patients, la fréquence de ce symptôme est relativement faible et sa sévérité décrite comme légère à sévère (Arterbery et al., 1993; Kleinberg et al., 1994; Merrick et al., 2003). Cependant, le nombre de patients atteint de dysuria diminue dans le temps. De tels symptômes disparaissent en effet au bout de quatre à six mois (Kleinberg et al., 1994).

D'autre part, Pettersson *et al.*, ont étudié la prévalence de l'apparition de douleurs urétrales chez des « survivants au cancer » de la prostate, depuis un an et jusqu'à quatorze ans après la fin de leur traitement. Cette étude a permis d'évaluer l'influence de plusieurs paramètres sur l'incidence de ces douleurs, à savoir (Pettersson et al., 2013) :

- le mode de traitement, i.e. la radiothérapie externe seule ou associée à une curiethérapie,
- l'importance de la dose délivrée et,
- l'importance du facteur temps, après la fin du traitement.

Trois ans après la fin du traitement 19% des hommes traités par radiothérapie externe et curiethérapie souffraient de brûlures urétrales ou de douleur à la mixtion contre 10% des patients ayant été soumis à la radiothérapie externe seule (10% étant le pourcentage de personnes souffrant de ce type de douleur dans la population Américaine). L'importance du choix du traitement et une relation entre fractionnement et incidence douloureuse sont ainsi mises en évidence à travers cette étude.

4.2.1.2 Les études cliniques concernant les patients ayant survécu à un cancer du côlon

Les études qui s'intéressent aux « survivants du cancer » du côlon sont évoquées dans cette sous-partie. L'attribution des douleurs ressenties par ces patients au traitement de leur cancer, et encore plus particulièrement aux effets de la radiothérapie externe, est difficile. Cependant ces études mettent en avant l'importance numérique et l'impact négatif considérable de ces douleurs chroniques chez ces « survivants au cancer ».

Phipps *et al.*, dans leur étude de 2008, se sont intéressés aux symptômes à long terme (au moins cinq ans après la fin du traitement) de ces « survivants au cancer ». Dans cette étude, 73% des patients ont subi un traitement par chimiothérapie et seulement 13% des patients ont été traités à la fois par chimiothérapie et radiothérapie. Parmi l'ensemble de ces patients 50% attribuent leurs symptômes à leur cancer et 30% disent souffrir de douleurs physiques. Ces douleurs, comme les problèmes liés aux dysfonctionnements sexuels sont les symptômes décrits par ces patients comme étant les plus sévères (Phipps *et al.*, 2008).

L'étude clinique de Lowery *et al.*, (étude sur la prévalence et le type de douleur) portait sur l'étude des douleurs chez les patients survivant au cancer du côlon sur une période s'étalant de un à dix ans après la fin de leur traitement. Les stratégies thérapeutiques qui ont été utilisées sont : (i) la chirurgie (1/3), (ii) la chirurgie couplée à la chimiothérapie (1/3) ou, (iii) la chirurgie couplée à la radiothérapie (1/3). Dans cette étude, 23% des « survivants au cancer » souffraient de douleurs (jambe, pieds, dos, pelvis, rectum, organes génitaux, bras, abdomen, cou). Parmi eux 39% les attribuaient soit à leur cancer soit à son traitement. Dans cette étude, l'utilisation d'un questionnaire a permis de mettre en avant que 50% des patients avec des symptômes douloureux décrivaient au moins une des caractéristiques des douleurs de type neuropathique. Il est cependant à noter que la très grande majorité de ces patients,

décrivant ou pas des sensations de douleur, utilisait un traitement anti-douleur (Lowery et al., 2013).

4.2.1.3 Récapitulatif pour les patients ayant survécu à un cancer de la zone pelvienne

Parmi les symptômes de la « pelvic radiation disease », Andreyev *et al.*, ont rapporté que 8 à 52% des patients ayant été traités pour des cancers de la zone pelvienne (cancers gynécologiques, recto/ anaux et urologiques) souffraient de douleurs diverses (abdominales, rectales, anales ou périanales) dès trois mois après la fin de leur traitement. L'incidence de ce symptôme sur la qualité de vie des patients a d'ailleurs aussi été évaluée (tableau 4) (Andreyev, 2007).

Tableau 4 : Fréquence des douleurs chez les patients ayant subi une radiothérapie pelvienne à partir de 3 mois après la fin de leur traitement pour différents types de cancers, et, impact de ces douleurs sur la qualité de vie des patients (d'après (Andreyev, 2007)).

	Douleur (abdominale, rectale, anale or périanales)	
	Fréquence (%)	Proportion des patients souffrant de douleurs affectant selon eux leur qualité de vie (%)
Cancers gynécologiques	34-52%	28-77%
Cancer rectal et anal	13-27%	0
Cancers urologiques	8-18%	10%

4.2.2 L'intérêt des études cliniques et leurs facteurs limitant

L'interprétation des études cliniques précédemment citées doit se faire avec beaucoup de précautions.

En effet, dans la majorité des études certains paramètres ne sont pas pris en compte et d'autres manquent de précision :

- les différents traitements anti-tumoraux ne sont pas toujours spécifiés ; et, lorsque c'est le cas, l'ensemble des données obtenues est fourni de manière « globale » sans corrélation avec le ou les co-traitements auxquels sont soumis les patients,
- les temps d'étude après la fin du traitement varient grandement (même au sein d'une même étude) et pourtant il semble que la douleur puisse être dépendante de ce paramètre,
- dans certains cas, seule l'étude d'un paramètre douloureux est considérée (par exemple la douleur à la mixtion) alors que les douleurs viscérales sont sourdes et diffuses. L'étude d'un seul paramètre ne semble ainsi pas suffisante pour retranscrire ce phénomène biologique, enfin,
- au moment de l'étude, les patients peuvent être sous traitements médicamenteux (exemple : antalgique, anti-inflammatoire, antidépresseur), et ce point n'est pas toujours mentionné alors qu'il est indispensable à l'interprétation des symptômes douloureux.

Ces différentes limites rendent l'interprétation et la comparaison des études difficiles.

Néanmoins, elles permettent malgré tout de rendre compte d'un certain nombre d'informations importantes :

- un lien semble exister entre le protocole de radiothérapie mis en place (type de radiothérapie i.e. brachythérapie ou radiothérapie externe, fractionnement) et la fréquence des patients développant des syndromes douloureux ainsi que l'intensité de ces douleurs,
- l'importance de l'utilisation de questionnaire qui permet de mettre en avant les caractéristiques de la douleur pour améliorer son traitement est mis en avant dans l'étude de Lowery *et al.*, 2013. Il est cependant regrettable qu'aucune corrélation ne soit donnée entre le type de douleur (neuropathique ou non) et le type de traitement(s) des patients considérés,
- enfin, si on considère d'une part, l'augmentation croissante du nombre de patients survivants au cancer, et, ceci, de plus en plus longtemps après la fin de leur

traitement ; et, le pourcentage de personnes souffrant de douleur dans ces études, un état de fait important est traduit: le nombre de patients, en valeur absolue, affecté par ces douleurs pathologiques est considérable. Ces études permettent de mettre en avant de manière efficace la nécessité d'une meilleure prise en charge de la douleur chez ces « survivants au cancer ».

Dans ce contexte, l'objectif est bien entendu de trouver une stratégie thérapeutique permettant la diminution de la douleur et ayant un minimum d'effets secondaires dans l'objectif d'améliorer la qualité de vie de ces patients.

4.3 Les stratégies thérapeutiques de lutte contre les douleurs viscérales chroniques

Les stratégies thérapeutiques qui visent à limiter les douleurs sont nombreuses et dépendent entre autre du type de douleur, de leur intensité, de leur étiologie, de l'état psychologique du patient.

Dans cette partie 4.3, les traitements anti-douleurs classiquement utilisés sont présentés de manière non exhaustive. L'objectif est d'envisager les différentes options dont disposent les algologues afin de maîtriser au mieux les douleurs viscérales chroniques. Dans l'élaboration de telles stratégies thérapeutiques plusieurs facteurs doivent être pris en considération. D'abord, les douleurs chroniques nécessitent une stratégie thérapeutique agissant au niveau du système nerveux central. Puis, certaines spécificités ayant trait à la physiopathologie et aux traitements des douleurs viscérales doivent être prises en compte.

4.3.1 Les traitements pharmaceutiques

Parmi les traitements médicamenteux, deux groupes se distinguent : les antalgiques ou analgésiques et les autres traitements médicamenteux.

4.3.1.1 Les antalgiques

Les antalgiques peuvent être utilisés dans le cas de douleur par excès de nociception mais sont faiblement ou nullement efficaces dans le cas de douleur neuropathique. L'organisation mondiale pour la santé (OMS) a défini trois paliers pour l'utilisation de ces médicaments qui

sont fonction de l'intensité de la douleur ressentie par les patients (tableau 5). Quel que soit le palier thérapeutique, l'utilisation de co-antalgiques est préconisée.

Tableau 5 : Echelle d'emploi des analgésiques selon l'intensité de la douleur évaluée chez les patients (palier de l'OMS).

Paliers thérapeutiques	1	2	3
Intensité de la douleur	Légère à modérée	Modérée à sévère	Sévère
Exemple d'antalgiques préconisés	Aspirine Paracétamol...	Opioides faibles : Codéine, Tramadol...	Opioides forts : Morphine, Oxycodone, Fentanyl...

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) comme l'aspirine et ses dérivés sont utilisés pour leur capacité à inhiber la synthèse de prostaglandine au niveau notamment de sites lésionnels enflammés.

Leur utilisation dans le cadre du traitement des douleurs viscérales peut s'avérer infructueux, voir néfaste pour les patients. En effet, la toxicité des AINS au niveau colique chez l'homme est connue, et, leur utilisation dans le cas de patients souffrant de syndromes intestinaux impose une grande précaution (Davies, 1995). Certains AINS, comme le célécoxib ou le rofécoxib, sont susceptibles en effet d'exacerber les IBD ou de les réactiver. De tels échecs thérapeutiques n'ont en revanche jamais été constatés lors de l'utilisation de ces molécules dans le cadre du traitement de douleur somatique (Bonner, 2001; Kaufmann and Taubin, 1987; Reinisch et al., 2003).

Les opioïdes peuvent agir au niveau du système nerveux central et/ou périphérique, et, suivant l'intensité douloureuse, différentes classes de molécules peuvent être utilisées.

Les effets secondaires majeurs des opioïdes (faibles et forts) sont la dépression respiratoire mais aussi la nausée, les vomissements et la constipation. Leur utilisation dans le cadre de pathologies viscérales engendrant des douleurs peut donc s'avérer complexe. Chez des

patients atteints d'IBD, l'utilisation de certains opioïdes a été associée à une plus forte morbidité et mortalité (Lichtenstein et al., 2006). De plus, chez un individu présentant une inflammation de la bordure du rectum ou « proctitis » qui souffrait de douleur rectale, suite à son traitement par radiothérapie, la prise d'opioïdes a aggravé la constipation et, finalement, la douleur de ce patient (Khosla et al., 2013) (figure 17).

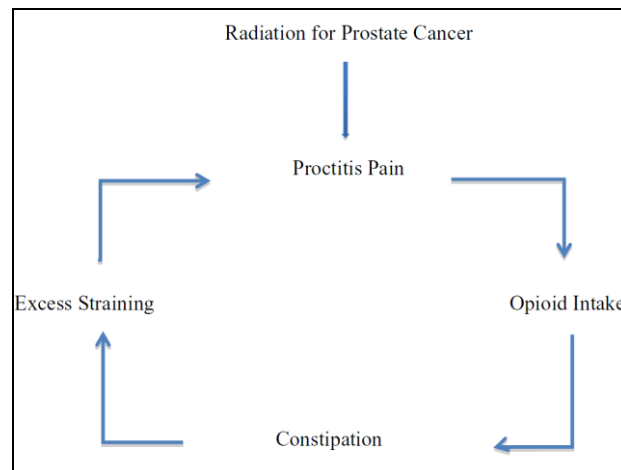


Figure 17 : Modèle traduisant l'augmentation de la sensation douloureuse, successivement à un traitement aux opiacés, chez un patient atteint de « proctitis » induite par son exposition pelvienne aux rayonnements ionisants (d'après (Khosla et al., 2013)).

Dans tout traitement thérapeutique, des effets secondaires sont attendus. Dans le cas du traitement des douleurs viscérales, les effets secondaires ayant trait au tractus digestif sont particulièrement néfastes et doivent être absolument minimisés.

4.3.1.2 Les autres traitements médicamenteux

Dans cette deuxième catégorie se trouvent des médicaments capables de moduler les douleurs neuropathiques : les antidépresseurs tricycliques et les antiépileptiques. L'utilisation d'antidépresseurs tricycliques (amitriptyline, imipramine, etc) permet de renforcer les contrôles inhibiteurs descendants en inhibant la recapture de la sérotonine et/ou de la noradrénaline. De nombreux effets secondaires peuvent exister mais dans notre cas, le plus problématique reste la constipation. Les antiépileptiques (carbamazépine, oxcarbazépine, gabapentine, prégabaline, etc) sont fréquemment utilisés pour le traitement des douleurs neuropathiques car ils diminuent l'activité ectopique des fibres nerveuses. Ce sont en effet des inhibiteurs de canaux sodiques ou des analogues du GABA. Enfin les anxiolytiques sont

utilisables dans le cas de douleurs chroniques, cependant leur utilisation ne doit pas excéder 2 à 3 mois et une évaluation psychopathologique du patient doit être effectuée au préalable.

4.3.2 Les traitements non-médicamenteux

Ces types de traitements sont invasifs et sont donc envisageables seulement lorsque les douleurs chroniques des patients sont résistantes aux antalgiques classiques.

4.3.2.1 La chirurgie

L'objectif est d'interrompre les voies de la nociception, et cela peut se faire à différents niveaux.

Au niveau médullaire, des cordotomies et myélotomies ont été pratiquées pour limiter les douleurs viscérales chroniques liées aux cancers abdomino-pelviens. Ces opérations chirurgicales, que ce soit les cordotomies bilatérales antérolatérales ou les myélotomies au niveau de la commissure (interruption des axones qui décussent) ont ainsi démontré leurs bénéfices. Néanmoins, elles restent accompagnées d'effets secondaires très dommageables pour les patients. En effet, des dysfonctionnements de la vessie, du tractus digestif ainsi que l'apparition de dysesthésies et de parésies ont entre autre été décrits. La sévérité de ces syndromes étant classiquement plus élevée successivement à la pratique de la première stratégie chirurgicale évoquée (Gybels and Sweet, 1989). D'autres études cliniques ont mis en avant la myélotomie limitée au niveau de la zone de la colonne dorsale pour son efficacité dans la réduction de la douleur et parce qu'elle semble provoquer moins d'effets secondaires que les précédentes (Becker et al., 1999; Gildenberg and Hirshberg, 1984; Kim and Kwon, 2000; Nauta et al., 1997, 2000).

D'autres techniques chirurgicales, pratiquées notamment au niveau du système nerveux périphérique S, visant à la destruction de ganglions nerveux périphériques (exemple : ganglion coélique, hypogastrique et impar ou coccygien) permettent de pallier aux douleurs pelviennes (Rigaud et al., 2010). Les effets secondaires de ces techniques sont relativement faibles en comparaison à ceux provoqués par les techniques de chirurgie agissant au niveau du SNC (Munir et al., 2004).

En amont d'une telle procédure, notamment en ce qui concerne la ganglion impar, un blocage test à l'aide d'anesthésique locaux parfois associées à des glucocorticoïdes, peut être pratiqué. Le réel bénéfice de la destruction du ganglion nerveux peut alors être apprécié. Dans certains cas ce blocage a d'ailleurs permis une diminution de la sensation douloureuse chez les patients jusqu'à 4 mois après la procédure (Agarwal-Kozlowski et al., 2009). De façon similaire, dans l'étude de Khosla *et al.*, le blocage du ganglion impar a permis une réduction de la douleur chez le patient atteint de « proctitis » suite à son traitement par radiothérapie. Ce patient a ainsi pu réduire sa prise d'opioïde, et donc sa constipation (Khosla et al., 2013). En revanche cet effet est certainement seulement transitoire.

4.3.2.2 La stimulation électrique

Ces techniques sont utilisées dans le cas de douleurs neuropathiques avérées. Ces stimulations sont réalisées à l'aide d'électrodes. Elles peuvent être transcutanées et localisées aux territoires douloureux créant à cet endroit de la paresthésie. Quand les douleurs neuropathiques sont sévères, les stimulations peuvent se faire au niveau médullaire ou au niveau des centres supérieurs. La stimulation spinale permet notamment la diminution des douleurs viscérales dans le cas de pancréatites (Kapural and Rakic, 2008 ; Kapural et al., 2011).

4.3.2.3 Les traitements alternatifs

Ils peuvent être utilisés avant la pharmacologie ou en complément d'autres techniques. Parmi ces techniques se trouvent la thermothérapie, la cryothérapie, l'acupuncture et l'hypnose.

Afin de fournir une meilleure stratégie thérapeutique palliant aux douleurs viscérales successives aux traitements des cancers par radiothérapie, la physiopathologie de cette douleur doit être mieux connue. Afin de répondre à cet objectif des modèles d'études pertinents et bien caractérisés sont nécessaires.

4.4 Les modèles d'étude des pathologies douloureuses coliques

Plusieurs modèles animaux ont favorisé la compréhension mécanistique des pathologies douloureuses coliques IBD et IBS et ont ainsi permis de tester expérimentalement des

stratégies thérapeutiques à visée analgésique. A notre connaissance, il n'existe, à ce jour, aucun modèle caractérisé d'étude de la douleur viscérale radio-induite. Bien que la physiopathologie des douleurs viscérales radio-induites doit différer de celles des IBD et des IBS, les modèles qui leurs sont associés représentent néanmoins un levier de pistes de réflexions primordial dans le cadre de mon travail de recherche et sont donc décrits dans cette partie.

Les IBD sont caractérisées par une inflammation intestinale chronique, des douleurs abdominales et une hypersensibilité douloureuse. Les facteurs à son origine seraient génétiques, immuns et environnementaux. Des modèles murins mimant les IBD à l'aide des composés chimiques ont pu être développés. L'utilisation notamment de TNBS (en association avec de l'éthanol) ou de DSS dans des conditions expérimentales adaptées permettent de mimer de telles pathologies (Elson et al., 1995). D'autres méthodes ont aussi été utilisées pour créer de tels modèles expérimentaux. C'est ainsi que des souris génétiquement modifiées ont notamment été créées. Les souris IL10^{-/-} sont ainsi souvent utilisées pour leur capacité à développer spontanément des entérocolites qui sont associées à une hypersensibilité viscérale, une augmentation de la perméabilité intestinale et à un processus diarrhéique (Bristol et al., 2000; Kühn et al., 1993).

Généralement les patients IBS ont une sensibilité accrue à la distension colorectale ou rectale et un seuil d'apparition de la sensation douloureuse plus bas que les personnes saines (Ritchie, 1973; Whitehead et al., 1990). Un abaissement du seuil est observé chez plus de la moitié des patients IBS-D (i.e d'IBS avec diarrhée) (Prior et al., 1990). L'augmentation de la perméabilité épithéliale paracellulaire ainsi que l'infiltration ou l'augmentation du nombre de cellules immunitaires (comme les MC) dans la muqueuse intestinale est associée à l'hypersensibilité colorectale à la distension (Barbara et al., 2004, 2007; Chadwick et al., 2002, 2002; Marshall et al., 2004; Spiller et al., 2000).

Des modèles qui permettent des agressions inflammatoires aiguës à l'aide de glycérol, d'acide acétique, d'huile de moutarde, et de zymosan ont été développés pour produire des modèles d'hypersensibilité viscérales aiguës. Cependant les IBS sont des maladies chroniques caractérisées par une absence de changements inflammatoires muqueux. D'autres modèles qui permettent de mimer certains des troubles fonctionnels de ces IBS ont donc été développés :

un modèle d'irritation colique chez le nouveau né (Al-Chaer et al., 2000), un modèle de sensibilisation au stress chez l'adulte (Stam et al., 2002), etc. Cependant, tous les aspects physiopathologiques et les traits pathogénétiques de la maladie humaine ne sont pas assez bien représentés dans ces modèles expérimentaux. Les événements arrivés précocement dans la vie semblent jouer un rôle dans les IBS (Lowman et al., 1987), d'où la création de modèles dits de déprivation (séparation des nouveau nés de leur mère) maternelle pour mimer ce type de pathologie (Barreau et al., 2004a; Coutinho et al., 2002; Rosztóczy et al., 2003).

4.5 Les enjeux sociétaux et scientifiques

Les douleurs chroniques viscérales successives aux traitements des cancers sont très invalidantes et, étant donné l'allongement de la vie des « survivants au cancer » elles touchent de plus en plus de patients.

Les stratégies analgésiques pour lutter contre les douleurs viscérales nécessitent d'être adaptées à la physiopathologie de ces douleurs. Elles ne peuvent pas seulement être calquées sur les thérapies utilisées pour traiter les douleurs somatiques, « dont les mécanismes cellulaires et moléculaires ont déjà été étudiés de manière beaucoup plus détaillée ».

Les douleurs viscérales des « survivants au cancer » sont multifactorielles. Néanmoins, le développement d'un modèle de douleur viscérale chronique induite par des radiations ionisantes est une première étape indispensable dans l'étude de ce type de douleur.

Les douleurs chroniques, nécessitent, de plus, de considérer les mécanismes de sensibilisation périphériques et centraux de maintien de ces douleurs. Dans le cadre de mon travail de thèse nous avons décidé de nous intéresser en premier lieu aux mécanismes périphériques de ces douleurs viscérales radio-induites.

La cinquième partie de mon manuscrit met ainsi en relation (i) certains mécanismes périphériques impliqués dans les douleurs viscérales et (ii) des données scientifiques obtenues dans le cadre d'irradiation du côlon. Elle permet, ainsi d'explicitier les orientations prises lors de nos études expérimentales.

5 LES MÉCANISMES PÉRIPHÉRIQUES DE L'HYPERSENSIBILITÉ VISCÉRALE

Les mécanismes périphériques impliqués dans la physiopathologie de la douleur viscérale chronique radio-induite n'ont jusqu'à présent jamais été étudiés. En revanche, ils ont largement été décrits dans le cadre des pathologies douloureuses coliques comme les IBD et les IBS. Ainsi, dans cette partie 5, certains mécanismes de la sensibilisation périphérique sont explicités, puis mis en relation avec les connaissances pertinentes acquises sur l'effet des rayonnements ionisants au niveau intestinal.

Deux axes majeurs concernant les processus de sensibilisation périphérique sont abordés :

- Tout d'abord, le rôle des MC et de leurs interactions avec les fibres nerveuses intestinales et afférentes au côlon sont décrits.
- Ensuite, l'impact de l'altération d'une fonction intestinale, comme la motricité, sur la sensibilité viscérale est considéré.

5.1 Les mastocytes et leurs interactions avec les fibres nerveuses

Les MC, que se soit en interaction directe avec les fibres nerveuses ou pas, jouent un rôle déterminant dans certaines fonctions physiologiques de l'organisme. De même, ils jouent un rôle essentiel dans les réponses immunitaires, dans certaines conditions pathologiques, comme dans le cas des réactions anaphylactiques et des réactions asthmatiques.

Au niveau intestinal, les MC régulent, entre autre, l'activité de perméabilité ainsi que l'activité de contractibilité musculaire. Dans des conditions non physiologiques, outre leur participation aux réactions inflammatoires intestinales, une augmentation de leur nombre, une modification de leur état d'activation et/ou une altération dans leurs interactions avec les fibres nerveuses modifient les fonctions intestinales (cf. partie 2.4).

Dans des conditions pathologiques, les MC et leurs interactions réciproques avec les fibres nerveuses intestinales sont impliqués notamment :

- dans les mécanismes de sensibilisation périphérique des maladies douloureuses coliques, et,
- dans les processus de mise en place de la fibrose radio-induite (Blirando et al., 2011; Gottwald et al., 1998; Malaviya et al., 1996; Zheng et al., 2000).

Cependant, à ce jour, aucun lien n'a jamais été établi entre les MC et leurs interactions avec les fibres nerveuses dans un contexte de douleur viscérale radio-induite.

Ces deux processus (i) et (ii) sont donc décrits successivement et précisément dans cette partie 5.1, après que les caractéristiques biologiques des MC et les liens qu'ils entretiennent avec les fibres nerveuses aient été explicités.

5.1.1 Notions générales sur les mastocytes et les fibres nerveuses

5.1.1.1 Caractérisation des mastocytes

Les MC, cellules de l'immunité innée, sont issus de précurseurs mastocytaires, provenant eux mêmes des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Ces précurseurs achèvent leur différenciation en cellules matures dans les tissus où ils sont amenés à résider.

Les MC sont présents au sein de nombreux tissus (poumon, peau, système nerveux, intestin) et constituent une population cellulaire hétérogène (Arizono et al., 1990; Pang et al., 1996). La diversité des MC se traduit d'un point de vue histologique, biochimique et fonctionnel. L'existence de différentes sous-populations mastocytaires est le résultat d'un processus de développement distinct de ces cellules, et dépend donc de leur localisation, des facteurs biologiques du milieu les environnant ainsi que des espèces considérées. Parmi les MC, une distinction est classiquement faite en fonction du type tissulaire où ils résident. Se distinguent ainsi les MC présents dans les muqueuses (les MC muqueux ou les « *mucosal mast cells* » (MMCs)) et ceux résidant au sein des tissus conjonctifs, (les MC conjonctifs ou les « *connective tissue-type mast cells* » (CTMCs)) (Kleij and Bienenstock, 2005).

5.1.1.2 Modalités de l'action biologique des mastocytes

Les MC sont capables de synthétiser et de libérer dans l'espace tissulaire différents types de molécules : des substances biologiques actives (histamine, sérotonine, protéases, NO), des cytokines (TNF α , LL4...), des chimiokines, des neurotrophines (NGF), des neuropeptides (SP) et des métabolites de l'acide arachidonique (prostaglandines et leukotriènes). Cette multiplicité de molécules susceptibles d'être libérées traduit la diversité de l'activité fonctionnelle de ces cellules. Certaines de ces molécules sont stockées dans des granules cytoplasmiques, c'est notamment le cas de l'histamine et de la tryptase. D'autres molécules sécrétées par les MC, plus particulièrement le NGF ou la SP sont présentes sous forme libre dans le cytoplasme de ces cellules (Church and Levi-Schaffer, 1997).

La fonctionnalité des MC dépend de leur état d'activation, lequel est directement lié à leur environnement. La transmission aux MC des informations en provenance du milieu extérieur peut se faire *via* les nombreux récepteurs membranaires présents à leur surface, comme le NK-1, le trkA... Parmi ces récepteurs membranaires, c'est plus particulièrement le récepteur de haute affinité des IgE (FcεRI) qui confère aux MC leur rôle dans le déclenchement des réactions allergiques. L'activation des récepteurs mastocytaires permet ainsi la dégranulation immédiate des substances présentes au sein de leurs granules cytoplasmiques et la synthèse d'autres types de médiateurs, comme des cytokines. Ces molécules nouvellement synthétisées sont libérées de façon différée dans le temps par rapport à l'activation des cellules (Church and Levi-Schaffer, 1997).

La tryptase, un des médiateurs mastocytaires majeurs, synthétisé par la quasi-totalité des sous-groupes de MC, est susceptible d'activer les cellules en clivant le récepteur aux protéines sérases PAR2. Ce récepteur PAR2 est exprimé par les neurones intrinsèques et extrinsèques du côlon, mais également par d'autres types de cellules : les cellules endothéliales, épithéliales, les entérocytes, les cellules musculaires lisses et les cellules immunitaires constitutives ou présentes au sein de l'intestin (Déry et al., 1998; Suckow and Caudle, 2008; Vergnolle, 2000).

5.1.1.3 Les mastocytes entretiennent un lien intime avec les fibres nerveuses

Comme décrit précédemment, l'activité fonctionnelle des MC dépend des molécules bioactives présentes dans leur environnement, de leur état d'activation, mais aussi des interactions intimes qu'ils entretiennent avec les fibres nerveuses.

Des interactions anatomiques entre les MC et les fibres nerveuses ont été mises en évidence il y a déjà de nombreuses années chez l'homme et chez le rat (Stead et al., 1987, 1989). Ces interactions anatomiques suggéraient déjà les bases anatomiques d'une communication potentielle entre ces deux types cellulaires.

La complémentarité biochimique entre les molécules biologiques sécrétées et les récepteurs exprimés par les MC et les fibres nerveuses favorisent de plus leur communication. En outre, la proximité des MC et des fibres peptidergiques exprimant la SP ou le CGRP a été mise en évidence chez l'homme et chez le rat (Pang et al., 1996; Stead et al., 1987; Wang et al., 2004). Ces résultats laissent supposer que cette communication humorale pourrait être

impliquée dans la communication des MC avec les fibres nerveuses (figure 18). Le récepteur du CGRP est notamment exprimé à la surface des MC. La SP et son récepteur NK1 sont eux aussi présents au niveau des terminaisons nerveuses des fibres afférentes, des neurones entériques et des cellules immunitaires comme les MC au niveau de l'intestin (Castagliuolo et al., 1997; Grady et al., 1996; Mantyh et al., 1996; Weinstock, 2004; Wershil et al., 1998). En effet, les MC et les fibres nerveuses peuvent sécréter des biomolécules et également exprimer aussi leurs récepteurs associés. Le NGF et son récepteur le trkA en sont d'ailleurs un autre exemple.

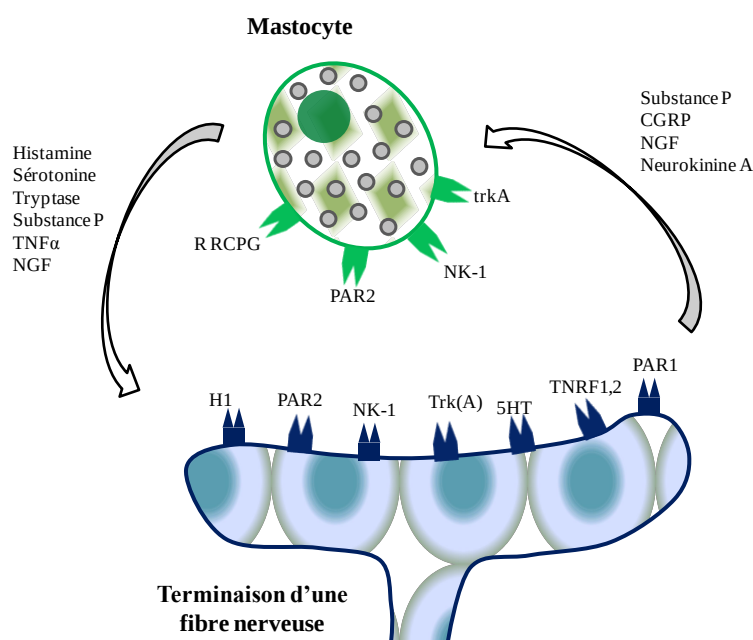


Figure 18 : Représentation non exhaustive des médiateurs biologiques et des récepteurs associés impliqués qui permettent la communication entre les MC et les fibres nerveuses (adapté de (Kleij and Bienenstock, 2005)). Les médiateurs inflammatoires permettent la communication entre ces deux types cellulaires, et cela, par l'intermédiaire ou non de récepteurs membranaires. Certains des récepteurs membranaires ne sont exprimés que dans des conditions inflammatoires alors que d'autres présents dans des conditions physiologiques sont eux surexprimés dans ces conditions pathologiques. CGRP : calcitonin gene-related peptide; RRCGP : récepteur au CGRP; NK-1 : récepteurs aux tachykinines de type 1 ; 5-HT : récepteurs à la sérotonine; H1 : récepteur à l'histamine ; PAR2 : Protease-Activated Receptor-2 ; PAR1 : Protease-Activated Receptor-1 ; TrkA : neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 ; TNRF : Tumor Necrosis Receptor Factor ; TNF α : Tumor Necrosi Factor alpha.

5.1.2 Implication dans les mécanismes périphériques de l'hypersensibilité viscérale

Les fonctions intestinales sont modulées par l'action des différents médiateurs mastocytaires qui activent des récepteurs présents à la surface de divers types de cellules intestinales. Dans des conditions pathologiques, ces mécanismes favorisent l'initiation et le maintien d'une sensibilisation périphérique qui sous-tend une hypersensibilité viscérale.

L'objectif de cette sous-partie 5.1.2 est de mettre en avant dans les mécanismes de la sensibilisation périphérique, l'implication des MC, de la tryptase, et, des interactions entre les MC et les fibres nerveuses.

5.1.2.1 Les pathologies douloureuses en clinique

Chez les patients atteints d'IBD ou d'IBS, l'implication des MC ainsi que leurs interactions avec les fibres nerveuses coliques participent largement aux mécanismes de sensibilisation périphérique sous-tendant l'hypersensibilité viscérale.

a) L'hyperplasie mastocytaire chez les patients atteints d'IBD et d'IBS

L'hyperplasie mastocytaire a déjà été montrée chez les patients souffrants d'IBD. Elle a été décrite notamment en 1987 pour des patients atteints de la CD (Bienenstock et al., 1987). Raithel *et al.*, ont aussi mis en évidence une augmentation du nombre de MC chez les patients souffrant d'IBD lors des phases d'inflammation aiguë (Raithel et al., 2001).

Bien qu'elle n'ait pas été décrite chez tous les patients et dans toutes les zones de l'intestin, une hyperplasie mastocytaire est fréquemment observée au niveau des muqueuses intestinales pour des patients atteints d'IBS (Chadwick et al., 2002; O'Sullivan et al., 2000). Il n'existe pas de consensus clair dans la littérature sur une possible corrélation entre l'hyperplasie des MC et les caractéristiques cliniques des patients IBS (Sohn W. et al 2012 ; Weston et al., 1993).

Cependant, l'étude de Park *et al.*, a tout de même permis d'établir un lien direct entre le seuil d'apparition de la douleur chez les patients IBS-D et le nombre de MMC dans les biopsies de ces patients, en comparaison avec des sujets sains, et ceci grâce à des études utilisant un barostat (Park et al., 2006). Les auteurs observent qu'une augmentation modérée du nombre de MMC correspond ainsi à une diminution du seuil d'apparition de la douleur chez les patients alors qu'une augmentation exacerbée de ces cellules se traduit par un seuil

plus haut. L'argument évoqué pour expliquer ce dernier phénomène est la désensibilisation des fibres nerveuses aux médiateurs mastocytaires.

b) Le rôle des interactions entre les MC et les fibres nerveuses dans l'hypersensibilité viscérale

Bien plus que l'hyperplasie mastocytaire, c'est l'augmentation du nombre d'interactions entre les MC et les fibres nerveuses, notamment de type peptidergique, qui semble être déterminante dans les mécanismes périphériques sous-tendant l'hypersensibilité viscérale.

En effet, dans les études de Barbara *et al.*, le seul facteur clinique corrélé à la sévérité et à la fréquence de la douleur abdominale des patients atteints d'IBS est l'augmentation du nombre d'interactions entre les MC et les fibres nerveuses (une telle interaction est caractérisée lorsque la distance entre ces deux types cellulaires est inférieure à 5 μm) (Barbara *et al.*, 2004; Di Nardo *et al.*, 2014). L'existence de cette relation est d'ailleurs indépendante de la caractérisation, dans les biopsies de patients IBS en comparaison aux biopsies de patients témoins, d'une hyperplasie mastocytaire (Barbara *et al.*, 2004; Di Nardo *et al.*, 2014).

Ensuite, l'implication de la SP et des fibres peptidergiques dans l'inflammation périphérique ainsi que dans la physiopathologie des syndromes inflammatoires et fonctionnels douloureux du tube digestif est largement décrite dans la littérature (Mantyh *et al.*, 1988, 1996; Pothoulakis *et al.*, 1998; Weinstock, 2004). De manière plus spécifique, l'implication l'hyperplasie des fibres nerveuses peptidergiques, décrite chez les patients atteints d'IBS, ainsi que des interactions réciproques entre ces fibres nerveuses et les MC dans les douleurs ressenties par ces patients est suggérée. Bien plus, chez ces patients les fibres nerveuses SP se situent à proximité des MC dans la sous-muqueuse et la muqueuse, formant même des clusters de fibres nerveuses les entourant (Pang *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2004).

c) La mise en évidence du rôle fonctionnel des MC dans l'hypersensibilité viscérale

Les résultats de l'étude de Barbara *et al.*, suggèrent déjà une implication de l'activité biologique fonctionnelle accrue des MC dans les symptômes des patients atteints d'IBS. En effet, les auteurs ont démontré une plus grande quantité de tryptase dans la muqueuse de ces patients que dans celles des témoins. Une telle hausse est d'ailleurs associée à une plus grande capacité de ces MC à libérer spontanément de la tryptase et de l'histamine *in vitro*, en comparaison à ceux des patients témoins (Barbara *et al.*, 2004).

Le rôle fonctionnel des MC dans les mécanismes de la sensibilisation périphérique est aussi démontré de manière très claire par les résultats cliniques obtenus suite à l'utilisation d'un stabilisateur mastocytaire et antagoniste des récepteurs H1 : le ketotifen. En effet, l'utilisation du kétotifen améliore les caractéristiques cliniques de certains patients atteints d'IBD et d'IBS (Klooker et al., 2010; Marshall and Irvine, 1998). De plus, Klooker *et al.*, ont démontré, pour des patients souffrant d'IBS et hypersensibles, que la prise de kétotifen permet d'augmenter la valeur seuil pour laquelle une sensation d'inconfort est ressentie par ces patients. Cet effet biologique a été obtenu alors même qu'aucune corrélation n'avait pu être démontrée entre le nombre de MC observé dans les biopsies de ces patients et leur perception douloureuse (Klooker et al., 2010). L'idée selon laquelle l'hyperplasie mastocytaire n'est pas le seul facteur prédominant dans les mécanismes de la sensibilisation périphérique est donc une fois de plus avancée.

Ces dernières études mettent en avant le rôle fonctionnel des MC dans les mécanismes périphériques de l'hypersensibilité viscérale. Bien plus que l'hyperplasie des MC ou des fibres nerveuses, ces travaux ont mis en évidence que ce sont leurs interactions avec les fibres nerveuses et/ou leur état d'activation qui représentent des phénomènes biologiques majeurs directement impliqués dans cette sensibilisation périphérique.

En outre, la proximité des MC avec les fibres nerveuses de type peptidergique suggère qu'un processus neuro-inflammatoire entretenu pourrait permettre une telle sensibilisation chez les patients atteints de syndromes intestinaux douloureux chroniques.

5.1.2.2 Les modèles murins d'hypersensibilité viscérale

Parallèlement à ces données cliniques, de nombreuses études expérimentales démontrent clairement de telles implications dans les mécanismes périphériques de l'hypersensibilité viscérale.

a) Exemple d'études menées avec les modèles de stress de déprivation maternelle chez le rat

Dans de tels modèles animaux mimant les pathologies IBS, une hypersensibilité à la distension colorectale a clairement été établie (cf. partie 4.4). Des modifications numériques et hypertrophiques des MC ainsi que l'exacerbation de leurs interactions avec les fibres

nerveuses sont, de même, clairement définies. L'implication de telles modifications biologiques dans les mécanismes de sensibilisation périphérique sous-tendant l'hypersensibilité est proposée par différents auteurs (Barreau et al., 2004a; Coutinho et al., 2002; Rosztóczy et al., 2003).

Plus précisément, dans ce contexte, une augmentation du nombre de MMC dès 4 semaines, et qui perdure 12 semaines après le stress, a été mise en évidence chez des animaux. De plus, la densité augmentée de ces MMC à 4 semaines suggère un état physiologique de ces cellules propice à la dégranulation. Une autre des conséquences de ce type de stress est l'apparition d'une hyperplasie des fibres nerveuses de la muqueuse colique, et ce, de manière tardive (jusqu'à 12 semaines). Indépendamment du temps d'étude considéré (4 ou 12 semaines), et donc, des modifications numériques et hypertrophiques précédemment citées, une augmentation des interactions entre les fibres nerveuses et les MMC a été observée. Ce phénomène pourrait d'ailleurs être au moins en partie dépendant du NGF. De plus, l'augmentation des interactions neuro-immunitaires impliquent les fibres peptidergiques exprimant le CGRP (Barreau et al., 2004a, 2008). Le rôle des MC et de leurs interactions avec les fibres nerveuses, notamment de type peptidergique, dans les mécanismes périphériques sous-tendant l'hypersensibilité viscérale dans ces modèles d'étude est ainsi, fortement suggéré.

b) La mise en évidence du rôle fonctionnel des MC dans l'hypersensibilité viscérale

Dans divers modèles d'hypersensibilité viscérale de rongeurs, l'emploi de stabilisateurs mastocytaires a permis de démontrer l'implication fonctionnelle des MC dans l'altération de la sensibilité viscérale.

Tout d'abord, l'utilisation dans les modèles de stress de déprivation maternelle d'un traitement au doxantrazole (stabilisateur des MC) permet d'éviter l'augmentation de l'hypersensibilité viscérale. Dans ce contexte, l'augmentation de la perméabilité épithéliale est aussi évitée. Or, un tel dysfonctionnement biologique est décrit comme étant associé aux processus d'hypersensibilité viscérale, notamment dans un modèle de stress aigu chez le rat (Barreau et al., 2004a, 2004b, 2008; Ait-Belgnaoui et al., 2005).

Par ailleurs, le potentiel antinociceptif des stabilisateurs mastocytaires a aussi été démontré dans d'autres modèles expérimentaux. L'utilisation préventive de kétotifen, permet de prévenir l'hyperplasie mastocytaire, notamment dans le cas d'une infection bactérienne

induisant des colites chez le rat (Serna et al., 2006). Bien plus, dans un modèle de stress aigu chez le rat n'entraînant pas d'hyperplasie mastocytaire, le doxantrazole permet de revenir à la courbe d'hypersensibilité douloureuse de celle d'un animal témoin (Gué et al., 1997). Dans ce modèle d'étude, l'augmentation de la concentration en médiateurs mastocytaires, comme l'histamine, au sein de la muqueuse colique en absence d'hyperplasie mastocytaire suggère un état d'activation biologique accru des MC (Gué et al., 1997). Le doxantrazole, en stabilisant ces MC, agirait alors sur la libération de médiateurs mastocytaires (histamine et/ou autres), impliqués dans l'hypersensibilité viscérale liée au stress.

De manière similaire à ce qui a été observé chez les patients, les MC jouent donc un rôle fonctionnel dans l'hypersensibilité viscérale étudiée dans les modèles expérimentaux chez l'animal, et ceci, indépendamment de l'augmentation de leur nombre. Ces études expérimentales confirment que l'état d'activation des MC et les interactions qu'ils entretiennent avec les fibres nerveuses, pouvant exprimer des neuropeptides, sont des facteurs cruciaux impliqués dans de tels mécanismes.

5.1.2.3 Mécanismes de l'inflammation neurogène

La contribution des MC et de leurs médiateurs dans les processus de neuro-inflammation et dans la sensibilisation des fibres nerveuses et des afférences spinales transmettant la douleur est reconnue (Bueno et al., 1997; Coelho et al., 2002; Van Diest et al., 2012). La sous partie 5.1.2.3 se propose ainsi dans un premier temps d'explicitier ce phénomène d'inflammation neurogène. Puis, en s'appuyant sur des études expérimentales, nous démontrerons que le phénomène d'inflammation neurogène semble être impliqué directement dans les mécanismes de sensibilisation périphérique sous-tendant l'hypersensibilité viscérale.

Plus précisément, le rôle de la tryptase et de la SP ainsi que de leurs récepteurs associés (PAR2 et NK1, respectivement) dans les processus de communication réciproque existant entre les MC et les fibres nerveuses sont ici décrits.

a) L'activation des fibres nerveuses par la tryptase via PAR2

La tryptase fait partie des divers médiateurs mastocytaires, à l'instar de la sérotonine et l'histamine mais aussi certaines cytokines comme le TNF, qui favorisent l'excitabilité ou l'activation des fibres nerveuses (Jiang et al., 2000; Nicol et al., 1997).

Le récepteur PAR2 est largement exprimé par les fibres nerveuses. En effet il est présent :
sur les fibres nerveuses intrinsèques intestinales, i.e. sur les neurones des plexus myentériques et sous muqueux, (Corvera et al., 1999; Suckow and Caudle, 2008), et,
sur les fibres nerveuses sensorielles afférentes à l'intestin qui possèdent leurs corps cellulaires au niveau des GRD, et, qui peuvent exprimer les neuropeptides que sont la SP et le CGRP (Steinhoff et al., 2000).

L'activation de différents types de fibres nerveuses par la tryptase est donc rendue possible par sa capacité à cliver le récepteur de PAR2 (Corvera et al., 1999; Steinhoff et al., 2000).

b) Le rôle de la tryptase dans la sensibilisation des fibres nerveuses suscitant l'hypersensibilité viscérale

L'utilisation de surnageants de biopsies de patients IBS dans des études expérimentales menées *in vitro* et *in vivo* favorise la compréhension de la physiopathologie de la douleur viscérale de tels patients. Des preuves, notamment, de l'implication de la tryptase et de l'activation de PAR2 dans la sensibilisation des fibres coliques intrinsèques et afférentes au côlon, de même que dans l'hypersensibilité viscérale ont en effet été ainsi apportées (Barbara et al., 2007; Cenac et al., 2007).

Tout d'abord, dans ces biopsies de patients IBS, en comparaison à celles de patients sains, la libération de tryptase (comme d'histamine et de trypsine) est augmentée (Barbara et al., 2007; Cenac et al., 2007). Le surnageant de ces biopsies, contrairement à celui de biopsies de témoins sains, favorise, *in vitro*, l'augmentation de l'excitabilité des neurones sensoriels et mésentériques de rats (Barbara et al., 2007; Cenac et al., 2007). La sensibilisation neuronale observée est d'ailleurs dépendante, au moins partiellement, de l'activation du récepteur PAR2 (Barbara et al., 2007; Cenac et al., 2007). La trypsine et/ou la tryptase sont donc directement responsables de cette sensibilisation. Cependant, l'excitation des neurones entériques par d'autres molécules bioactives présentes au sein de ces surnageants, comme par exemple l'histamine, ne peut être exclue (Frieling et al., 1995).

Ensuite, Cenac *et al.*, ont mis en évidence, après l'instillation intra-luminale colique de surnageant de patients IBS chez des souris sauvages, l'apparition d'une hypersensibilité viscérale, en réponse à des distensions colorectales. L'implication de l'activation du récepteur PAR2 dans ce processus est démontrée (Cenac et al., 2007). Dans cette étude, l'implication de l'activation d'autres types cellulaires, non neuronaux, comme par exemple les cellules

épithéliales qui expriment aussi le récepteur PAR2 et qui jouent un rôle dans ces processus pathologiques ne peut être exclue.

c) Les mécanismes moléculaires de cette neuro-inflammation

La mise en place d'un processus de neuro-inflammation auto-entretenu impliquant différents acteurs, tels que notamment la tryptase, la SP ainsi que leurs récepteurs respectifs, est directement impliquée dans la sensibilisation périphérique. En effet, l'activation du récepteur PAR2 joue un rôle direct dans l'hypersensibilité viscérale en favorisant l'augmentation de l'excitabilité neuronale, mais pas seulement (Figure 19).

Le phénomène d'inflammation neurogène a été très bien décrit par Steinhoff *et al.*,. De manière succincte, nous en présentons ici certains des principaux mécanismes. D'une part, l'activation de PAR2 présent sur les fibres nerveuses peptidergiques permet la libération de SP et de CGRP *via* un mécanisme dépendant du Ca^{2+} (Steinhoff et al., 2000). D'autre part, les neuromédiateurs, comme la SP, favorisent la dégranulation des mastocytes immatures ou de la muqueuse intestinale *in vitro* quand le récepteur NK1 est exprimé à leur surface membranaire (Shanahan et al., 1985 ; Van der Kleij et al., 2003).

Coelho *et al.*, ont démontré que l'hypersensibilité viscérale observée successivement à l'administration intra-luminale d'un agoniste de PAR-2 chez le rat était dépendante de l'activation du récepteur de la SP, le NK1, et ce, plutôt au niveau périphérique (Coelho et al., 2002). Bien plus que l'implication de l'activation de PAR2 dans les mécanismes de l'hypersensibilité viscérale, cette étude suggère ainsi le rôle de l'inflammation neurogène dans les mécanismes de sensibilisation périphérique.

La proximité des fibres nerveuses peptidergiques et des MC dans les pathologies douloureuses coliques ainsi que les mécanismes impliqués dans cette communication réciproque, favorisent l'auto-entretien de cette inflammation neurogène. De tels mécanismes impliquent la participation de molécules actives, dont certaines ont été évoquées ici, et qui jouent un rôle majeur dans les mécanismes périphériques sous-tendant une hypersensibilité viscérale qui persiste.

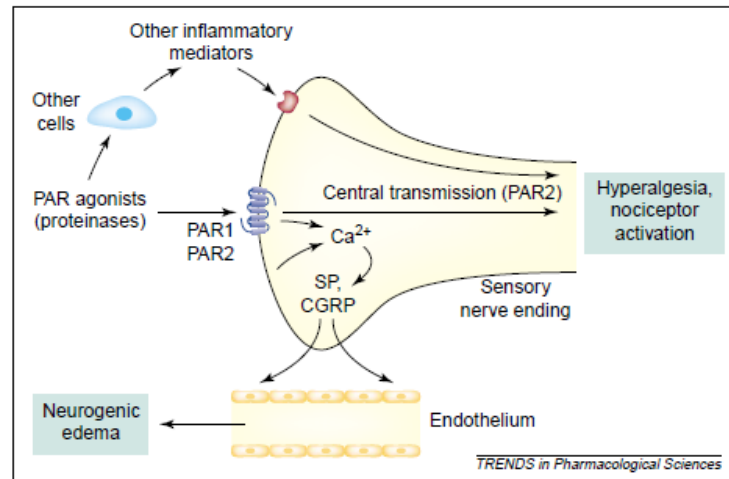


Figure 19 : Les récepteurs aux protéines sérases (PARs) sur les terminaisons des fibres nerveuses sensorielles. Leur activation suscite un flux intracellulaire de Ca^{2+} entraînant la libération par les fibres nerveuses de neuropeptides (SP et CGRP). Ils peuvent à leur tour interagir avec leurs récepteurs présents au niveau de l'endothélium, augmentant ainsi la perméabilité et la vasodilatation. L'activation de PAR2 sur les fibres sensorielles peut aussi entraîner l'activation des neurones nociceptifs spinaux et favoriser ainsi l'hypersensibilité. Une activation de PAR2 présent à la surface d'autres types cellulaires (cellules inflammatoires...) ne peut être exclue, amenant à la libération de médiateurs inflammatoires qui peuvent activer aussi les neurones nociceptifs (Vergnolle et al., 2001).

Pour soulager les douleurs viscérales, la stabilisation des MC ainsi que la modulation de la communication bidirectionnelle qu'ils entretiennent avec les fibres nerveuses représentent donc une des stratégies d'intérêt.

5.1.3 Implication dans les mécanismes de la fibrose intestinale radio-induite

Les MC, les fibres nerveuses ainsi que leurs interactions réciproques ont été étudiés suite à l'exposition de l'intestin aux rayonnements ionisants. Ces études ont surtout été menées afin de mieux comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans la réparation tissulaire radio-induite. L'objectif de cette partie 5.1.3 est de faire un bilan des connaissances pertinentes acquises grâce à ce type d'études.

5.1.3.1 Les patients soumis à une radiothérapie

Les effets biologiques observés au niveau intestinal sur les MC et les fibres nerveuses, chez des patients, successivement à leur exposition aux rayonnements ionisants sont peu décrits. Dans le contexte de mon projet de thèse, deux études complémentaires sont pourtant à souligner.

La première a été réalisée au laboratoire sur des résections de patients prélevés 5 à 7 semaines après leur traitement par radiothérapie (45 Gy par fraction de 2Gy, 5 jours par semaine) pour traiter des adénocarcinomes rectaux multiples. Dans cette étude, une augmentation du nombre de MC dans les zones lésées et irradiées, en comparaison aux zones contrôles i.e. éloignées de la tumeur et du champ d'irradiation a été observée. Plus précisément, cette hyperplasie mastocytaire, dans les zones lésées, est localisée au niveau de plusieurs compartiments rectaux : la muqueuse, la muscularis propria et la sous-muqueuse. De plus, le marquage immuno-histologique de la tryptase traduit un état activé de ces MC (Blirando et al., 2011). A notre connaissance, aucune donnée concernant le devenir des MC pour des temps plus tardifs (à l'échelle de l'année) après l'exposition du tractus digestif aux rayonnements ionisants n'est disponible. L'hyperplasie et l'activation mastocytaire décrites dans l'étude de Blirando *et al.*, pourraient alors s'avérer être seulement liées à des phénomènes transitoires chez les patients. Cependant, même dans ce cas, leur impact, à long terme sur la neuroplasticité intestinale et/ou sur la sensibilisation périphérique est envisageable.

La deuxième étude, de Hirschowitz et Rode, a permis de mettre en évidence des modifications neuroplastiques au niveau de l'intestin grêle et du côlon de patients souffrant d'entérite radique chronique successivement au traitement de leurs cancers (Hirschowitz and Rode, 1991). Cette neuroplasticité est caractérisée sur une période allant de 1 mois jusqu'à 16 ans après la fin du traitement de ces patients. Une hyperplasie des fibres nerveuses de la LP de modérée à sévère est mise en évidence pour 27 des 33 résections de patients examinées. Cette hyperplasie a été mise en évidence en comparant ces résections avec des résections de patients non soumis à un traitement utilisant des radiations ionisantes (Hirschowitz and Rode, 1991).

La plasticité mastocytaire et nerveuse intestinale ou rectale observée chez les patients ayant été soumis à une radiothérapie pourrait ainsi favoriser la mise en place d'une hypersensibilité viscérale radio-induite.

5.1.3.2 Les modèles animaux d'étude d'irradiation abdomino-pelvienne

a) Les modifications cellulaires et moléculaires

Après une irradiation intestinale, le devenir des acteurs cellulaires (MC, fibres nerveuses) et moléculaires (SP, CGRP, PAR2), décrits dans les parties précédentes, est précisé dans cette sous-partie.

Une étude menée au sein de notre laboratoire sur un modèle d'irradiation colorectale chez la souris à la dose de 27 Gy a permis d'observer une modification du nombre de MC après l'irradiation. Les variations de nombre observées dépendent à la fois du temps d'étude considéré après l'irradiation et des compartiments coliques examinés. En effet, 2 semaines après l'exposition aux rayonnements ionisants, une hyperplasie mastocytaire est observée entre la séreuse et le mésentère alors que le nombre de MMC est réduit, en comparaison avec les animaux contrôles (Blirando et al., 2011). Cette diminution du nombre de MMC, pour un temps relativement court après l'irradiation peut être attribué à leur radiosensibilité (Sedgwick et al., 1990). En revanche, 12 semaines après l'irradiation, une hyperplasie mastocytaire est décrite dans l'ensemble des compartiments coliques observés, à savoir, la muqueuse, muscularis mucosae, la sous-muqueuse et la séreuse (Blirando et al., 2011).

Ensuite, l'expression et l'activation du récepteur PAR2 ont été étudiées dans un autre modèle d'irradiation développé par l'équipe d'Hauer-Jensen chez le rat (Wang et al., 2003). Dans ce modèle, l'ablation des testicules du rat est réalisée afin d'immobiliser dans leur scrotum un segment de l'intestin grêle qui peut ensuite être irradié plusieurs fois (dans un délai de 3 semaines) (Hauer-Jensen et al., 1988). Wang *et al.*, en utilisant ce modèle, ont démontré une augmentation de l'expression de PAR2 et de son activation au niveau du segment intestinal irradié (Wang et al., 2003).

Enfin, une hausse des transcrits de la SP et du CGRP a été mise en évidence dans le modèle précédemment décrit (2 semaines après irradiation) au niveau des zones irradiées, et ce, en comparaison à des zones non irradiées (Wang et al., 2006a). De plus, Picard *et al.*, ont aussi démontré une augmentation significative de la quantité de CGRP dans la muqueuse intestinale le jour suivant une irradiation abdominale de 10 Gy chez le rat (Picard et al., 2001a).

L'irradiation intestinale favorise donc l'augmentation du nombre de MC, l'expression et l'activation de PAR2, et, l'expression de substances algogènes (SP et CGRP). Or, l'ensemble de ces acteurs est impliqué dans les mécanismes périphériques de l'hypersensibilité viscérale.

A ce titre, le rôle de telles molécules dans le contexte de l'étude des mécanismes de l'hypersensibilité colique radio-induite mériterait d'être précisé.

b) Rôle dans la physiopathologie des lésions radio-induites

Jusqu'alors, l'implication des divers acteurs précédemment décrits et, les interactions entre les MC et les fibres nerveuses ont été étudiées uniquement dans la mise en place de la fibrose radio-induite. Cela fait plus particulièrement l'objet de cette sous-partie.

Tout d'abord, le rôle fonctionnel des mastocytes dans la physiopathologie des lésions intestinales radio-induites est mis en évidence dans des études utilisant des rongeurs déficients en MC.

Zheng *et al.*, ont mis en évidence l'implication des MC dans les lésions intestinales radio-induites en utilisant le modèle de rat développé par l'équipe de Hauer-Jensen en 1988. La comparaison des lésions obtenues après irradiation des rats sauvages et de rats déficients en MC a démontré un effet bénéfique des MC sur la réparation des lésions épithéliales précoces, et ce, 2 semaines après irradiation. En revanche, dans ce même modèle la présence de MC produit un effet délétère sur la formation des lésions fibrotiques plus tardives, 26 semaines après irradiation (Zheng *et al.*, 2000).

Blirando *et al.*, ont, quant à eux, démontré dans le cas d'une irradiation colorectale de 27 Gy chez la souris, en comparant des souris sauvages et déficientes en MC, un rôle délétère des MC sur les lésions colorectales aiguës (2 semaines après l'irradiation) et chroniques (12 semaines après l'irradiation) (Blirando *et al.*, 2011).

Le résultat divergeant, obtenu 2 semaines après l'exposition aux rayonnements ionisants, est certainement assujettie aux choix des conditions expérimentales des deux études (i.e. le type de rongeur, le type d'irradiation et la zone intestinale considérée). Quoiqu'il en soit, ces résultats attestent de l'importance du rôle physiopathologique des MC dans la mise en place des lésions radio-induites.

De plus, l'équipe d'Hauer-Jensen a mis aussi en évidence, dans des modèles d'entéropathie radique, le rôle des médiateurs mastocytaires et du PAR2 dans l'établissement physiopathologique des lésions radio-induites.

Tout d'abord, l'injection répétée d'agonistes de PAR2 augmente la sévérité des lésions au niveau de l'épithélium, de la musculuse et de la séreuse d'animaux irradiés depuis 2 semaines, en comparaison aux lésions des animaux qui ont été seulement irradiés (Wang et al., 2010). En association avec les études précédentes, ces résultats suggèrent une implication des médiateurs des MC pouvant cliver le PAR2, donc de la tryptase, dans le degré de sévérité des lésions intestinales radio-induites observées.

De plus Wang *et al.*, ont tout d'abord démontré que la hausse de l'expression de PAR2 après irradiation intestinale était moindre chez les animaux déficients en MC (Wang et al., 2003). Or, dans la littérature il est décrit que l'instillation intra-luminale de trypsine, capable comme la tryptase de cliver le PAR2, favorise son activation et son expression cellulaire ainsi que les processus inflammatoires chez la souris sauvage (Cenac et al., 2002). Les résultats obtenus par Wang *et al.*, en 2003 suggèrent donc que les médiateurs mastocytaires, comme la tryptase, pourraient jouer un rôle fondamental dans la surexpression de PAR2 ; et, avoir en partie *via* ce mécanisme, une incidence sur la sévérité des lésions radio-induites.

Enfin, des protocoles expérimentaux ont été mis en place pour évaluer le rôle relatif, à la fois des fibres nerveuses afférentes à l'intestin, et, de leurs interactions avec les MC dans les processus de cicatrisation pathologique radio-induits. Dans ces protocoles expérimentaux, les fibres nerveuses afférentes TRPV1+ sont lésées à la capsaïcine avant que l'irradiation ne soit réalisée, pour des rats sauvages ainsi que pour des rats déficients en MC.

Picard *et al.*, ont pu démontrer, dans les jours suivant une irradiation abdominale de 10 Gy chez des rats sauvages non lésés et lésés à la capsaïcine, des lésions radio-induites identiques d'un point de vue structurel. Ces dénervations n'ont eu aucune incidence sur le nombre de MC quantifiés 1 et 3 jours après irradiation. Cette étude souligne, en revanche, le rôle protecteur de ces fibres nerveuses dans les processus d'inflammation dans les jours suivant l'irradiation. En effet, chez les animaux lésés, une augmentation de l'activité myéloperoxydase (MPO) apparaît le jour suivant l'irradiation alors que chez les animaux non lésés ce phénomène intervient seulement 3 jours après l'irradiation. De plus, 1 jour après l'irradiation, la quantité de CGRP dans la muqueuse intestinale est diminuée chez les animaux lésés par rapport aux animaux non lésés (Picard et al., 2001a). Or, des études, menées dans des modèles de colite induite au TNBS chez le lapin et le rat, ont démontré le rôle protecteur des fibres

nerveuses sensorielles qui libèrent de la CGRP (ce qui n'est pas le cas de la SP) (Reinshagen et al., 1994, 1996, 1998).

L'ablation des fibres nerveuses, dans le modèle d'irradiation scrotalisé de l'intestin, a aussi un effet néfaste sur les radiolésions 2 semaines après irradiation mais pas réellement 26 semaines après l'exposition, en comparaison aux lésions intestinales observées chez des animaux seulement irradiés. Or, la dénervation des fibres nerveuses afférentes chez les animaux irradiés se traduit par : (i) une diminution des MCM (effet statistiquement significatif uniquement 2 semaines après l'irradiation), (ii) une diminution des transcrits SP et CGRP, et (iii) l'absence de modification du nombre de MCTM (qui est augmenté après irradiation). Une corrélation peut être faite entre l'ablation des fibres nerveuses, la diminution des MCM et l'effet délétère des radiolésions 2 semaines après irradiation (Wang et al., 2006b). Wang et al., ont expérimenté le même protocole avec des rats déficients en MC et ont démontré que la détérioration des lésions 2 semaines après irradiation est en effet partiellement liée à une modification des interactions entre les MC et les fibres nerveuses afférentes (Wang et al., 2006b) .

Une fois de plus, le rôle des MC, des fibres nerveuses, ainsi que de leurs interactions sont précisés dans un processus pathologique, en l'occurrence l'établissement des lésions radio-induites intestinales. De telles modifications physiopathologiques, dans ce contexte, sont susceptibles d'être impliquées dans d'autres processus, et notamment au sein des mécanismes périphériques de l'hypersensibilité viscérale radio-induite.

Les modifications inflammatoires, nerveuses ainsi que l'altération de la communication entre les cellules immunitaires et inflammatoires impactent les fonctions intestinales (cf. partie 2).

Par ces biais, entre autre, l'irradiation de la zone abdomino-pelvienne modifie les fonctions intestinales. Or, ces altérations fonctionnelles sont notamment étiologiquement responsables des douleurs émanant des organes viscéraux. La partie 5.2 évoque brièvement ces considérations.

5.2 L'altération de la motricité intestinale

L'impact de l'altération de la motricité intestinale sur l'apparition de douleurs abdominales est le sujet traité dans cette partie. Plus précisément, nous précisons le rôle physiologique des contractions migratoires géantes (GMCs) qui peuvent, dans des conditions biologiques particulières devenir des stimuli nociceptifs suscitant une douleur. Puis, les données utiles permettant de valider le choix de l'étude de ces paramètres dans un contexte radio-induit sont abordées.

5.2.1 Notions générales sur les contractions migratoires géantes

La fonction de contractibilité et de motilité intestinale est décrite dans la partie 2.4.3. Les contractions migratoires géantes (GMCs) sont des contractions d'amplitude importante et de longues durées qui apparaissent spontanément chez les sujets sains environ 4,4 fois par jour (Narducci et al., 1987). Elles permettent la propulsion de volumes importants de contenu luminal (Sethi and Sarna, 1995). Les afférences mécano-sensorielles intestinales sont stimulées par ces GMCs. En effet, lors d'une GMC, une compression luminale de la paroi intestinale et une distension du segment intestinal distal recevant le contenu luminal sont observées (Sarna, 2007).

Sarna *et al.*, dans leurs études expérimentales, menées chez le chien, ont démontré que les GMCs stimulent : (i) les afférences sensorielles et, (ii) la mise en place d'un contrôle inhibiteur descendant, dépendant du NO qui permet la relaxation musculaire au niveau distal de telle sorte que, chez un sujet sain, le seuil de stimulation nociceptif des mécanorécepteurs ne soit pas dépassé. Ainsi, les GMCs, dans des conditions physiologiques, ne provoquent donc pas de sensation douloureuse (Sarna, 2007).

5.2.2 Implication dans les mécanismes périphériques de l'hypersensibilité viscérale

5.2.2.1 L'altération de la motricité intestinale comme étiologie de la douleur viscérale

Chez les patients atteints d'IBS et d'IBD, l'hypersensibilité viscérale est un facteur qui contribue aux crampes abdominales intermittentes dont souffrent ces patients. Toutefois, ce phénomène à lui seul n'explique pas le caractère intermittent des crampes abdominales

ressenties par ces patients. Une corrélation entre la présence et l'augmentation de la fréquence des GMCs intestinales et des douleurs abdominales ressenties par ces patients a été mise en évidence dans différentes études cliniques (Annese et al., 1997; Chey et al., 2001; Clemens et al., 2003; Kellow and Phillips, 1987).

Dans des conditions pour lesquelles les neurones afférents entériques ou du SNC sont sensibilisés et/ou lorsque l'inhibition descendante intestinale est altérée Sarna *et al.*, suggèrent d'ailleurs que les GMCs pourraient devenir des stimuli nociceptifs (Sarna, 2007). Le caractère intermittent des crampes abdominales chez les patients atteints d'IBS et d'IBD pourrait ainsi s'expliquer.

5.2.3 Observations dans le contexte de l'irradiation intestinale

Les patients qui ont subi des radiothérapies de la zone abdomino-pelvienne peuvent souffrir d'épisodes de diarrhées et/ou de constipations à court terme (phase aiguë) mais aussi à long terme (phase tardive). Ces complications sont attribuées à une altération de l'épithélium, de la fonction de sécrétion et de la motilité au niveau intestinal.

Des études expérimentales signalent une modification de la contractibilité et de la motilité intestinale successivement à une exposition du tractus abdominal aux rayonnements ionisants dans des modèles animaux distincts (Esposito et al., 1996; Otterson et al., 1988, 1992; Picard et al., 2001b). Otterson *et al.*, ont notamment démontré, suite à des irradiations fractionnées au niveau abdominal chez le chien, une augmentation de la fréquence d'apparition des GMCs au niveau intestinal et une altération de la capacité contractile du côlon. L'incidence d'apparition de GMCs rétrogrades était également augmentée après irradiation (Otterson et al., 1988, 1992). Les auteurs suggèrent clairement que les symptômes (diarrhée, crampes abdominales, vomissements) observés après une exposition intestinale aux rayonnements ionisants étaient liés notamment à ces GMCs.

Bien que ces études aient été réalisées pour des temps relativement courts après irradiation, elles renseignent malgré tout sur l'altération motrice du côlon, qui peut donc être impliquée dans les processus douloureux.

Ainsi, la « pelvic radiation disease » est une pathologie multi-organes, affectant notamment les fonctions intestinales et instiguant des processus inflammatoires et des modifications

neuroplastiques. L'étiologie des douleurs viscérales radio-induites est certainement le résultat de l'ensemble de ces modifications biologiques. L'utilisation de la thérapie cellulaire utilisant les CSM paraît totalement adaptée dans ce contexte. En effet, les CSM permettent une action polyvalente, multi-spatiale et adaptable au contexte physiopathologique, comme cela est explicité dans la partie 6 de ce manuscrit de thèse.

6 VERS L'UTILISATION DES CSM POUR MODULER L'HYPERSENSIBILITÉ VISCÉRALE CHRONIQUE RADIO-INDUITE ?

Alors qu'un grand nombre de stratégies thérapeutiques vise seulement au contrôle des symptômes et nécessite une utilisation chronique, l'objectif de la thérapie cellulaire ou médecine régénérative est d'induire chez les patients un processus de guérison.

Les CSM font partie des cellules souches adultes déjà largement utilisées en thérapie cellulaire, et ceci pour différentes raisons. Tout d'abord, à l'inverse des cellules souches embryonnaires, aucune controverse éthique n'est suscitée autour de leur utilisation. Ensuite, leur application en clinique est favorisée par leurs propriétés biologiques. Elles sont en effet faciles à isoler ainsi qu'à amplifier *in vitro*, et possèdent également des propriétés immuno-modulatrices. Enfin, le bénéfice thérapeutique de leur utilisation dans les processus de régénération et de modulation de l'inflammation a déjà été largement démontré dans diverses pathologies chez l'homme et dans des modèles animaux.

Dans cette partie les arguments qui permettent d'envisager l'utilisation des CSM afin de moduler les douleurs viscérales radio-induites sont soulignés.

Pour ce faire, le contexte ainsi que les enjeux de la thérapie cellulaire sont tout d'abord définis, puis les propriétés générales des cellules souches sont analysées. L'utilisation en thérapie cellulaire de différents types de cellules est par la suite discutée. Les avantages de l'utilisation des CSM par rapport à d'autres types cellulaires sont ainsi mis en évidence. Pour conclure, les arguments en faveur de l'utilisation des CSM pour moduler la douleur viscérale radio-induite chronique sont précisés. La capacité des CSM à moduler les dommages tissulaires, l'inflammation et les changements neuroplastiques radio-induits intestinaux est ainsi d'abord développée. Puis, leur utilisation en tant qu'agents antinociceptifs dans le contexte de la modulation des douleurs d'origine somatique est finalement précisée.

6.1 La thérapie cellulaire ou médecine régénérative

6.1.1 Le principe et les objectifs de la thérapie cellulaire

L'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) définit la thérapie cellulaire et les produits de sa pratique ainsi : « à l'exception des produits sanguins labiles, sont des produits cellulaires à finalité thérapeutique les cellules humaines utilisées à des fins thérapeutiques... quel que soit leur niveau de transformation, y compris leurs dérivés » (Source site de l'ANSM : http://ansm.sante.fr/Glossaire/%28filter%29/T#term_1990/).

L'objectif de la thérapie cellulaire en clinique est donc d'utiliser les propriétés biologiques de certains types cellulaires pour favoriser la réparation de tissus lésés et la restauration des fonctions d'un organe altéré. La mise en place d'une telle stratégie permet de prévenir, limiter ou traiter les dommages créés par une pathologie, le vieillissement ou qui apparaissent successivement à un accident.

6.1.2 Les différents types de greffes cellulaires

De la même manière que pour les greffes d'organes ou de tissus, la distinction est faite entre les greffes de cellules autologues, allogéniques et xénogéniques.

Une greffe de cellules autologues implique que le patient qui donne ses cellules et celui qui les reçoit sont une seule et même personne.

Dans le cas d'une greffe de cellules allogéniques, le patient receveur reçoit les cellules d'un individu qui appartient à la même espèce que lui, mais dont le patrimoine génétique est distinct du sien.

Enfin, lors d'une greffe de cellules xénogéniques, les individus donneurs et receveurs n'appartiennent pas à la même espèce.

6.1.3 Le choix du type de cellules : cellules souches versus cellules différenciées

Les cellules utilisées en médecine régénérative sont des cellules souches ou des cellules déjà différenciées et fonctionnelles. En thérapie cellulaire, un nombre très élevé de cellules à injecter est nécessaire, et ceci indépendamment du type cellulaire transplanté. Lors de ce type

de procédure, jusqu'à plusieurs millions de cellules par kilogramme d'individu peuvent en effet être utilisées (Vantghem et al., 2009; Voswinkel et al., 2013).

De manière générale, l'amplification des cellules différenciées en culture est souvent délicate. Leur utilisation en thérapie cellulaire nécessite ainsi un prélèvement invasif, néfaste pour l'organe du donneur. De plus, ce type de procédure, utilisant des cellules différenciées fonctionnelles, nécessite généralement le recours à l'allogreffe. La nécessité de la mise en place d'un traitement immunosuppresseur lourd pour ces patients afin d'éviter le rejet des cellules injectées est alors inévitable (Vantghem et al., 2009).

L'utilisation de cellules souches, au regard des difficultés inhérentes à l'emploi des cellules différenciées, en médecine régénérative, est ainsi privilégiée. Bien plus, elles possèdent de nombreux avantages dans le cadre d'une utilisation en clinique, et un large panel de propriétés biologiques intéressantes dans le cadre d'applications thérapeutiques multiples (cf. partie 6.2).

6.2 Les cellules souches et leur utilisation en thérapie cellulaire

Les cellules souches et plus particulièrement les CSM, pour diverses raisons évoquées dans cette partie représentent de bons candidats pour un emploi en thérapie cellulaire.

6.2.1 Les notions générales sur les cellules souches et leur rôle physiologique

Les cellules souches sont des cellules immatures, définies sur la base de deux critères fondamentaux : leur capacité d'auto-renouvellement i.e. à se multiplier à l'identique à long terme (théoriquement à l'infini en culture) et leur aptitude à se différencier en cellules spécialisées et fonctionnelles (Smith, 2006).

Une distinction est classiquement faite entre les cellules souches d'origine embryonnaire et les cellules souches dites « adultes ».

Les cellules souches embryonnaires sont vouées à disparaître au cours du développement, après avoir proliféré et s'être différenciées de manière hautement contrôlée, pour générer l'ensemble des cellules nécessaires à la formation d'un individu (figure 20).

En revanche, les cellules souches adultes, présentes pour certains types depuis la vie fœtale, représentent un stock de cellules souches retrouvé pendant toute l'existence d'un individu (figure 20). Un tel maintien est rendu possible par la capacité de ces cellules souches

adultes à s'auto-renouveler. Leur localisation est notée au sein de certains tissus dans des zones spécifiques, appelées niches, où elles sont dans un état de quiescence relative. Sous l'influence de certains signaux biologiques, par le biais de division asymétrique, ces cellules souches adultes peuvent générer des cellules souches « filles » identiques à elles-mêmes, et, aussi, d'autres cellules, engagées dans une voie de spécialisation. Ces dernières ont une capacité de prolifération limitée et produisent à terme des cellules différenciées avec des fonctions spécifiques (Smith, 2006). Les cellules souches adultes permettent ainsi le maintien de l'homéostasie tissulaire et la réparation des tissus lésés des organismes vivants.

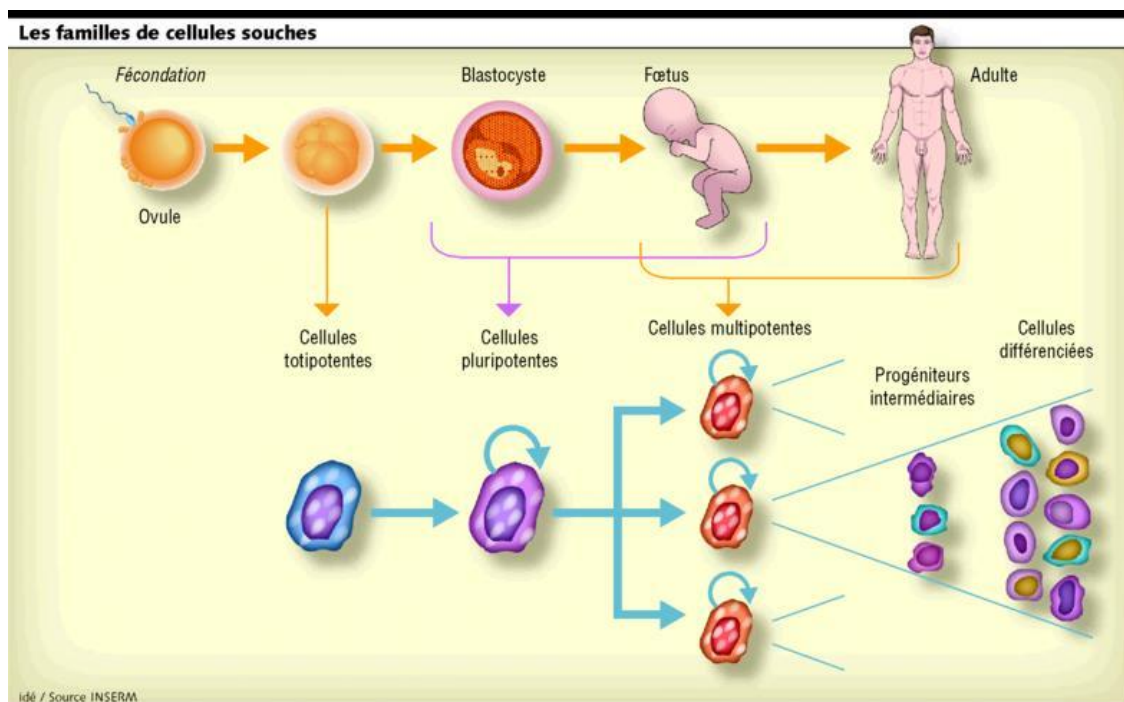


Figure 20 : Les différents types de cellules souches et leur potentialité associée (Les Echos n° 19278 du 03 Novembre 2004 • page 14).

6.2.2 Les différentes classes de cellules souches et leurs caractéristiques biologiques spécifiques

Les cellules souches, utilisées dans le cadre d'applications cliniques, possèdent des propriétés de plasticité distinctes. De telles différences sont notamment liées au stade de développement de l'organisme duquel elles ont été prélevées. En effet, au cours du développement d'un individu, depuis le stade embryonnaire jusqu'à l'âge adulte, le potentiel de différenciation des cellules souches se restreint.

Plus précisément, c'est ce degré de plasticité qui permet la définition de différentes populations de cellules souches présentant déjà des propriétés biologiques différentes. Se distinguent : les cellules souches totipotentes, pluripotentes, multipotentes et unipotentes (figure 20) (Smith, 2006).

6.2.2.1 Les cellules souches totipotentes

Les cellules souches totipotentes correspondent aux cellules de l'embryon jusqu'à ce qu'il atteigne le stade morula (2 à 8 cellules). Elles sont capables de se différencier pour former l'ensemble des cellules constitutives des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme, endoderme), mais également les cellules nécessaires au développement de l'embryon et du fœtus (comme les cellules permettant la formation du placenta).

6.2.2.2 Les cellules pluripotentes

Les cellules pluripotentes correspondent aux cellules de la masse interne du blastocyte (pour un embryon humain de 5 à 7 jours). La différenciation de ces cellules génère l'ensemble des cellules des trois feuillets embryonnaires. En revanche, elles ne sont pas capables de se différencier en cellules des compartiments annexes de l'embryon. Les cellules souches embryonnaires ou Embryonic Stem Cells (ou ES), utilisées en thérapie cellulaire sont obtenues à partir de telles cellules.

6.2.2.3 Les cellules souches multipotentes

Les cellules souches multipotentes correspondent à divers groupes de cellules retrouvées chez le fœtus et tout au long de la vie d'un individu. Elles sont capables d'auto-renouvellement, cependant leurs potentialités de différenciation sont restreintes. Elles produisent seulement certains types cellulaires particuliers. Les CSM appartiennent à cette catégorie de cellules souches.

6.2.2.4 Les cellules unipotentes

Les cellules unipotentes sont uniquement présentes au sein de certains types de tissus ou d'organes, notamment la peau, la muqueuse intestinale et le foie. Elles prolifèrent à l'identique et se différencient en un type cellulaire spécifique. Les organes, comme le cœur et le pancréas, qui en sont dépourvus, sont ainsi incapables de régénération suite à une lésion.

6.2.3 Les intérêts et les difficultés de l'utilisation des cellules pluripotentes en thérapie cellulaire

Les cellules pluripotentes, issues d'embryons ou créées « artificiellement » suscitent beaucoup d'espoirs dans le domaine de la thérapie cellulaire, mais aussi, encore beaucoup de questionnements.

6.2.3.1 Les cellules ES

Tout d'abord, les cellules ES utilisées en thérapie cellulaire possèdent des propriétés biologiques avantageuses pour une utilisation en clinique. En effet, ces cellules peuvent proliférer à l'infini *in vitro* sans perdre leur caractère pluripotent (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Elles constituent donc une source inépuisable de cellules disponibles et polyvalentes, possédant un champ d'application thérapeutique vaste du fait de leur grande plasticité.

Cependant, certains aspects rendent difficile leur utilisation thérapeutique. D'abord, leur utilisation clinique implique, pour les patients concernés, la prise d'un traitement immunosuppresseur. De plus, le manque de connaissances sur la régulation spécifique de leur différenciation ainsi que leur caractère potentiellement tumorigène affectent leur crédibilité en tant que candidat pour une utilisation en thérapie cellulaire (Blum and Benvenisty, 2008). Enfin, les problèmes éthiques liés à la destruction d'embryons humains, requise par cette pratique, constituent aussi un frein à leur utilisation. En France, les études nécessitant la destruction d'embryon sont en effet interdites à quelques exceptions près et sont strictement contrôlées par l'agence de biomédecine.

6.2.3.2 Les cellules souches pluripotentes induites

Dans l'objectif de pallier aux problèmes posés par l'utilisation des cellules ES en médecine régénérative, diverses stratégies de recherche, tournées vers la reprogrammation cellulaire se sont développées.

La reprogrammation cellulaire, qui permet la transformation d'une cellule différenciée en une cellule possédant les caractéristiques d'une cellule souche, a été originellement réalisée par l'équipe de Yamanaka. Cette équipe a réussi en effet à obtenir des cellules possédant l'ensemble des gènes de la pluripotence à partir notamment de fibroblastes murins et humains dans lesquels 4 facteurs de transcription Oct3/4, Sox2, Klf4, et c-Myc ont été transfectés. Ces

cellules transformées sont appelées cellules souches pluripotentes induites ou induced Pluripotent Stem (iPS) Cells (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007; Yamanaka, 2007). Les iPS disposent de l'intégralité des propriétés biologiques indispensables à la définition des cellules ES, à savoir, l'auto-renouvellement à l'infini, le potentiel de se différencier dans n'importe quel type cellulaire *in vitro*, et, l'aptitude à former des tératomes *in vivo* (Takahashi et al., 2007).

La reprogrammation des cellules différenciées en iPS permet donc de pallier aux problèmes éthiques inhérents à l'utilisation des cellules ES. De plus, dans le cas de greffes allogéniques, l'utilisation d'iPS faciliterait la sélection d'un donneur compatible avec le receveur afin d'éviter le rejet de greffe.

Depuis les premières études réalisées au sein de l'équipe de Yamanaka *et al.*, la stratégie de reprogrammation a évolué afin de restreindre le risque tumorigène des iPS. Bien que des améliorations aient été réalisées, ces dernières restent encore insuffisantes. Depuis 2007, le développement des vecteurs non intégratifs a permis d'éviter les transfections virales susceptibles de s'intégrer au génome des cellules. En outre, diverses techniques, s'affranchissant de l'utilisation de vecteurs viraux, ont été mises en place. Les transfections utilisant des plasmides ou encore des nanoparticules magnétiques ont notamment été étudiées (Lee et al., 2011; Okita et al., 2008). De plus, des techniques qui limitent le nombre de gènes transfectés (notamment les oncogènes Klf4, and c-Myc) ont été développées. Toutefois, de telles techniques se sont avérées être moins efficaces, notamment en terme du rendement d'obtention de cellules reprogrammées (Huangfu et al., 2008; Warren et al., 2010; Zhou et al., 2009).

Enfin, le fait que la reprogrammation totale des iPS ne soit pas actée, suscite un autre problème pour leur utilisation thérapeutique. En effet, rien n'atteste de la perte des modifications épigénétiques d'une cellule après sa reprogrammation.

En 2013, au Japon le premier essai clinique chez l'homme utilisant des iPS autologues a été autorisé. Les cellules de la rétine de 6 patients seront utilisées pour traiter leur pathologie de dégénérescence maculaire liée à l'âge. L'innocuité ainsi que l'efficacité de la technique seront évaluées sur une durée de 3 ans. La Food and Drug Administration aux Etats-Unis avait elle déjà autorisé ce type d'essais cliniques, dans l'objectif de parvenir à une régénération rétinienne chez de tels patients, avec des cellules ES dès 2011.

6.2.4 Le choix des CSM en thérapie cellulaire

Parmi l'ensemble des essais cliniques basés sur l'utilisation de cellules souches, ceux réalisés avec les CSM représentent l'une des stratégies les plus appliquées (environ 200 essais cliniques) et une des plus abouties (en terme d'innocuité et de résultats physiologiques obtenus).

Cette sous partie 6.2.4 permet de décrire leur découverte et rôles physiologiques. Puis, les caractéristiques de ces cellules sont données et les avantages de leur utilisation en médecine régénérative explicités.

6.2.4.1 La découverte des CSM

Les cellules souches adultes les plus étudiées et les mieux caractérisées sont les cellules souches multipotentes issues de la moelle osseuse : les cellules souches hématopoïétiques (CSH) et les CSM.

Les CSH sont capables de générer l'ensemble des cellules du système sanguin. Leurs propriétés biologiques ont été utilisées en thérapie cellulaire dès la fin des années 1900 dans le cadre du traitement des hémopathies malignes.

Par ailleurs, l'existence d'une autre population cellulaire de la moelle osseuse capable d'adhérer à des supports en plastique, de former des colonies de types fibroblastiques (Fibroblasts Colony-Forming Unit ou CFU-f) et de se différencier en ostéoblaste *in vitro* a été démontré dans les années 1970 (Friedenstein et al., 1968, 1976). Les travaux de Friedenstein sont d'ailleurs les premiers à suggérer la présence au niveau de la moelle osseuse de cellules souches ou progéniteurs multipotents de ce type. Dès lors, les études concernant les CSM se sont intensifiées et leur potentiel de différenciation vers l'ensemble des lignages mésodermique a été notamment souligné (Caplan, 1991).

Par la suite, de nombreuses études ont permis de démontrer leur présence au sein d'autres tissus, et ont spécifié précisément leur rôle physiologique ainsi que leurs propriétés biologiques, jusqu'à en faire des candidats de choix pour la thérapie cellulaire.

6.2.4.2 Les origines tissulaires diverses des CSM

Les CSM ne sont pas seulement présentes au niveau de la moelle osseuse, leurs origines tissulaires sont en effet multiples. Elles ont notamment été décrites au sein de divers tissus adultes (tissu adipeux, le muscle squelettique, la pulpe dentaire, le foie), mais aussi fœtaux, ainsi que dans le placenta, le liquide amniotique et le sang de cordon ombilical (Salem and Thiernemann, 2010).

Leurs origines tissulaires diverses représentent pour les cliniciens un facteur d'intérêt pour leur utilisation en thérapie cellulaire. En effet, le prélèvement de tissu adipeux, par exemple, est moins invasif et permet l'obtention d'une plus grande quantité de cellules, au regard du prélèvement de moelle osseuse.

Indépendamment de leur origine tissulaire, ces cellules possèdent des propriétés biologiques similaires qui sont à la base de la définition des CSM. Cependant certaines particularités liées au type tissulaire d'appartenance originelle existent. Ces singularités sont à considérer au regard du type de pathologie qu'elles sont destinées à traiter (cf. sous-partie 6.2.4.5).

6.2.4.3 Le rôle physiologique des CSM endogènes

Dans cette sous-partie, le rôle physiologique des CSM le plus classiquement décrit et leur implication potentielle dans les processus de réparation tissulaire de l'organisme dans des conditions pathologiques sont présentés.

Dans la moelle osseuse, ces cellules représentent un constituant de la niche hématopoïétique et participent au soutien de l'hématopoïèse. Elles régulent en effet la survie, la prolifération et la différenciation des CSH par la production de facteurs de croissance ainsi que de cytokines, et, permettent l'établissement d'un tissu de soutien (Dazzi et al., 2006).

De plus, chez l'homme et le rongeur des études ont démontré la présence dans le sang de cellules qui possédaient le même phénotype et les mêmes capacités de différenciation *in vitro* que les CSM (Mansilla et al., 2006; Rochefort et al., 2006; Zvaifler et al., 2000). Dans un modèle de rat soumis à des conditions hypoxiques, le nombre de CSM dans le sang est considérablement augmenté, suggérant une capacité de mobilisation de ces cellules depuis leur niche vers le système sanguin (Rochefort et al., 2006). D'autres études laissent supposer que les CSM présentes dans le sang pourraient être recrutées dans des zones où des tissus lésés afin de jouer un rôle dans la réparation tissulaire. En effet, Mansilla *et al.*, ont

notamment démontré une augmentation du pourcentage de ces cellules dans le sang de patients ayant été brûlés comparativement au pourcentage détecté dans le sang de donneurs sains. L'augmentation du pourcentage de ces cellules a d'ailleurs pu être corrélée avec la taille et la sévérité de la brûlure observée (Mansilla et al., 2006). Les CSM endogènes seraient donc mobilisables et pourraient participer aux processus de réparation tissulaire.

6.2.4.4 La nécessité d'une nomenclature en adéquation avec la réalité biologique des CSM

Différents noms ont été donnés au cours du temps aux CSM, qui ont en revanche toujours préservé leur acronyme. Le terme de « cellules souches mésenchymateuses » est celui qui a été popularisé par Caplan dans les années 1990 (Caplan, 1991).

Cependant, une clarification dans la terminologie appliquée à ces cellules, concernant notamment le terme « souche » a été nécessaire. L'objectif était d'employer la terminologie la plus adaptée à la réalité des propriétés biologiques des cellules utilisées dans les études expérimentales comme cliniques. En effet, les CSM générées en culture par adhérence sur des supports en plastique représentent une population hétérogène de cellules avec des capacités d'auto-renouvellement distinctes et limitées *in vitro*. Bien que ces cellules soient multipotentes, la terminologie « souche » paraît donc ambiguë. Dans ce cas, le terme « multipotente » est plus adapté. La dénomination de « cellule stromale multipotente mésenchymateuse » a donc été préférée à celle de « cellule souche mésenchymateuse » par la Société Internationale pour la Thérapie Cellulaire (ou l'International Society for Cellular Therapy (ISCT)) (Horwitz et al., 2005), dès lors que les CSM sont mises en culture.

En ce qui concerne les autres termes employés pour leur dénomination, ils précisent leurs caractéristiques biologiques. Le terme « stromal » se réfère au type de compartiment tissulaire dans lequel les CSM se situent *in situ*, i.e. des compartiments de support stromal. Quant au terme « mésenchymateuse », il vise à caractériser l'origine embryonnaire de ces cellules (Horwitz et al., 2005).

6.2.4.5 Caractéristiques des CSM en culture

Les critères minimums pour définir les cellules stromales mésenchymateuses ou CSM en culture ont été donnés par l'ISCT en 2006 (Dominici et al., 2006). Les CSM sont ainsi définies par :

- leur capacité d'adhérence à un support en plastique,
- leur capacité à acquérir une forme fibroblastique en culture,
- leur capacité à former des colonies de type fibroblastiques (CFU-f),
- l'expression de certains marqueurs de surface (CD73, CD90 et CD105) et l'absence d'autres, plus précisément, des marqueurs de surface des cellules hématopoïétiques (CD34, CD45, CD19, CD11a et l'Human leukocyte antigen-DR (HLA-DR)) et,
- leur capacité à se différencier en cellules du lignage mésodermique comme les chondrocytes, les adipocytes et les ostéoblastes *in vitro* dans des conditions de culture adaptées.

L'ensemble des CSM en culture, indépendamment du tissu dans lequel elles ont été prélevées, possèdent ces propriétés biologiques. Mais encore une fois, les diverses populations cellulaires d'origine tissulaire distincte ne sont pas strictement identiques. En effet, une variabilité dans leur aptitude à proliférer, à se différencier, ainsi que dans leur phénotype a pu être mise en évidence (Al-Nbaheen et al., 2013; Bieback et al., 2008). Bien plus, le bénéfice thérapeutique des CSM varie en fonction de leur origine tissulaire et de manière différente suivant l'effet thérapeutique biologique recherché (Elman et al., 2014; Kim et al., 2007).

En clinique, au delà du facteur d'« accessibilité » et de la quantité de cellules obtenues, le choix du type de prélèvement doit être assujéti à la pathologie à traiter.

6.2.4.6 Les propriétés biologiques des CSM qui favorisent leur utilisation thérapeutique

Un certain nombre de caractéristiques et de propriétés biologiques impose les CSM comme des candidats d'intérêt majeur pour les applications de thérapie cellulaire. Certaines études en attestant sont évoquées dans cette partie 6.2.4.6. Les résultats de ces études ont été obtenus pour des CSM mises en culture ou suite à leur injection chez l'homme ou dans des modèles animaux.

a) Le homing des CSM exogènes

De nombreuses études dans différents modèles animaux démontrent que les CSM injectées par voie intraveineuse (i.v.) migrent préférentiellement vers les tissus lésés et /ou enflammés.

Ce phénomène de "homing" a notamment été mis en évidence par notre groupe chez des animaux irradiés et injectés. Tout d'abord, des CSM humaines, injectées à des souris immuno-déficientes après leur irradiation, ont pu être retrouvées au sein des tissus irradiés et lésés (intestin, foie et rate) (François et al., 2006; Sémont et al., 2006, 2010). La migration puis l'intégration des CSM au niveau des tissus endommagés suite à une irradiation a aussi été observée dans des modèles d'animaux immunocompétents. Dans un modèle de radiolésion multi-organes chez le primate non humain irradié, les CSM injectées (en co-greffe avec des CSH) sont retrouvées au niveau des sites lésionnels 82 jours après leur injection (Chapel et al., 2003). De façon similaire, des CSM allogéniques sont retrouvées au niveau de la sous-muqueuse et de la séreuse du côlon lésé une semaine après leur injection dans un modèle d'ulcération colorectale radio-induit chez le rat (Semont et al., 2013).

Le "homing" des CSM vers les sites d'inflammation est lié au fait qu'elles expriment à leur surface :

- des récepteurs aux chimiokines (CCR1, CCR2, CCR7, CCR9, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CXCR5, CXCR6) (Honzarenko et al., 2006; Ringe et al., 2007),
- des molécules d'adhésion comme des intégrines ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha \nu \beta 3$, $\alpha \nu \beta 5$, $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$) et des immunoglobulines (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1) (Conget and Minguell, 1999; Majumdar et al., 2003) et,
- des métalloprotéinases.

Le rôle de ces molécules dans le processus de "homing" des leucocytes et des CSH a largement été décrit. Les grandes étapes qui peuvent se distinguer sont : (i) pour le déclenchement de la migration suite à un stimulus inflammatoire, (ii) pour la migration et l'adhésion à la matrice extracellulaire et aux cellules endothéliales, et (iii) pour l'extravasation des cellules du vaisseau vers le tissu.

Concernant le "homing" des CSM, le Stromal derived Factor 1 (SDF-1 ou CXCL12) et son récepteur CXCR4 semble avoir un rôle déterminant.

Dans des modèles de rongeur d'infarctus du myocarde et de lésions ischémiques du cerveau, notamment, l'implication du SDF-1 et de son récepteur CXCR4 dans les

phénomènes de « homing » des CSM, injectées par voie i.v, a été démontrée. En effet, dans ce cadre, l'utilisation d'antagonistes de CXCR4 a permis de démontrer l'implication au moins partielle de SDF-1 et de son récepteur dans le homing de ces CSM (Abbott et al., 2004; Wang et al., 2008). Plus précisément, Li *et al.*, ont démontré que l'augmentation du NO favorisait la surexpression de SDF-1, dans le cas d'une ischémie du myocarde et, par ce biais, la migration des CSM (Li et al., 2009). Pour finir, Wynn *et al.*, ont aussi démontré que l'expression de CXCR4 par les CSM était primordiale dans leur capacité d'adhésion aux cellules endothéliales (Wynn et al., 2004).

b) Les propriétés immuno-modulatrices des CSM

La modulation de la réponse immunitaire innée et adaptative par les CSM a été décrite dans des études expérimentales menées surtout *in vitro*, mais aussi *in vivo*. Ces propriétés immuno-modulatrices des CSM représentent d'ailleurs un argument majeur pour leur utilisation en clinique.

Leur faible immunogénicité favorise leur utilisation dans des conditions de greffes allogéniques. En effet, diverses études ont démontré que les CSM sont susceptibles d'échapper à la surveillance immunitaire, attestant ainsi de leur faible caractère immunogène. Les CSM expriment le complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 ou CMH I, et le CMH II seulement suite à une stimulation à l'interféron- γ . En revanche, elles n'expriment pas les molécules de co-stimulation ni le CD40, le CD80 et le CD86 (Tse et al., 2003). De plus, des études ont démontré *in vitro* qu'elles inhibent la prolifération des lymphocytes allogéniques avec lesquelles elles ont été mises en culture (Tse et al., 2003). Cependant, bien que dans des modèles animaux immunodéprimés, leur injection soit bien tolérée, des rejets de greffes allogéniques ou xénogéniques ont néanmoins été observés dans quelques études utilisant des modèles animaux immunocompétents (Djouad et al., 2005; Eliopoulos et al., 2005; Grinnemo et al., 2004; Nauta et al., 2006). Ainsi, malgré le faible caractère immunogène des CSM, le risque de rejet, lors de leur utilisation dans un contexte allogénique, ne peut pas être totalement écarté.

Cependant, leurs propriétés immuno-suppressives ont déjà été utilisées en clinique afin de moduler les états inflammatoires de diverses pathologies (Sun et al., 2010; Von Bonin et al., 2009), notamment de maladies inflammatoires intestinales (exemple dans le cas de la CD (Dryden, 2009)). Bien que les mécanismes qui confèrent aux CSM de telles propriétés

immuno-suppressives ne soient pas encore totalement élucidés, une action inhibitrice sur la fonctionnalité de diverses cellules immunitaires (les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques ainsi que les natural Killer) leur est conférée (Larghero et al., 2009). A titre d'exemple, l'étude de Rasmusson *et al.*, a démontré que les CSM sont capables d'inhiber la formation de lymphocytes T cytotoxiques (Rasmusson et al., 2003). De manière schématique et non exhaustive, la figure 21 présente les capacités immuno-modulatrices des CSM et certains des mécanismes qui sont associés à leurs actions.

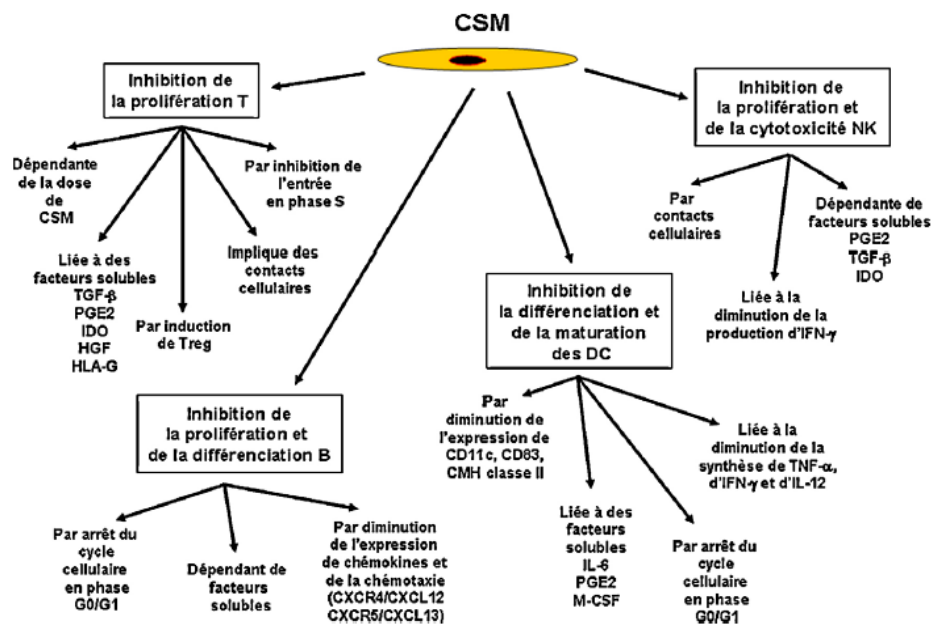


Figure 21 : Immunomodulation induite par les CSM in vitro. TGF-β : transforming growth factor beta ; PGE2 : prostaglandine E2 ; IDO : indolamine 2,3-dioxygénase; HGF : hépatocyte growth factor; IFN-γ : interféron gamma; TNF-α : tumor necrosis factor alpha; M-CSF : macrophage-colony stimulating factor; IL-6 : interleukin 6; IL-12 : interleukin 12 (Larghero et al., 2009).

c) Modes d'action

Le potentiel thérapeutique des CSM pourrait s'expliquer par la capacité de ces cellules à se différencier au niveau des sites lésés. Ce mode d'action des CSM reste néanmoins controversé. La communauté scientifique envisage que leur action bénéfique soit principalement dépendante de leurs sécrétions paracrines. En effet, au-delà de la libération de substances biologiques favorisant les processus immuno-modulateurs, les CSM libèrent une large gamme de biomolécules impliquées dans de nombreux phénomènes physiologiques et qui favorisent ainsi la régénération tissulaire.

Les propriétés de différenciation voire de trans-différenciation des CSM

Un grand nombre d'études ont été réalisées afin de déterminer la capacité de différenciation et même de trans-différenciation des CSM *in vitro* mais également *in vivo*.

Remarque : Ici, j'évoquerai leur plasticité ou leur différenciation plutôt que leur potentiel de trans-différenciation. En effet, la trans-différenciation d'une cellule signifie : (i) qu'elle est capable de se différencier complètement, d'un point de vue phénotypique et fonctionnel, en une cellule d'un autre lignage, et, (ii) que le processus biologique à l'origine de ce phénomène n'implique pas d'étape de dédifférenciation. Cependant, ces deux points (i) et (ii) ne sont pas validés dans les études menées à ce sujet sur les CSM.

Dans des conditions de culture adéquates, les CSM sont capables de se différencier en adipocytes, en ostéoblastes, en chondrocytes, en myoblastes mais aussi en fibroblastes (Pittenger et al., 1999).

De plus, les CSM ne sont pas seulement capables de se différencier en cellules du lignage mésodermique mais également en cellules qui dérivent de l'ectoderme et de l'endoderme (Uccelli et al., 2008; Zhang, 2013). En effet, des études expérimentales *in vitro* ont démontré, dans des conditions de cultures particulières et adaptées, que les CSM peuvent acquérir des caractéristiques phénotypiques et des propriétés biologiques de neurones (Choong et al., 2007; Jori et al., 2005; Long et al., 2005; Trzaska and Rameshwar, 2011; Zhang, 2013), d'astrocytes (Bahat-Stroomza et al., 2009), de cardiomyocytes (Tokcaer-Keskin et al., 2009), de cellules endothéliales (Janeczek Portalska et al., 2012) et de cellules musculaires lisses (Espagnol et al., 2014; Gong and Niklason, 2011; Kinner et al., 2002; Park et al., 2013; Wang et al., 2006c). Dans l'étude de Wang *et al.*, le potentiel de différenciation des CSM de rats en cellules « cardiomyocyte-like » ou cellule « musculaire lisse-like », dans leurs conditions expérimentales, nécessite le contact entre ces CSM avec des cardiomyocyte ou des cellules musculaires lisses (Wang et al., 2006c).

Cependant, *in vivo*, alors que la capacité des CSM à se différencier en cellules du lignage ostéoblastique et chondrocytaire (Zhang, 2013) est clairement admise, leur potentiel de différenciation vers d'autres lignages cellulaires reste toutefois controversé.

Des études expérimentales ont cependant démontré l'aptitude de CSM injectées dans des modèles animaux à acquérir des caractéristiques biologiques de cellules d'autres lignages

cellulaires. Un telle plasticité a été indiquée notamment lorsque des CSM murines injectées chez des souris ont été retrouvées au niveau du ventricule latéral de leur cerveau avec un phénotype astrocytaire ainsi que probablement neuronal (Kopen et al., 1999). De plus, l'injection locale de CSM allogénique ou xénogénique dans des modèles animaux distincts d'infarctus du myocarde a notamment permis de démontrer leur capacité de différenciation en cellules possédant un phénotype cardiomyocytaire (Quevedo et al., 2009; Toma et al., 2002).

Les controverses qui existent autour de ces études découlent tout d'abord de la caractérisation phénotypique même des cellules qui auraient subi une telle différenciation. Par exemple, les marqueurs utilisés pour la caractérisation phénotypique des cellules « cardiomyocyte-like » de l'étude de Toma *et al.*, sont discutables. De plus, il est légitime de se demander si le seul changement phénotypique *in vivo* est un facteur suffisant pour considérer « réel » ou complètement abouti ce type de phénomène plastique. En effet, à notre connaissance, aucune étude expérimentale menée *in vivo* n'atteste de la fonctionnalité de ces cellules dites « différenciées ».

L'effet paracrine des CSM

Un grand nombre d'études expérimentales ont d'ores et déjà démontré le potentiel thérapeutique de l'injection systémique de CSM. Or, les CSM injectées par voie i.v. sont majoritairement retenues au niveau des poumons, difficilement détectées au sein des tissus cibles, et, leur différenciation *in vivo* en cellules matures fonctionnelles est faible ainsi que controversée. La communauté scientifique s'accorde ainsi à penser, depuis plusieurs années, que les CSM exercent leur effet biologique bénéfique *via* des sécrétions paracrines plutôt que par leur capacité de différenciation *in vivo*.

Les CSM sont en effet capables de sécréter *in vitro* des molécules bioactives qui possèdent des propriétés biologiques favorisant les processus (Da Silva Meirelles et al., 2009) (figure 22) :

- (i) d'immuno-modulation, mais aussi
- (ii) anti-apoptotique,
- (iii) pro-angiogénique,
- (iv) de support et d'aide à la différenciation des cellules souches ou progéniteurs endogènes,
- (v) anti-fibrosant, et,
- (vi) chémoattractant.

Les différentes molécules (facteurs de croissance, cytokines, chémokines) impliquées dans ces processus, comme le VEGF ou facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (ou Vascular endothelial growth factor), le NGF et le SDF1, sont citées de manière non exhaustive dans la figure 22.

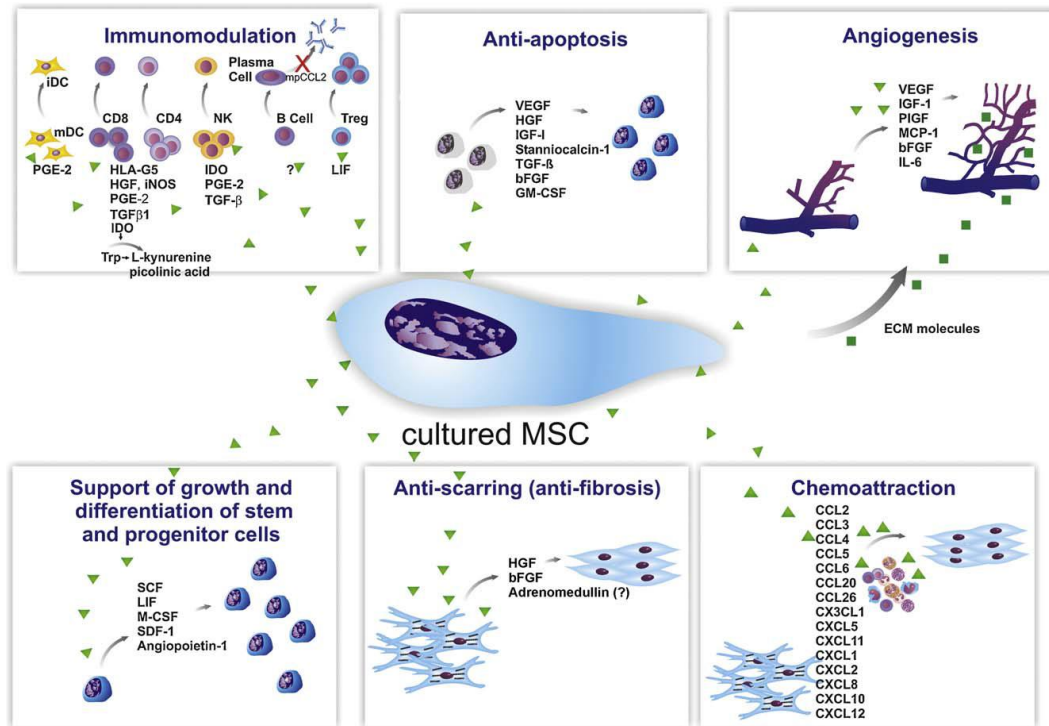


Figure 22 : Effet paracrine des CSM in vitro (Da Silva Meirelles et al., 2009).

Bien plus, les facteurs trophiques paracrines présentés dans la figure 22 ont aussi été démontrés comme étant impliqués dans l'effet thérapeutique des CSM *in vivo*. En effet, une variété importante de molécules est susceptible d'être sécrétée par les CSM *in vivo*, et ceci, en fonction du microenvironnement dans lequel elles se trouvent. Cet effet paracrine transitoire module la composition moléculaire de l'environnement favorisant la régénération ainsi que la réparation fonctionnelle de l'organe ou du tissu lésé. Par le biais de telles sécrétions, les CSM jouent un rôle dans les phénomènes de neuro-protection, de régénération tissulaire ainsi que dans la modulation de l'inflammation (Baraniak and McDevitt, 2010).

6.2.4.7 L'innocuité des CSM en clinique

Toute stratégie thérapeutique nécessite l'évaluation des effets secondaires potentiellement engendrés par sa mise en place. L'utilisation de cellules souches, non différenciées, amplifiées *in vitro*, en tant que produit de thérapie cellulaire pose la question de leur potentiel tumorigène, successivement à leur injection *in vivo*.

Les résultats des études expérimentales menées sur les CSM à ce sujet sont controversés. Leur caractère pro ou anti-tumoral dépendrait ainsi des paramètres expérimentaux des études considérées : les conditions de cultures, l'origine des cellules injectées, le type de modèle, le moment où elles sont introduites dans l'environnement tumoral, le type d'injection, la dose de cellules injectées, etc (Klopp et al., 2011). Le manque de standardisation de ces procédures expérimentales rend complexe leur interprétation.

Cependant, Tarte *et al.*, ont démontré que lorsque les CSM humaines sont cultivées dans des conditions différentes de grade clinique, elles arrêtent de proliférer progressivement puis rentrent en sénescence sans qu'aucun phénomène de cancérisation ne soit observé *in vitro*. Dans certaines cultures, une aneuploïdie a cependant été décrite. Ce phénomène marginal n'est pas lié aux conditions de cultures, mais serait dépendant du donneur. En outre, lorsque les cellules ainsi cultivées sont injectées par voie i.v. dans des souris immunodéficientes, préalablement soumises à une dose sublétalement d'irradiation, aucune transformation n'a été détectée (Tarte et al., 2010).

De plus, les essais cliniques menés depuis une vingtaine d'années avec des CSM ont démontré l'innocuité de ce type de traitement, sans survenue d'effets secondaires ou de développement de cancer chez les patients traités pour diverses pathologies.

Cette partie bibliographique souligne de fait l'intérêt de l'utilisation, des CSM en thérapie cellulaire, et ceci, dans un domaine d'application large.

6.3 Les arguments en faveur de l'utilisation des CSM pour moduler l'hypersensibilité viscérale radio-induite

Les propriétés biologiques des CSM ont favorisé leur utilisation dans de nombreux essais cliniques. Leur bénéfice thérapeutique a été/est en cours d'évaluation dans le traitement de diverses pathologies, comme la réaction de l'hôte contre le greffon (GVHD), les maladies

inflammatoires du tube digestif, l'infarctus du myocarde et les maladies neurodégénératives (Dryden, 2009; Joyce et al., 2010; Le Blanc et al., 2008; Mazo et al., 2012; Sun et al., 2010; Von Bonin et al., 2009; Voswinkel et al., 2013).

L'objectif de cette partie 6.3 n'est pas tant de faire une liste exhaustive de tous les effets thérapeutiques bénéfiques des CSM, mais de mettre en évidence les arguments en faveur de leur utilisation afin de moduler la douleur viscérale radio-induite.

Dans un premier temps, l'effet biologique des CSM sur les dommages radio-induits au niveau abdomino-pelvien est abordé. Puis, l'effet antinociceptif des CSM dans des modèles de douleur neuropathique chez les rongeurs est décrit.

6.3.1 Les bénéfices thérapeutiques des CSM sur les altérations biologiques radio-induites abdomino-pelviennes

Dans le contexte pathologique créé par l'irradiation des organes de la zone abdomino-pelvienne, de nombreuses études expérimentales démontrent que l'injection systémique de CSM permet de: (i) favoriser la réparation tissulaire, (ii) moduler les processus inflammatoires, (iii) protéger les structures neuronales ou de favoriser la neurogénèse, (iv) rétablir au moins en partie les fonctions organiques, et, (v) améliorer la survie des animaux.

6.3.1.1 La réparation tissulaire

Les CSM sont capables, dans divers modèles animaux, de limiter l'apparition ou la progression de lésions radio-induites.

Tout d'abord, le rôle des CSM humaines sur la réparation tissulaire a notamment été mis en évidence dans un modèle de souris immunotolérantes NOD /SCID, irradiées au niveau abdominal à la dose de 8,5 Gy. Plus précisément, dans ce modèle une atrophie épithéliale est observée trois jours après l'irradiation. L'apparition d'une telle lésion chez les animaux irradiés a pu être prévenue lorsque 5 millions de CSM humaines ont été injectées par voie i.v., 24 heures après l'irradiation (Sémont et al., 2006, 2010). Les auteurs démontrent que le maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire est notamment lié à la combinaison de deux phénomènes majeurs initiés et/ou amplifiés par les CSM. D'une part, l'intégrité intestinale est rétablie par la capacité que possèdent les CSM à stimuler le processus de prolifération endogène qui débute après l'irradiation (à ces doses d'irradiation). D'autre part, les CSM, en favorisant l'inhibition de l'apoptose des cellules épithéliales (particulièrement dans le

compartiment progéniteur/souche de l'intestin grêle), permettent d'obtenir un réel bénéfice sur la lésion (Sémont et al., 2006, 2010). Chang *et al.*, ont indiqué de manière similaire le potentiel de telles cellules humaines, originaires du tissu adipeux, les « adipose-derived stem cells » (ADSC) dans un modèle de lésion radio-induite intestinale chez le rat après qu'elles aient été injectées par voie i.p. . Les auteurs démontrent aussi dans cette étude que le maintien de l'homéostasie tissulaire épithéliale est notamment lié à une prolifération accrue de cellules de la crypte mais aussi à une présence plus importante des ISC intestinales chez les animaux traités (Chang et al., 2013).

Par ailleurs, l'injection par voie i.v. de 5 millions de CSM allogéniques, après l'exposition aux rayonnements ionisants de la zone colorectale chez le rat, permet de minimiser les altérations lésionnelles radio-induites irréversibles observées chez ces animaux. Le score de lésion épithéliale est en effet diminué, 1 et 2 semaines après l'injection, et ce, en comparaison à celui obtenu pour des animaux qui n'ont pas été traités aux mêmes temps (Sémont et al., 2013). Le rétablissement du pool de cellules SOX9+, la prolifération des cellules de la crypte ainsi que les phénomènes de crypte branching sont autant de mécanismes soulignés pour expliquer le bénéfice thérapeutique observé suite à l'injection des CSM chez les animaux irradiés. Dans cette étude, le processus de régénération épithéliale est notamment lié à une augmentation de la sécrétion du facteur Wnt4 par les cellules épithéliales chez les animaux traités (Sémont et al., 2013).

De plus, dans ce modèle d'étude, l'injection itérative de CSM allogéniques, à partir de trois semaines après irradiation, i.e. quand des lésions sont déjà établies, permet la diminution de certains dommages tissulaires radio-induits. En effet, les dommages muqueux, musculaires et vasculaires observés à long terme sont moindres pour les animaux ayant été traités (Sémont et al., 2013).

Enfin, dans un modèle préclinique de « proctitis » radio-induite chez le « mini-pig », l'injection itérative par voie i.v. de CSM autologues permet de minimiser la lésion fibrotique, notamment avec réduction du dépôt de collagène et de l'expression de col1a2/col3a1 (Linard et al., 2013).

6.3.1.2 La modulation de l'inflammation radio-induite

Le potentiel immuno-modulateur des CSM dans des modèles mimant diverses pathologies a été largement étudié. En revanche, peu de données existent sur la modulation de l'inflammation radio-induite.

Tout d'abord, dans le modèle d'ulcération colorectale radio-induite chez le rat, le bénéfice de l'injection préventive de CSM sur l'inflammation innée et adaptative radio-induite a été étudié, et ceci, 3 semaines après irradiation. Dans ce contexte aucune modulation de l'inflammation innée, par les CSM, n'a pu être mise en évidence. En revanche, la modulation par les CSM, de l'inflammation adaptative a été démontrée et caractérisée. L'injection de CSM se traduit par la réduction du nombre de lymphocytes T dans la muqueuse colique, et ce, jusqu'à des niveaux controls. En outre, ce phénomène est associé à une diminution de leur état d'activation ainsi qu'à l'augmentation de la mort par apoptose des lymphocytes CD8+ activés. Dans ces conditions expérimentales, l'action des CSM peut être corrélée à une stimulation de la synthèse des glucocorticoïdes endogènes (Bessout et al., 2013).

Ensuite, l'étude de Chang *et al.*, indique une diminution de l'inflammation, notamment innée, radio-induite dans l'intestin, et ceci, 10 jours après l'injection d'ADSC humaines (Chang et al., 2013).

Enfin, dans un modèle préclinique de « mini-pig », l'injection itérative de CSM permet de réduire l'expression de cytokine pro-inflammatoires, d'augmenter l'expression de l'IL10 et de diminuer le recrutement des macrophages au niveau de la muqueuse rectale (Linard et al., 2013).

Bien que les modèles animaux et les modes opératoires de ces études soient distincts, les CSM (d'origines diverses) semblent avoir un effet sur la modulation de l'inflammation radio-induite de type innée et adaptative.

6.3.1.3 La régénération neuronale

Les CSM semblent également jouer un rôle dans la neuroprotection ou la régénération neuronale suite à l'exposition des tissus sains aux rayonnements ionisants. En effet, dans un modèle de rat soumis à une irradiation fractionnée de la prostate, une lésion des nerfs caverneux qui expriment la nNOS a été mise en évidence. L'injection unique par voie i.v. de 1 million d'ADSC permet la régénération partielle de ces fibres nerveuses caverneuses exprimant la nNOS (Qiu et al., 2012).

6.3.1.4 Le rétablissement de la fonction organique

Dans certaines études citées précédemment, le bénéfice thérapeutique de l'injection de CSM sur le fonctionnement de l'organe cible est aussi observé.

Dans le modèle d'irradiation abdominale (8,5 Gy) chez la souris NOD/SCID, la capacité d'absorption et de sécrétion de l'épithélium intestinal est restaurée chez les animaux ayant reçu une injection de CSM (Sémont et al., 2010).

Parallèlement, le rôle protecteur joué par la barrière intestinale, qui a été altérée suite à l'irradiation, est partiellement rétabli chez les animaux irradiés ayant reçu un traitement par CSM. La régénération épithéliale intestinale (Sémont et al., 2010, 2013), ainsi que le rétablissement de l'expression des protéines de jonctions adhérentes (β -caténine) au niveau de la muqueuse colique (Sémont et al., 2013), après à l'injection de CSM en attestent. Par ce biais, une limitation des agressions en provenance de la lumière intestinale chez les animaux irradiés et traités par rapport à des animaux irradiés est suggérée.

Enfin, l'injection unique d'ADSC dans un modèle d'irradiation fractionnée de la prostate permet de rétablir l'activité érectile chez les animaux traités (Qiu et al., 2012).

6.3.1.5 Vers une survie améliorée des animaux

Suite à une irradiation de la zone abdomino-pelvienne, les multiples bénéfices liés à l'action biologique des CSM injectées expliquent l'augmentation de la durée de vie des animaux irradiés et traités, en comparaison avec les animaux non traités (Chang et al., 2013; Sémont et al., 2010, 2013).

L'origine de la douleur peut être inflammatoire et/ou neuropathique. Or, les CSM modulent l'inflammation radio-induite et peuvent agir sur la régénération des fibres nerveuses suite à une irradiation abdomino-pelvienne. De plus, l'hypersensibilité viscérale est souvent favorisée ou corrélée à un dysfonctionnement de l'organe, comme par exemple l'altération de la barrière épithéliale et de la perméabilité intestinale. Les CSM sont capables de restaurer, au moins partiellement, ces deux fonctions intestinales, altérées suite à l'exposition de l'intestin aux rayonnements ionisants. Dès lors, l'action thérapeutique polyvalente des CSM suggère qu'elles pourraient aussi jouer un rôle dans la modulation de la douleur viscérale radio-induite.

6.3.2 L'utilisation des CSM comme agent antinociceptif

Lors d'études cliniques, l'effet potentiellement analgésique des CSM est souvent évoqué, comme par exemple dans l'étude de Ringdén *et al.*, (Ringdén *et al.*, 2007). Plus particulièrement, l'injection compassionnelle locale de CSM a permis une atténuation de la douleur de patients souffrant de brûlures radiologiques accidentelles (Tamarat *et al.*, 2012).

L'effet antalgique des CSM décrit par les patients suscite de nouveaux espoirs autour de leur utilisation thérapeutique, surtout dans le cas de douleurs dites « rebelles ».

Ces observations sont renforcées par certaines études expérimentales, publiées ces dernières années, et, qui sont abordées dans cette sous-partie 6.3.2.

6.3.2.1 Injection intrathécale

Tout d'abord, dans des modèles murins soumis à une lésion nerveuse, l'injection intrathécale de CSM, permet de réduire la douleur neuropathique.

Un tel effet a déjà été démontré dans un modèle de douleur neuropathique, induit par la ligature du nerf sciatique chez le rat. L'apparition d'une allodynie thermique et mécanique dès 3 jours et qui perdure jusqu'à 56 jours après l'opération a été observée chez les animaux. Cependant, l'injection intra-ganglionnaire ipsilatérale de CSM allogéniques, après la ligature nerveuse, a permis de prévenir l'apparition de l'allodynie mécanique et de diminuer la réponse aux stimuli froids, trois jours après la lésion. Chez les rats opérés et traités par CSM, de telles observations sont faites jusqu'à la fin de l'expérimentation. En revanche, lorsque le même type de protocole est utilisé avec des cellules non adhérentes mononuclées de la moelle osseuse, un tel effet antinociceptif ne peut être observé (Musolino *et al.*, 2007). Dans cette étude, les mécanismes d'action sous-tendant l'effet des CSM ne sont pas explicités. De plus, aucune donnée n'est fournie sur l'évolution de l'état de la lésion nerveuse chez ces animaux, qu'ils aient ou pas reçu le traitement. L'effet biologique des CSM pourrait ainsi être exclusivement antinociceptif et/ou lié à une action immuno-modulatrice ou neuro-réparatrice des cellules, dirigées vers le site lésionnel. En effet, les CSM sont injectées juste après l'établissement de la lésion nerveuse i.e. avant ou juste au commencement de l'apparition de la douleur. Il est donc légitime de se demander si l'absence d'apparition des symptômes douloureux chez ces animaux traités n'est pas le fait d'autres propriétés biologiques des CSM, comme leur capacité régénérative.

Ensuite, l'effet antinociceptif des CSM a aussi été étudié dans un modèle de lésions du nerf sciatique chez la souris. Dans ce modèle une allodynie mécanique et une hyperalgie thermique sont observées de 7 à 21 jours après l'opération. Dans cette étude, l'injection dans le ventricule cérébral de CSM, d'origine humaine, a été réalisée 4 jours après que les lésions nerveuses aient été effectuées. Une réduction de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgie thermique ont pu être mises en évidence dès 10 jours après la chirurgie chez les animaux traités (Siniscalco et al., 2010). Cette étude démontre la capacité des CSM à moduler une douleur neuropathique déjà établie, ceci six jours après leur injection. En outre, cet effet perdure dans le temps. Une modification du contexte inflammatoire et une diminution de l'activation microgliale et astrocytaire au niveau du cortex préfrontal sont les mécanismes mis en avant pour expliquer ce processus antinociceptif induit par les CSM (Siniscalco et al., 2010).

6.3.2.2 Injection systémique

Le bénéfice de l'injection par voie systémique de CSM sur la douleur neuropathique dans des modèles de rongeurs a également été évalué.

Dans un modèle de constriction du nerf sciatique chez le rat, pour lequel une allodynie mécanique et une hyperalgie thermique apparaissaient 5 jours après l'opération, Klass *et al.*, ont évalué le bénéfice antalgique de cellules mononuclées de moelle osseuse. L'injection a été réalisée par voie i.v., juste après la chirurgie, et a permis de mettre en évidence la disparition des réponses douloureuses 10 jours après la chirurgie, chez les animaux traités (Klass et al., 2007). Dans cette étude deux aspects peuvent être spécifiquement discutés. D'une part, l'effet unique des CSM dans ce processus observé n'est pas prouvé. En effet, dans ce contexte expérimental, un bénéfice des cellules non adhérentes mononuclée de la moelle osseuse ne peut être totalement exclu. D'autre part, 10 jours après la chirurgie, aucune différence morphologique ni de dégénérescence nerveuse ne sont mises en évidence au site de lésion, entre les animaux neuropathiques traités au PBS et ceux traités avec les cellules (Klass et al., 2007). Ces résultats suggèrent ainsi plutôt un effet antinociceptif que neuroprotecteur ou réparateur des cellules injectées en préventif.

Ensuite, Sciniscalo *et al.*, dans le même modèle d'étude que celui de leur étude de 2010, démontrent qu'une injection par voie i.v. de CSM humaines, quatre jours après avoir pratiqué l'acte chirurgical, permet la réduction de la réponse nociceptive aux stimulations mécaniques et thermiques. Ce phénomène a été décrit sept jours après l'injection et a perduré tout au long

de l'étude (Siniscalco et al., 2011). Dans cet article, les CSM humaines sont détectées au niveau du poumon, du nerf sciatique, du cortex pré-frontal mais surtout au niveau de la moelle épinière des souris neuropathiques, 26 jours après leur injection. Pour ce temps d'étude, au niveau de la moelle épinière, une diminution des cytokines pro-inflammatoires (IL1 β , IL17), une augmentation des cytokines anti-inflammatoires (IL10) ainsi qu'un "shift" phénotypique des macrophages de M1 vers M2 sont observés ; en comparant les animaux neuropathiques ayant reçu des cellules et ceux ayant reçu du PBS (Siniscalco et al., 2011). Cette modulation du contexte inflammatoire au niveau du système nerveux central favoriserait ainsi le maintien de l'effet antinociceptif des CSM à long terme.

Enfin, le bénéfice de l'injection de CSM par voie i.v. sur l'hypersensibilité mécanique dans un modèle de douleur neuropathique chez des rats soumis à des lésions du nerf facial a aussi été démontré. Cet effet antinociceptif est conservé quelque soit le moment de l'injection après la lésion (Guo et al., 2011). Ceci suggère que les CSM possèdent une réelle capacité à moduler les douleurs chroniques. En outre, l'effet anti-nociceptif perdure dans le temps, au moins jusqu'à 22 semaines après 1 seule injection. Les auteurs ont mis en avant la capacité des CSM à agir après leur injection en modulant, d'une part le système opioïdergique périphérique au cours des 3 premières semaines, et, d'autre part en modifiant le système opioïdergique central pendant plusieurs mois (Guo et al., 2011).

Un argument supplémentaire en faveur de l'utilisation thérapeutique des CSM afin de moduler les douleurs viscérales radio-induites est présenté dans la partie suivante.

6.3.3 Le cas de l'accident d'Epinal

Le bénéfice thérapeutique des CSM sur les complications gastro-intestinales radio-induites n'a, à notre connaissance, encore jamais fait l'objet d'études cliniques. Cependant, 3 des 24 patients atteints d'adénocarcinome de la prostate, traités par radiothérapie à Epinal, et ayant subi un surdosage d'environ 20 % de leur traitement (Peiffert et al., 2007) ont reçu des injections de CSM à titre compassionnel. Voswinkel *et al.*, ont récemment publié les résultats de cette étude. Une réduction des diarrhées, des hémorragies et des fistules associées à une diminution de l'activation des lymphocytes T et une hausse du nombre de lymphocytes T régulateurs sont notamment mises en évidence (Voswinkel et al., 2013). De plus, pour ces patients traités par CSM une diminution transitoire, pouvant aller jusqu'à quelques mois, de

leur douleur a ainsi été soulignée. Un de ces patients a même pu arrêter son traitement analgésique opioïdiques pendant cette période (Voswinkel et al., 2013).

Cette partie 6 permet ainsi de fournir l'argumentaire pour l'évaluation de la potentialité des CSM à moduler la douleur viscérale radio-induite.

CHAPITRE II

OBJECTIFS ET STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE

La mise en place de stratégies thérapeutiques adaptées au traitement de la « pelvic radiation disease », définie comme une pathologie multi-organes affectant particulièrement l'intestin, constitue un enjeu majeur en termes de santé publique.

Les symptômes gastro-intestinaux cliniques de tels patients et d'individus atteints d'IBS ou d'IBD sont relativement similaires. En outre, les mécanismes biologiques sous-tendant les symptômes de l'IBS et de l'IBD ont déjà fait l'objet de nombreuses études. Néanmoins, un même symptôme peut traduire des désordres physiologiques distincts. La stratégie thérapeutique à appliquer diffère ainsi selon son étiologie. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires, à l'origine des symptômes gastro-intestinaux radio-induits, est donc indispensable pour une prise en charge thérapeutique optimale des « survivants au cancer » de la zone pelvienne.

Dans ce contexte, depuis environ dix ans, les dommages radio-induits intestinaux font l'objet d'études expérimentales au sein du LR2I. Parmi les complications de la « pelvic radiation disease », la douleur viscérale radio-induite n'avait jusqu'à présent fait l'objet d'aucune étude expérimentale.

L'efficacité thérapeutique des CSM, déjà démontré dans diverses conditions pathologiques, a orienté le choix du LR2I dans l'évaluation d'une telle stratégie thérapeutique dans le contexte du traitement des altérations radio-induites chez l'animal. L'étendue de leur potentiel thérapeutique a depuis été démontrée dans divers modèles animaux atteints de lésions intestinales radio-induites. Les expériences du laboratoire ont d'ailleurs permis de mettre en évidence le bénéfice de l'injection en systémique de CSM après irradiation dans: (i) la réduction de la gravité des lésions intestinales (Linard et al., 2013; Sémont et al., 2006, 2010, 2013), (ii) la modulation des processus inflammatoires (Bessout et al., 2013; Linard et al., 2013), (iii) la restauration de la fonctionnalité d'absorption et de sécrétion des cellules épithéliales (Sémont et al., 2010, 2013) et enfin, (iv) la restauration partielle de la barrière épithéliale intestinale (Sémont et al., 2010, 2013) (données internes au laboratoire).

Mon travail doctoral, au sein du laboratoire, s'inscrit dans la continuité des travaux de recherche précédemment décrits. Plus particulièrement, notre équipe a développé et caractérisé un modèle d'ulcération colorectale radio-induite chez le rat. Ce modèle permet de reproduire, chez le rat, au niveau colique, des lésions similaires à celles observées chez les patients traités par radiothérapie pour des adénocarcinomes rectaux (François et al., 2013;

Sémont et al., 2013). Cependant, les conditions de validité de ce modèle expérimental en tant que modèle d'hypersensibilité viscérale radio-induite chronique n'avaient encore jamais été identifiées jusqu'alors. Or, cette étape était primordiale pour l'étude de la physiopathologie d'une telle hypersensibilité ainsi que pour l'évaluation du potentiel antalgique des stratégies thérapeutiques envisagées.

Dès lors, mon premier objectif a été la validation d'un modèle d'hypersensibilité viscérale radio-induite persistant pertinent, par le biais d'une étude cinétique (socle de mon étude).

Mon deuxième objectif a été de caractériser les mécanismes biologiques périphériques sous-tendant cette hypersensibilité dans le modèle validé. L'étude bibliographique présentée dans la partie 5 du chapitre I, nous a permis d'envisager deux options :

- L'implication des MC et de leurs interactions avec les fibres nerveuses dans les mécanismes de la sensibilisation périphérique.
- L'évaluation probable de l'impact d'un autre dysfonctionnement colique radio-induit, en l'occurrence la contractibilité musculaire dans notre modèle.

Enfin, mon troisième objectif a été d'évaluer le potentiel antinociceptif de l'injection de CSM, par voie i.v, dans le modèle d'hypersensibilité viscérale radio-induite, préalablement validé et caractérisé. Plus précisément deux aspects ont été abordés:

- Les conditions expérimentales optimales de l'utilisation des CSM ont été recherchées. L'influence de divers paramètres tels que, le moment de l'injection après irradiation, le nombre de cellules à injecter ou l'évolution dans le temps de leur effet antinociceptif, ont été évalués. Le choix des conditions expérimentales pour la réalisation de cet objectif a été défini sur la base des données bibliographiques publiées par diverses équipes dont la nôtre, mais aussi grâce aux données obtenues successivement à la réalisation du premier objectif.
- Une analyse mécanistique sous-tendant leur effet antinociceptif a été initiée dans des conditions expérimentales adaptées. La caractérisation des mécanismes cellulaires et des altérations physiologiques périphériques sous-tendant l'hypersensibilité viscérale radio-induite, opérée plus tôt (deux premiers objectifs), nous a fourni des indications pertinentes pour orienter ces derniers travaux de recherche réalisés au niveau du côlon irradié.

Les résultats obtenus au cours de ce projet doctoral sont présentés dans les chapitres III (article 1) et IV (résultats complémentaires) de ce manuscrit de thèse.

CHAPITRE III

ARTICLE1 : PERSISTENT VISCERAL HYPERSENSITIVITY IN RAT EXPOSED TO RADIATION IS MITIGATED BY MESENCHYMAL STROMAL CELL TREATMENT

**LES CELLULES STROMALES MÉSENCHYMATEUSES MODULENT L'HYPERSENSIBILITÉ VISCÉRALE
PERSISTANTE DANS UN MODÈLE D'ULCÉRATION COLORECTALE RADIO-INDUITE CHEZ LE RAT
(SOUMIS A GASTROENTEROLOGY)**

Les cellules stromales mésenchymateuses modulent l'hypersensibilité viscérale persistante dans un modèle d'ulcération colorectale radio-induite chez le rat

Contexte et objectifs de l'étude

La douleur viscérale chronique fait partie des effets secondaires observés chez les patients traités pour des cancers de la zone pelvienne. Ces douleurs sont notamment la conséquence des altérations biologiques qui apparaissent successivement à l'exposition de l'intestin (sain) aux rayonnements ionisants lors de la radiothérapie. Dans les cas les plus graves, ces douleurs détériorent considérablement la qualité de vie de ces « survivants au cancer », et, les stratégies thérapeutiques à disposition ne sont pas satisfaisantes. Pourtant, aucune étude expérimentale n'a jusqu'alors été menée pour répondre à cette problématique.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été (i) de valider un modèle d'étude d'hypersensibilité viscérale persistante radio-induite et, (ii) de caractériser certains des mécanismes périphériques qui pouvaient être impliqués dans sa physiopathologie.

Des études ont déjà été menées sur les mécanismes périphériques impliqués dans l'hypersensibilité viscérale, notamment dans des modèles de rongeur d'IBS et d'IBD. Ces études mettent en avant le rôle de modifications neuroplastiques et/ou neurochimiques ainsi que l'implication des MC, et notamment de leurs interactions exacerbées avec les fibres nerveuses, dans les mécanismes de la sensibilisation périphérique. A ce titre, nous avons étudié ces altérations biologiques et l'implication de ces cellules dans notre modèle.

En outre, le bénéfice thérapeutique des CSM a déjà été démontré, notamment expérimentalement chez l'animal, dans divers modèles pathologiques. Plus particulièrement, leur utilisation a permis la diminution de la sévérité des lésions intestinales et la modulation des processus inflammatoires observés après irradiation. De plus, certaines études démontrent aussi le potentiel antinociceptif des CSM dans des modèles de rongeur de douleurs neuropathiques.

Ainsi, dans cette étude, (iii) le potentiel antinociceptif des CSM dans la modulation de l'hypersensibilité viscérale radio-induite persistante a été évalué, et (iv) certains de leurs mécanismes d'action, au niveau périphérique, ont été suggérés.

Résultats principaux de cette étude

Dans un premier temps, en utilisant le test de viscéro-sensibilité motrice en réponse à des distensions colorectales (cf. chapitre I partie 1.1) nous avons démontré, dans un modèle d'ulcération colorectale radio-induite chez le rat (cf. chapitre V partie 1.1), une allodynie mécanique 2, 4 et 8 semaines après irradiation. Chez les animaux irradiés nous avons également quantifié dans les laminae I, II, III et IV (immuno-marquage) de la corne dorsale de la moelle épinière L6-S1, une augmentation des neurones exprimant p-ERK (utilisé comme marqueur de l'activation neuronale). Le facteur d'augmentation de cette activation neuronale entre les animaux irradiés et les animaux contrôles est de 7, deux semaines après irradiation, et, de 2, quatre et 8 semaines après irradiation. Ce résultat atteste d'une sensibilisation centrale persistante dans notre modèle. L'ensemble de ces éléments nous ont ainsi permis de valider notre modèle d'étude comme étant un modèle pertinent pour l'étude de d'hypersensibilité viscérale persistante induite par l'irradiation.

Dans un deuxième temps, en utilisant des techniques immuno-histochimiques nous avons démontré la mise en place de phénomènes neuroplastiques et neurochimiques au niveau du côlon, et ceci 4 semaines après irradiation. Nous avons démontré, chez les animaux irradiés, une augmentation par rapport aux animaux témoins du nombre de plexus sous-muqueux, par unité de surface de sous-muqueuse, ainsi qu'une augmentation du nombre de neurones dans ces plexus. Au niveau de la LP, nous avons aussi caractérisé une hyperplasie des fibres nerveuses, associée à une augmentation de l'immuno-marquage de la SP, de la CGRP et de la synaptophysine (protéine membranaire de la vésicule synaptique) chez les animaux irradiés par rapport aux animaux témoins. Nous avons ensuite mis en avant une augmentation par RT-PCR de l'expression du NGF dans la sous-muqueuse et la muqueuse colique des rats irradiés. L'ensemble de ces éléments atteste d'une sensibilisation périphérique au niveau du côlon des rats irradiés depuis 4 semaines.

Puis, nous avons montré que les MC (coloration au bleu de toluidine) envahissent progressivement l'ensemble des compartiments coliques après irradiation (cinétique effectuée 2, 4 et 8 semaines après irradiation). Une augmentation statistique du nombre de MC exprimant la tryptase (immuno-marquage) a notamment été mise en évidence au niveau de la sous-muqueuse, 4 semaines après irradiation. De plus, l'augmentation de l'aire de répartition

du marquage tryptase après irradiation, associée à une hausse de la quantité de tryptase (test ELISA) dans les fèces des rats irradiés, pourraient correspondre à un état d'activation accrue des MC. Par un co-marquage de la tryptase et du marqueur des fibres nerveuses, PGP9.5, nous avons montré une augmentation des interactions neuro-immunitaires entre les MC tryptase+ et les fibres nerveuses, après irradiation, au niveau de la sous-muqueuse colique des animaux irradiés. Ces éléments suggèrent une implication des MC dans la physiopathologie de l'hypersensibilité viscérale radio-induite observée. Nous avons donc souhaité évaluer leur implication fonctionnelle dans de tels mécanismes. Pour cela nous avons effectué un traitement au kétotifène qui est un stabilisateur mastocytaire. Ce traitement journalier qui a débuté 4 semaines après l'irradiation a été réalisé pendant une semaine. Il a permis d'obtenir une réversion de l'allodynie mécanique chez les animaux irradiés et traités par kétotifène. L'ensemble de ces résultats atteste de l'implication des MC dans les mécanismes périphériques sous-tendant l'hypersensibilité viscérale radio-induite.

Enfin nous avons procédé à l'injection par voie i.v. de 1,5 millions de CSM, chez des animaux irradiés depuis 4 semaines. Nous avons démontré qu'une injection de CSM permettait de reverser l'allodynie mécanique radio-induite 7 jours après le traitement (cet effet n'a pas été observé un jour après l'injection). Nous avons ensuite procédé au même type d'immuno-marquage que précédemment cité et procédé à des quantifications au niveau de la sous-muqueuse des rats. Bien que l'injection de CSM n'ait pas modifié le nombre de MC tryptase+, elle a permis d'obtenir une diminution de la surface de marquage des MC par la tryptase et du pourcentage des MC tryptase+ à proximité des fibres nerveuses, en comparaison à des animaux irradiés et traités avec du PBS. De plus la quantité de tryptase dans les fèces des animaux irradiés et traités par CSM a été diminuée par rapport à celle retrouvée chez des animaux irradiés ayant été injectés en PBS.

Conclusion

Ces résultats permettent de valider un modèle d'étude d'hypersensibilité viscérale radio-induite persistante. Ils démontrent aussi dans un contexte pathologique intestinal radio-induit une implication des MC dans les mécanismes périphériques sous-tendant une telle hypersensibilité. Cette étude démontre également le potentiel antinociceptif des CSM, capables de reverser l'allodynie mécanique radio-induite. Enfin, ces résultats suggèrent qu'un tel bénéfice thérapeutique pourrait notamment impliquer la capacité des CSM à moduler la physiologie des MC et leurs interactions avec les fibres nerveuses coliques.

L'ensemble de ces travaux apporte de nouveaux arguments sur le bénéfice thérapeutique des CSM dans notre modèle d'étude. L'évaluation de l'effet observé à plus long terme ainsi que l'approfondissement des mécanismes impliqués dans cet effet antinociceptif représentent les perspectives majeures dans la poursuite de ce travail.

Persistent visceral hypersensitivity in rat exposed to radiation is mitigated by mesenchymal stromal cell treatment

Short title: MSCs alleviate radiation-induced visceral pain

**CHRISTELLE DURAND¹, SOPHIE PEZET^{2,3,4}, HELENE EUTAMENE⁵,
CHRISTELLE DEMARQUAY¹, NOELLE MATHIEU¹, LARA MOUSSA¹, RACHEL
DAUDIN¹, VALERIE HOLLER¹, JEAN CHRISTOPHE SABOURIN⁶, FABIEN
MILLIAT⁷, AGNES FRANCOIS⁷, VASSILIA THEODOROU⁵, MARC
BENDERITTER¹, ALEXANDRA SEMONT¹**

1 : Research Laboratory on the Regeneration of Irradiated Healthy Tissues, Institute for Radiological

Protection and Nuclear Safety, Fontenay-aux-Roses, France

2 : Brain Plasticity Unit, ESPCI-ParisTech, Paris, France,

3 : Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 8249, Paris, France,

4 : PSL, Paris, France

5 : INRA, EI-Purpan, UMR 1331 TOXALIM, Neuro-Gastroenterology and Nutrition Team, Toulouse,

France

6 : Department of Pathology, Rouen University Hospital, Rouen, France

7 : Radiobiology and Radiopathology Research Laboratory, Institute for Radiological Protection and

Nuclear Safety, Fontenay-aux-Roses, France

Abbreviations: CGRP, Calcitonin Gene-Related Peptide; CI, Colorectal irradiation; CRD, Colorectal response to distension; LP, Lamina propria; MCs, Mast-cells; MSCs, Mesenchymal stromal cells; NFs, Nerve fibers; PAR2, Protease-activated receptors 2; PGP9.5, Protein gene product 9.5; SP, Substance P; VH, Visceral hypersensitivity; VMR, Visceromotor response

Correspondence:

SEMONT Alexandra, PhD, Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety, PRP-HOM/SRBE/LR2I, BP 17, 92 262 Fontenay-aux-Roses, France,

E-mail:alexandra.semont@irsn.fr, Tel: 33 1 58 35 95 33, Fax: 33 1 58 35 84 67.

Conflict of interest: the authors declare no competing financial interests and disclose no conflicts.

Author contributions:

CHRISTELLE DURAND: conception and design of the study, generation, collection, assembly analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript

SOPHIE PEZET: assembly analysis and interpretation of data, revision of the manuscript

HELENE EUTAMENE: interpretation of data, technical support

CHRISTELLE DEMARQUAY: technical support, generation, collection, assembly analysis and interpretation of data

NOELLE MATHIEU: generation and interpretation of data

LARA MOUSSA: generation and interpretation of data

RACHEL DAUDIN: generation of data

VALERIE HOLLER: interpretation of data, technical support

JEAN CHRISTOPHE SABOURIN: material support (collected human tissue)

FABIEN MILLIAT: material support (creation of human tissue bank), interpretation of data

AGNES FRANCOIS: material support (creation of human tissue bank), interpretation of data

VASSILIA THEODOROU: interpretation of data

MARC BENDERITTER: study co-supervisor

ALEXANDRA SEMONT: study supervisor, conception and design of the study, generation, collection, assembly analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript, approval the final version of the manuscript.

Keywords: pelvic radiotherapy; cell therapy; visceral pain; mast cells

ABSTRACT

Background & Aims: Delayed development of visceral complications after pelvic radiotherapy is recognized in cancer survivors and is frequently associated with visceral pain. The underlying mechanisms are unknown, making management of the pain difficult. We sought to identify some peripheral mechanisms of radiation-induced persistent visceral hypersensitivity and to evaluate the potential therapeutic benefit of mesenchymal stromal cells (MSCs).

Methods: Rats were subjected to a single 27 Grays colorectal irradiation (CI). Visceral sensitivity to colorectal distension, central sensitization (ERK phosphorylation in L6-S1 spinal cord neurons) and the number of colonic mast cells (MCs) were assessed 2, 4 and 8 weeks after CI. Anatomical interactions of tryptase+ MCs with PGP9.5+ nerve fibers (NFs) were quantified on colonic sections of irradiated rats and on rectal resections of patients treated by radiotherapy. Four weeks after CI, rats received an intravenously injection of 1.5 million MSCs. Visceral sensitivity and MC-NF anatomical interactions were then evaluated.

Results: CI induced persistent mechanical allodynia and central sensitization. At 4 weeks post-irradiation, we showed hyperplasia of MCs and NFs in the colonic submucosa, as well as, an increased number of MCs in close proximity to NFs. Such cross-interaction increase was also demonstrated in human rectal tissues. Remarkably, MSC treatment reversed radiation-induced mechanical allodynia 1 week after their administration in rats. This effect was associated with reduction of both the number of anatomical interactions between MCs and NFs and tryptase content in the feces.

Conclusions: This work provides new insights into the ability of MSCs to diminish radiation-induced visceral toxicity. Neuroimmune modulation may be related to anti-nociceptive effects of MSCs.

INTRODUCTION

Each year, millions of people are treated for primary or recurrent pelvic malignancies worldwide, involving radiotherapy in almost 50% of cases. Improvements in cancer therapy have led to a growing population of long-term cancer survivors. Nevertheless, during radiotherapy, healthy pelvic tissues or organs close to the tumor and located in the irradiated field may be damaged, leading to high incidence of undesirable persistent toxic effects. Moreover, the alteration and inflammation of one visceral organ may trigger functional alterations of other organs by cross-organ sensitization.¹ Indeed, cancer survivors often exhibit overlapping symptoms resulting from multiple organ dysfunctions which have been recently recognized as a new pathology called “pelvic radiation disease”.² Clinical studies showed that, depending upon the type of tumor or the time since radiotherapy, up to 50% of these cancer survivors suffer from chronic visceral pain or tenesmus.^{3, 4} Visceral organ cross-sensitization may amplify afferent signaling, leading to exacerbation of pain. Persistent pain considerably affects the patient’s quality of life and may be a factor in the development of psychiatric co-morbidity. The cellular and molecular mechanisms involved in the development of visceral pain after pelvic radiotherapy are unknown, resulting in a lack of appropriate therapeutic strategies.

Some of the mechanisms underlying the visceral hypersensitivity (VH) described in other functional gastrointestinal disorders are related to pathological enhancement of neuroimmune interactions. Mast cells (MCs) and nerve fibers (NFs) are known to form a functional unit in the regulation of gut physiology. Neuropeptides released by sensory fibers, such as substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP), can activate MCs, which then secrete mediators (*e.g.* tryptase) that stimulate sensory fibers. Abnormal enhancement of MC infiltration and/or activation can perturb nerve function, leading to neurogenic inflammation

and therefore visceral pain. Stimulation of such neuroimmune interactions has been described as being partly involved in radiation-induced intestinal toxicity.⁵⁻⁹

There is currently no effective therapeutic drug approved by the USA Food and Drug Administration for the reduction of radiation-induced toxicity in the gastrointestinal tract.¹⁰ Treatments usually applied to manage complications are only symptomatic. We recently reported the regenerative and anti-inflammatory properties of MSCs in the context of radiation-induced irreversible damage of rat colon and minipig rectum.¹¹⁻¹³ Quite different from pharmacological therapy, MSC treatment may have the key advantage of managing organ toxicity in a site-specific manner.¹⁴ Moreover, the pleiotropic properties of MSCs could be helpful in dealing with the multifactorial aspects of radiation-induced chronic VH and, more generally, in limiting the functional consequences of radiation-induced toxicity in the pelvis.

The present study was designed to (i) validate a pre-clinically relevant experimental model of radiation-induced VH, (ii) investigate colonic mechanisms involved in the development of persistent VH after radiation exposure, and (iii) assess the potential therapeutic benefit of MSC treatment and corresponding mechanisms of action. Mechanisms studied in this work were focused on the deregulation after irradiation of physiological crosstalk between MCs and NFs and its rescue after MSC treatment.

MATERIALS AND METHODS

Animals:

300 g male Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, France) were housed under a 12-hour light /12-hour dark cycle and kept in a temperature-controlled room (21°C). Experiments were performed in compliance with French laws and guidelines for animal experimentation (Act no.92-333 of 2 October 2009) and approved by the IRSN Ethics Committee “CEEA number 01013.01”.

Ionizing radiation protocol:

A single 27-Grays (Gy) dose of gamma irradiation was delivered by a cobalt 60 source (1 Gy/ min) through a 2 x 3 cm window centered on the rat colorectal region during isoflurane inhalation. Control groups were submitted to the same anesthetic procedure without ionizing radiation. The choice of the ionizing radiation protocol is detailed in the supplementary materials and methods.

MSC culture and characterization:

MSCs were prepared according to the methods of Rochefort et al.¹⁵ Quality control of the MSC product was performed (see the supplementary materials and methods).

Evaluation in rats of visceral sensitivity in response to colorectal distension:

The visceromotor response (VMR) is a pseudoaffective reflex contraction of the abdominal muscles in response to colorectal distension (CRD). Seven days prior to the beginning of the experiment, 3 pairs of nickel-chromium wire electrodes (NIK80, Sandvik Materials Technology, France) were implanted during isoflurane anesthesia into the oblique external abdominal muscle and exteriorized at the back of the neck in a glass tube.¹⁶ Rats were singly housed after surgery. The animals' behavior and weight were monitored daily and animals

exhibiting any sign of infection, stress or suffering were euthanized. Several days before the CRD, in order to reduce the stress induced by restraint, rats were habituated to being held for 30 min in an 8-cm diameter polypropylene tunnel. The day of the experiment, rats were placed in this tunnel and an arterial embolectomy catheter (Fogarty, Edwards Laboratories Inc.) covered by a lubricated latex balloon was introduced into the colon. The catheter was fixed to the tail with adhesive tape and connected to a computerized barostat (Distender Series II Barostat, G&J Electronics Inc., Toronto, Ontario, Canada). The myoelectric recording signals were amplified and filtered (50-5000 Hz) by Power Lab System (Labchart, ADInstruments limited, GB). Isobaric distensions were performed from 0 to 60 mmHg with an increasing step of 15 mmHg. Each distension step lasted 5 minutes. For the experiments involving MSC or ketotifen treatments, we checked in 5 control and irradiated rats that vehicle (PBS) administration did not change VMR to CRD, compared with the corresponding basal level of response, assessed just before the beginning of the vehicle treatment. Taking this into account, each animal served as its own control in assessing treatment effects on the VMR to CRD. We also verified that treatments did not modify intestinal volume (intestinal compliance) compared with the basal condition.

Analysis of biological parameters:

Full methods describing: i) tissue preparation and protein extraction, ii) histology and immunohistochemistry, and iii) ELISA, are presented in the supplementary materials and methods section.

Experimental design:***Identification and validation of a model of radiation-induced persistent VH:***

Time-dependent effects of CI were analyzed in six groups of rats, 3 groups of irradiated rats (tested respectively at 2, 4 and 8 weeks after irradiation) and their corresponding control groups. The VMR to CRD was studied first. In another series of experiments, immunohistochemical analysis of p-ERK was used to study over time signs of central sensitization at spinal levels L6-S1, where visceral afferents terminate. In another set of experiments sections of distal colon from both control and irradiated animals were processed for HuC/D (human neuronal protein), PGP9.5 (protein gene product 9.5), synaptophysin, SP and CGRP immunolabeling.

Role of MCs in radiation-induced persistent VH:

In a first series of experiments, the number of MCs after CI was quantified 2, 4, and 8 weeks after irradiation using colonic sections stained with toluidine blue (supplementary analysis, figure 1). Other experiments were then performed 4 weeks after irradiation. Colonic sections were double immunostained for tryptase and PGP9.5 to assess both the tryptase load of MCs and the anatomical interaction between MCs and NFs. Such anatomical interaction was also assessed on resected human rectum that was retrieved from patients 6 weeks after the end of pelvic radiotherapy (full methods are described in the supplementary materials and methods). In order to evaluate the functional involvement of MCs in persistent radiation-induced VH, the VMR to CRD was tested after treatment with ketotifen, a MC stabilizer (K2628, Sigma Life Science). Briefly, after basal VMR to CRD recording in control rats and irradiated rats (4 weeks post-CI), animals of each group received either ketotifen or vehicle twice a day (1 mg/kg/day) by oral gavage for 1 week. Feces of rats were then collected at the end of treatment (day 7) and subsequently CRD was performed and the abdominal response

was evaluated. The effectiveness of the ketotifen treatment was confirmed by reduction of tryptase content in the feces of irradiated (but not control) animals (ELISA).

Effect of MSC treatment on persistent radiation-induced VH and associated mechanisms of action

To obtain basal visceral sensitivity in each animal, VMR to CRD was first recorded in control and irradiated rats (4 weeks post-CI). Irradiated rats were then anesthetized with isoflurane and given tail vein injection of 1.5 million MSCs or vehicle. Twenty-four hours and 1 week after MSC administration, CRD was performed and the abdominal response was measured. Using the same experimental protocol, 1 week after injection we tested the effect of MSCs on the anatomical interaction between MCs and NFs and on the possible changes in tryptase+ MC granule size (double immunolabeling with tryptase and PGP9.5 of colonic sections). Fecal tryptase content was quantified by ELISA.

Statistical analysis

Results are expressed as mean $\pm$ SEM (standard error of the mean). Statistical analyses were performed using Sigma Plot 11.0 software (Systat Software Incorporation). Differences between 2 or 3 groups were respectively analyzed using the unpaired Student's t test or one-way ANOVA followed by the Tukey test, with $P < .05$ considered as statistically significant (significance for analyses was set at * $P < .05$ vs control, ** $P < .001$ vs control, + $P < .05$ versus IR).

Full methods available in Supplementary materials and methods

RESULTS

Characterization of an experimental model of radiation-induced long-lasting VH in rats

CI induces persistent allodynia

The VMR to CRD was measured in order to evaluate visceral sensitivity induced over time by 27 Gy CI (Figure 1). We observed a strong and lasting (2-8 weeks post-irradiation) increased responsiveness to low pressures of visceral distension, suggesting a persistent allodynia ($P < .05$). At higher pressures (45 and 60 mmHg), a reduced visceral response was observed 2, 4 and 8 weeks after irradiation compared with controls ($P < .05$). This result suggests that graded and repeated high pressures of CRD in the irradiated animals could favor partial NF desensitization and/or the enhancing of inhibitory controls of nociception.

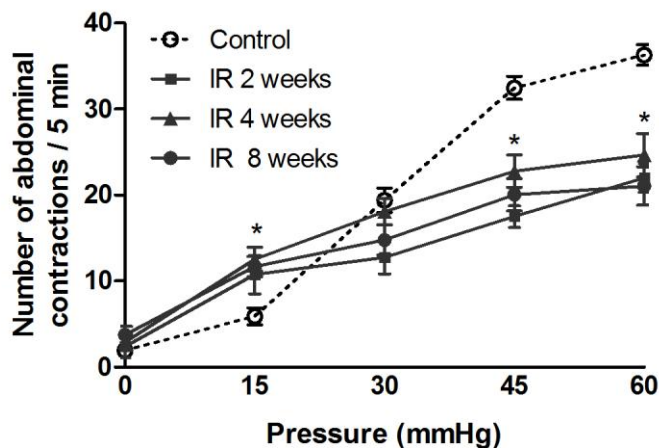


Figure 1

Figure 1: Time-dependent effect of CI on the VMR to CRD. Visceral sensitivity curves were recorded 2 (n=8), 4 (n=18) and 8 (n=12) weeks after irradiation and compared with their own controls. For each time tested, there were no statistical differences compared with the values obtained for the control rats. We therefore pooled them (n=29). Irradiation induced mechanical allodynia (at 15 mmHg) and a hyporesponse (at 45 and 60 mmHg). Results are expressed as the mean $\pm$ SEM (8-29 rats). * $P < .05$ vs control rats.

CI induces persistent central neuronal hyperactivation

To evaluate if this radiation-induced chronic VH was associated with spinal sensitization, we studied the neuronal phosphorylation of ERK (p-ERK), an indirect marker of neuronal activation, at spinal levels L6-S1 (Figure 2). After CI, we observed strong and significant p-ERK labelling of NeuN+ neurons of laminae I-II, where nociceptive-specific neurons are located. A 7-fold increase ($P < .001$) of p-ERK+ neurons was observed 2 weeks after irradiation compared with the basal level. Four and 8 weeks after irradiation, enhancement of neuronal activation stabilized at twice the basal level ($P < .05$). In laminae III-IV, where non-specific nociceptive neurons are located, a similar response pattern was observed. Our results demonstrate that irradiation leads to long-lasting spinal sensitization in this rat model.

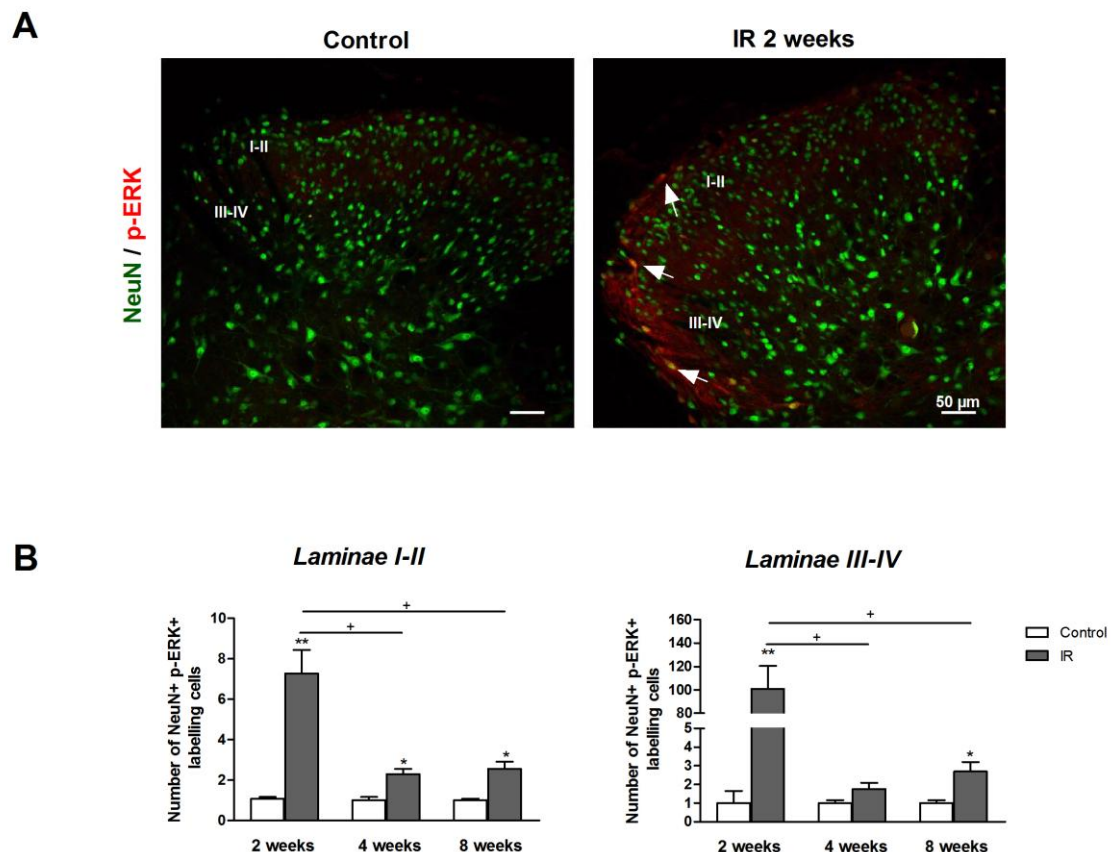


Figure 2

Figure 2: Time-dependent effect of CI on central sensitization: (A) Representative double-immunostaining for p-ERK and NeuN in spinal sections at the L6-S1 levels in control and irradiated rats (2 weeks post-irradiation). (B) Histograms represent the number of NeuN+ with p-ERK+ neurons in laminae I-II and III-IV per spinal cord section, 2, 4 and 8 weeks after irradiation. Data are represented as mean $\pm$ SEM in 4 rats per group and normalized to their corresponding controls ** $P < .001$ vs control rats, * $P < .05$ vs control rats and + $P < .05$ vs irradiated rats (2 weeks post-CI). These results showed that abnormal neuronal activation stabilized (twice the control) between 2 and 4 weeks after irradiation.

CI induces neuroplasticity in the colon at 4 weeks

Two weeks post-CI, the immunostaining of colonic sections for PGP9.5 or HuC/D did not reveal marked changes between control and irradiated rats (data not shown). In contrast, at 4 weeks post-CI, the number of PGP9.5+ submucosal plexuses (Figure 3Aa), as well as, the number of HuC/D+ neurons per plexus (Figure 3Ab), was significantly increased ($P < .05$ and $.001$, respectively). At the same time, we also observed an increase in the density of PGP9.5+ NFs in the submucosa (Figure 3B). Moreover, in the lamina propria (LP), there was a significant ($P < .001$) increase in the density of PGP 9.5+ fibers (Figure 3B and Ca), which was associated to a significant increase ($P < .001$) of synaptophysin (a protein of the presynaptic vesicle membrane), suggesting enhanced synaptic function and/or synaptogenesis (Figure 3B and Cb). The density of SP and CGRP immunostaining was also significantly greater in the LP, 4 weeks after irradiation ($P < .05$ and $.001$, respectively), corresponding to increased content and possibly release of algogenic substances in the colon (Figure 3B, Cc and Cd). Most of the SP and CGRP immunoreactivity co-localized with PGP9.5, which is indicative of a neural origin of these substances (data not shown).

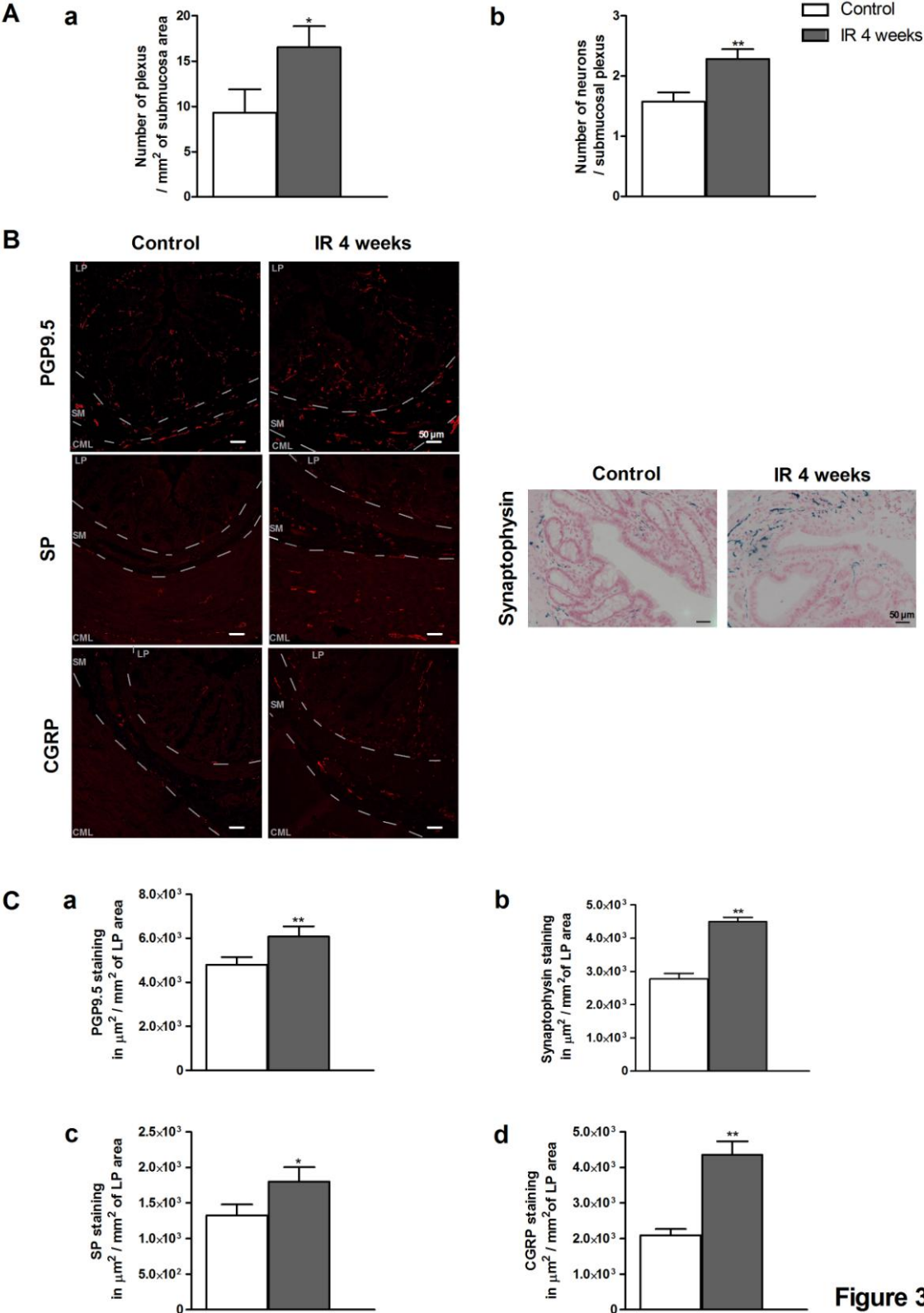


Figure 3

Figure 3: Effect of CI on colonic neuroplasticity (at 4 weeks). Histograms (A) represent the quantification 4 weeks after CI of (a) the number of PGP9.5-immunoreactive nerve plexuses per submucosal area (in mm²) and (b) the number of HuC/D+ neuronal cell bodies per submucosal nerve plexus. (B) Representative photomicrographs of NF immunopositive for PGP9.5, SP, CGRP and synaptophysin. (C) Quantitative analyses in the lamina propria presented as mean $\pm$ SEM in 6 rats per group. *P < .05 vs control rats or **P < .001 vs control rats. Data showed that radiation-induced colonic hyperplasia of the nervous system is associated with increased content of SP and CGRP in the colon. Lamina propria (LP), Submucosa (SM) and Circular muscle layer (CML).

Implication of MCs in CI-induced VH

CI increases MC hyperplasia and hypertrophy in the submucosa of rat colon

Irradiation resulted in a marked increase in the number of submucosal MCs, starting 4 weeks after CI (Figure 4A and Ba and Supplementary figure 1). At 4 weeks, these cells were fully tryptase+ (likely near the degranulation step), as evidenced by the significant ($P < .001$) 4.7-fold increase in the number of tryptase+ MCs with intracellular granules exceeding an area of 80 μm^2 in comparison with controls (Figure 4Bb).

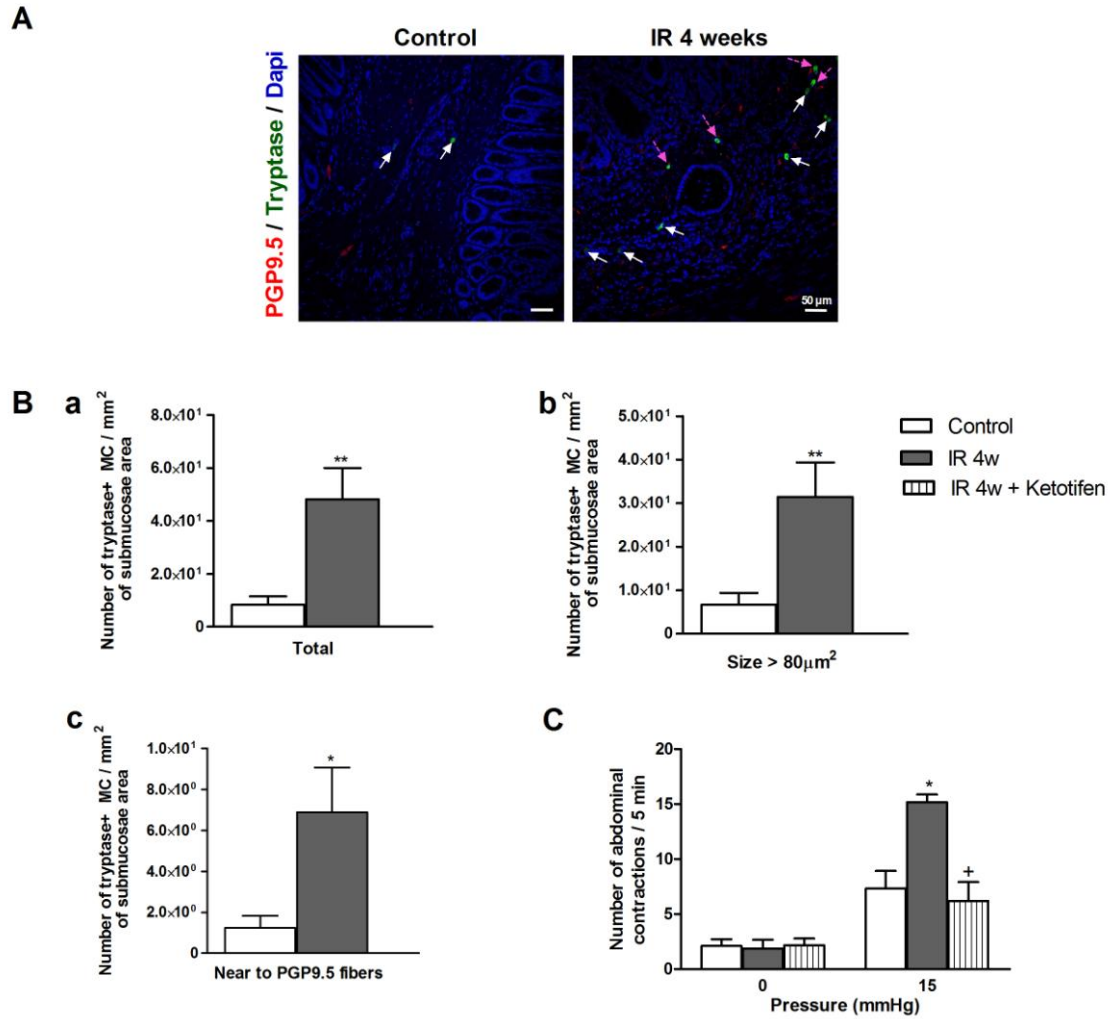


Figure 4

Figure 4: Involvement of MCs in CI-induced VH

(A) Representative double immunostaining of submucosal tryptase+ MCs and PGP9.5+ NFs in colonic sections of control rats and irradiated rats (4 weeks post-CI). Arrows show some MCs far from the NFs (white) or near the NFs (pink). (B) Experimental data were summarized in histograms that represent the tryptase+ MC number (a) with granulation size > 80 μ m² (b) and in close proximity (distance < 2 μ m) to PGP9.5 NFs (c). (C) Effect of 1-week ketotifen treatment on the VMR to CRD (15 mmHg). Each group represents the mean immunohistological analyses $\pm$ SEM in 6 to 7 rats per group, and 8 to 10 rats for VMR, *P < .05 vs control rats, +P < .05 vs irradiated rats (4 weeks post-CI). Four weeks after CI, high levels of tryptase+ MCs were in close association with NFs, and MC stabilization at this time reversed radiation-induced mechanical allodynia.

Irradiation induces changes in the anatomical relationship between MCs and NFs in the rat colon and in the human rectum

An average of 1.3 ± 0.6 tryptase+ MCs/mm² of tissue was found in close proximity (<2 µm) to PGP 9.5+ NFs in the submucosa of rat control colonic sections. This number reached 6.9 ± 2.2 at 4 weeks post-irradiation (Figure 4A and Bc). Nerve growth factor (NGF) is usually thought to play a prominent role in MC-NF reciprocal interactions.¹⁷ Quantification of mucosal/submucosal NGF expression using RT-PCR in rats demonstrated a significant ($P < .05$) 4-fold increase in its expression after CI (n=8 to 11) (data not shown). These data support the assumption of an enhancement of the crosstalk between MCs and NFs in irradiated rats. As previously observed by our team and others¹⁸⁻²⁰, we confirmed that radiation-induced damage to the human bowel (here the rectum) is associated with mucosal (data not shown) and submucosal hyperplasia of both NFs and MCs (Figure 5A and Ba). We observed that a large majority of MCs infiltrating in the LP of the uninjured or injured rectum were found in close anatomical interaction with NFs (data not shown). In the submucosa, we found a significant increase ($P < .05$) of the number of MCs in close proximity (<2 µm) to NFs in injured tissues, compared with uninjured tissues (17.3 ± 1.8 vs 10.6 ± 1.8 , Figure 5A and Bb).

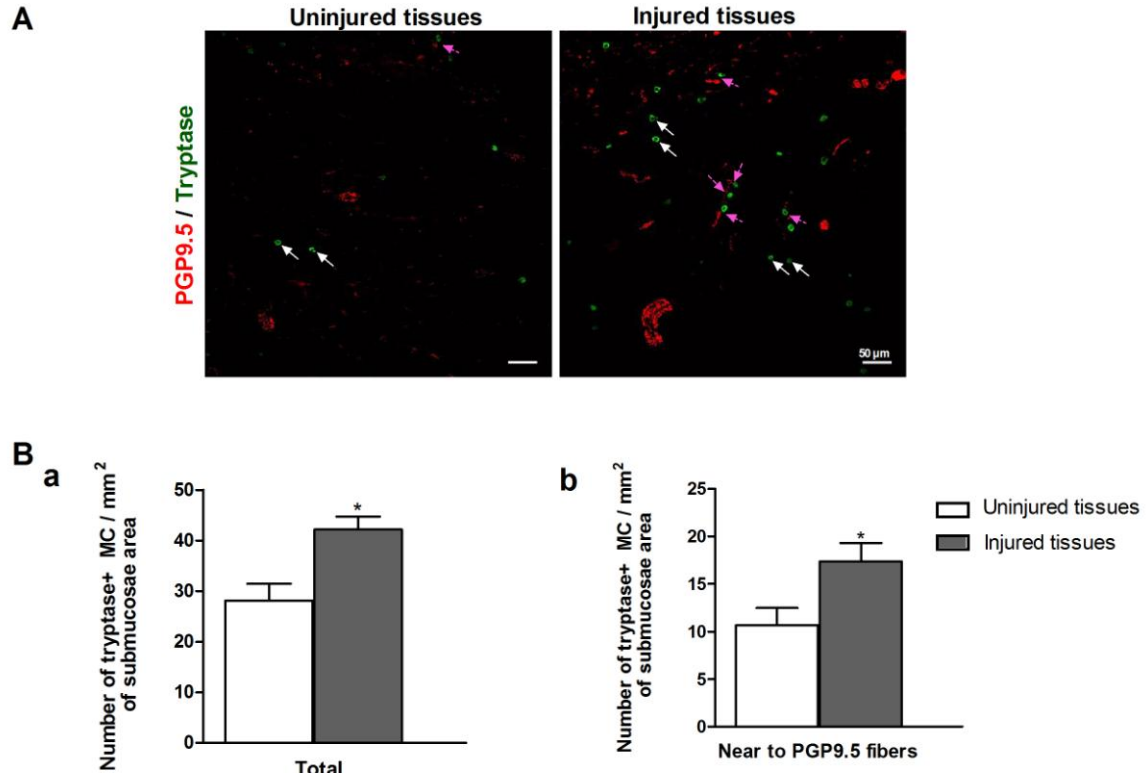


Figure 5

Figure 5: Radiation increases anatomical interaction between MCs and NFs in the human rectum. (A) Representative double immunostaining of tryptase+ MCs and PGP9.5+ NFs in the submucosa of uninjured or injured resected human rectum from patients subjected to preoperative radiotherapy to treat adenocarcinoma (resections done 6 weeks after radiotherapy). (B) Graphs represent (a) the number of MCs per area of the submucosa (mm²) and (b) the number of MCs in close proximity (<2 μm) to NFs per area of the submucosa. Each group represents the mean ± SEM for 4 to 6 patients. *P < .05 (injured rectum vs uninjured rectum).

Oral ketotifen treatment reverses CI-induced persistent mechanical allodynia in rats

In this experimentation, ketotifen (MC stabilizer) treatment started 4 weeks after irradiation. One-week of ketotifen treatment significantly ($P < .05$) abrogated the mechanical allodynia observed 4 weeks after irradiation (Figure 4C). In contrast, ketotifen treatment did not affect visceral sensitivity in control rats (5.4 ± 2.0 abdominal contractions at the basal level vs 3.0 ± 0.5 after ketotifen treatment). Nevertheless, oral treatment with ketotifen for 1 week did not change the epithelial injury score (Supplementary figure 2B). These results

demonstrate that MCs play a important role in radiation-induced mechanical hypersensitivity.

Therapeutic efficiency of MSC treatment on radiation-induced VH

As previously reported by our group in other experimental procedures,^{12, 13} the results of the present study confirmed the ability of MSCs to significantly reduce the epithelial injury score assessed after irradiation (38.6% improvement in this study, Supplementary figure 2A). Then, the potential benefit of MSCs as a therapeutic tool in the management of radiation-induced chronic VH was tested on an already established state of hypersensitivity (4 weeks post-CI).

MSC injection reverses CI-induced persistent mechanical allodynia in a time dependent manner

VH was not modified 24 hours after injection of MSCs in 4 weeks post-irradiated rats compared with the level of response before injection. In contrast, 1 week after MSC treatment, radiation-induced mechanical allodynia was significantly ($P < .05$) reduced, reaching levels similar to control, non-irradiated rats (Figure 6).

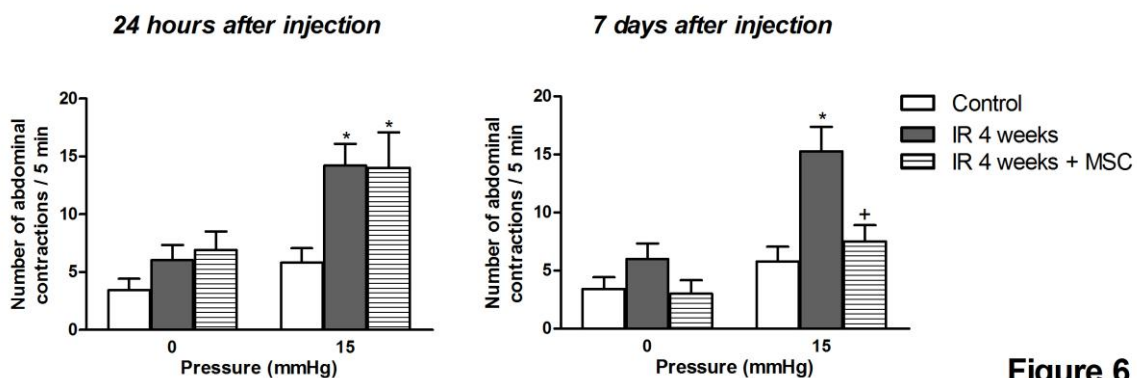


Figure 6

Figure 6: MSC treatment reduces CI-induced mechanical allodynia. Effects of a single injection of MSCs, performed 4 weeks after irradiation, on the VMR to CRD were analyzed 24 hours and 1 week after MSC injection. Each group represents the mean $\pm$ SEM in 8-14 rats per group. * $P < .05$ vs control rats, + $P < .05$ vs irradiated rats (4 weeks post-CI). Radiation-induced mechanical allodynia was reversed 1 week after MSC injection. No effects were observed 24 hours after MSC injection.

MC involvement in MSC efficiency on mechanical allodynia

One week after the administration of MSCs to irradiated rats (4 weeks), there was no change in the number of submucosal MCs compared with irradiated animals injected with vehicle (data not shown). Nevertheless, MSC treatment significantly ($P < .05$) reduced the tryptase content of MCs from 107.6 ± 5.6 in irradiated rats to $84.4 \pm 11.3 \mu\text{m}^2$. The value obtained after MSC treatment returned to the value obtained in control rats (Figure 7A and Ba). In addition, the tryptase content in feces, which was significantly increased after irradiation, was restored to control level upon MSC treatment (2.7-fold, $p < .05$, Figure 7C). Altogether, these results suggest that MSC treatment may reduce tryptase synthesis by MCs and/or may induce the stabilization of MCs. Figures 7A and Bb also show that MSC treatment significantly ($P < .05$) reduced the percentage of tryptase+ MCs in close proximity ($<2 \mu\text{m}$) to PGP 9.5+ NFs ($34.2 \pm 4.7\%$ in irradiated rats treated with MSCs vs $54.3 \pm 5.7\%$ in irradiated rats treated with vehicle).

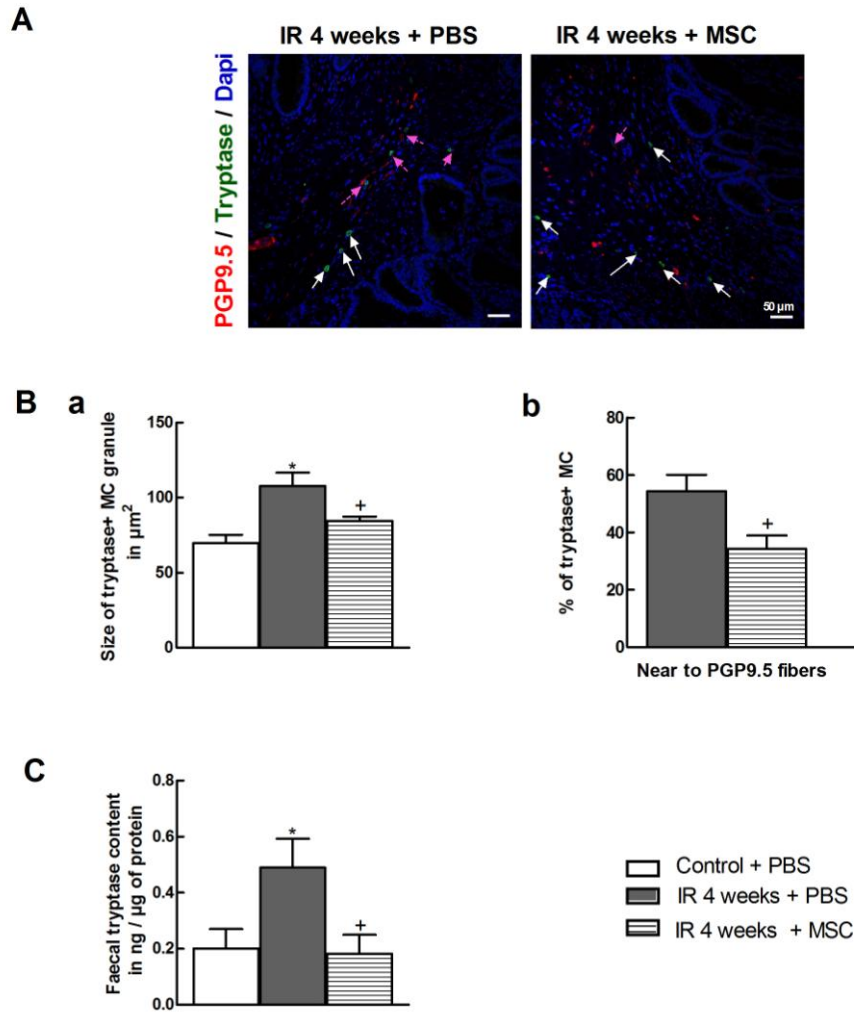


Figure 7

Figure 7: MSC treatment limits CI-induced MC-to-NF interaction. (A) Representative double immunostaining of submucosal tryptase+ MCs and PGP9.5+ NFs in colonic sections of rats irradiated and treated with MSCs or vehicle. Treatments were performed 4 weeks after irradiation and the effects were analyzed 1 week later. Arrows show some MCs far from the NFs (white) or near the NFs (pink). (B) Histograms representing (a) the intracellular granule size of tryptase+ MCs and (b) the percentage of tryptase+ MCs in close proximity (distance $<2 \mu\text{m}$) to PGP9.5+ NFs. (C) Tryptase fecal content quantified by ELISA. Results are expressed as mean $\pm$ SEM for 6 to 7 rats per group for immunohistology analyses and 8 to 20 rats per group for ELISA; *P $< .05$ vs control rats, +P $< .05$ vs irradiated rats (5 weeks post-CI). MSCs reduced activation of MCs, their ability to secrete tryptase and their crosstalk with NFs.

DISCUSSION

In the present study, we demonstrated that CI induced long-lasting VH in rat as shown by the presence of persistent mechanical allodynia, associated with spinal neuronal hyperactivation. Radiation-induced VH likely has a variety of causes, involving both peripheral (multiorgan sensitization) and central mechanisms. Here, we specifically focused on colonic mechanisms. Persistent VH is supported by substantiating evidence showing colonic neuronal plasticity. Indeed, we first demonstrated nerve hyperplasia associated with an increase in synaptic function and/or synaptogenesis. In agreement with previous clinical data our results suggest that neuronal hyperplasia after irradiation may be related to great mucosal damage.^{19, 20} We showed an elevated content in the LP of SP and CGRP, both of which are known as potent algogenic neuropeptides. Such an increase may be related to activation of extrinsic primary afferent neurons with soma in dorsal root ganglion and/or intrinsic enteric neurons whose cell bodies are located in the myenteric or submucosal plexus. Wang et al demonstrated that sensory fibers, corresponding for the most part to SP and CGRP fibers, differentially modulate early and late small intestine toxicity following radiation.⁹ SP is largely involved in the regulation and modulation of small and large bowel motility. In our experiments, increase in SP was also observed in the circular muscle layer of the colon, 4 weeks after irradiation. We cannot exclude that colonic increase in SP may be related to the motor changes often reported in animals and humans after radiation exposure.²¹ Hence, we speculate that, after irradiation, colonic dysfunction in association with hypersensitivity of afferent sensory fibers could be perceived as painful.²²

Visceral neuroplasticity occurring during inflammation can trigger functional disorders and persistent VH. Numerous clinical and experimental studies showed that these changes are time-dependent and related to the nature of inflammation.²³⁻²⁵ We previously demonstrated

that radiation damage in the human rectum is associated with MC hyperplasia.¹⁸ Moreover, Wang et al⁹ demonstrated that the involvement of peptidergic sensory fibers (SP and CGRP) in radiation-induced intestinal toxicity is partly MC-dependent. In the present study, we investigated MC involvement in radiation-induced persistent VH. We showed that in addition to MC hyperplasia, CI likely induced MC activation as shown by MC hypertrophy and increase in fecal tryptase content. Moreover, we demonstrated that ketotifen treatment reversed radiation-induced mechanical allodynia. Altogether our data provide evidence that, after CI, MCs are of functional significance in promoting VH. Part of the explanation for this could be the deregulation of the bidirectional communication between MCs and sensory nerves. Indeed, we showed that the number of colonic MCs in close vicinity to innervation was increased after CI. Moreover, we found such an increase in the rectum of patients treated by pelvic radiotherapy. In patients suffering from irritable bowel syndrome, increased anatomical interaction between MCs and NFs is the only parameter significantly correlated with the severity and frequency of abdominal pain or discomfort.^{5, 26} In our study, the increase of fibers in density observed after irradiation, and thus probably their activation, may be initiated, maintained and/or potentiated in response to their contact with activated MCs.^{6, 27} Activation of fibers may, in turn, prime activation of MCs or cause their degranulation, depending on neuropeptide and neurotransmitter concentration.¹⁷ In accordance with the existence after irradiation of an exacerbated bidirectional conversation between MCs and fibers in the colon, we reported here an increased NGF expression. There is growing evidence that NGF plays a pivotal role in chronic pain, particularly after inflammation. NGF is abundantly synthesized and released by both MCs and NFs. Moreover, NGF is a major factor regulating the survival and sprouting of sensory neurons, but also the survival and sensitization of MCs.²⁸

Among several MC mediators that could be involved in radiation-induced VH, our results suggest the role of the serine protease tryptase. In the context of functional gastrointestinal disorders like irritable bowel syndrome or inflammatory bowel disease, there is strong evidence that cleavage of protease-activated receptors 2 (PAR2) by tryptase leads to VH.^{29, 30} A significant increase in PAR2 expression in the intestine after irradiation has been reported.³¹ Moreover, increased MC immunostaining for tryptase was observed in rectal resections of patients treated by pelvic radiotherapy.¹⁸ Despite differences in clinical picture between irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease and pelvic radiation disease, PAR2 may be a common factor in visceral pain development and maintenance. Further investigation is needed to demonstrate the relevance of tryptase involvement in radiation-induced VH and functional disorders at the late stage of the disease, and also to show that PAR2 is a potential therapeutic target.

A recent study has opened new therapeutic avenues in the management of complications of pelvic radiotherapy. Indeed, compassionate MSC therapy in patient's refractory to regular treatments led to substantial improvement in clinical response.³² The same study also suggested that MSC administration was followed by a transient reduction of pain in 3 patients.³² Now, for the first time, our study provides significant experimental arguments concerning the ability of MSCs to reduce radiation-induced long-lasting VH. Strikingly, a single intravenous injection of MSCs led to the reversal of radiation-induced persistent mechanical allodynia at 1 week. Our study also provides complementary experimental evidence of the ability of MSCs to reduce radiation-induced colonic ulcer. MSCs improve the host's regenerative capacity not only in the ulcerated areas but also in the ulcer margins.¹³ We also previously demonstrated that single or repeated MSC injections reduced the radiation-induced inflammation process.^{11,12} Thus, by virtue of their regenerative and anti-inflammatory properties, MSCs likely modulate and decrease the receptor field of hypersensitivity, which in

turn may partly explain the observed reduction of persistent irradiation-induced mechanical allodynia.

Our results suggest that MSC treatment decreases radiation-induced MC activation. In keeping with this, Brown et al demonstrated the ability of MSCs to inhibit MC degranulation in a model of passive cutaneous anaphylaxis and in a peritoneal MC degranulation assay.³³ We also showed that MSC treatment in irradiated rats reduced the anatomical interaction between MCs and nerves, compared with non-injected irradiated animals. Finally, we found that MSC ability to reverse radiation-induced mechanical allodynia was associated with their potential to reduce anatomical interactions between MCs and NFs. Taken together all these data support the assumption that stabilization of MCs may play a role in the reduction by MSCs of radiation-induced sensory fiber sensitization and therefore persistent VH. Long-lasting anti-nociceptive effects of intravenously injected MSCs have been described in other chronic pain conditions. Using a spared nerve injury model of neuropathic pain, Siniscalco et al³⁴ showed that MSC treatment reduced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia for at least 3 months. This effect was associated with central immunomodulation. Guo et al³⁵ also reported that MSCs decreased mechanical hypersensitivity throughout a 5-month observation period in a model of orofacial mechanical hypersensitivity. These authors showed an involvement of peripheral and/or central opioid receptor activation. They also suggested that differential activation of peripheral and central opioid receptors may be related to the state of hypersensitivity chronicity. Taking this into account, further investigation is needed to characterize over time the peripheral and central versatile¹⁴ effect of MSC treatment on radiation-induced mechanical allodynia.

In conclusion, this study provided new data concerning MSC anti-nociceptive effect in a context of radiation-induced gastrointestinal toxicity. We presented here an experimental model of radiation-induced long-lasting VH in response to mechanical stimuli. Using this model, we demonstrated the involvement of peripheral mechanisms where MCs play a significant role probably through the enhancement of their crosstalk with NFs. We also reported increased spatial interactions between MCs and NFs in the rectum of patients treated by pelvic radiotherapy. Finally, we reported that MSC treatment decreased the interactions between MCs and NFs and reversed mechanical allodynia. These results might be of clinical interest in the framework of the management of radiation-induced chronic gastrointestinal complications.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank GSEA of the IRSN for technical assistance with animals. The authors are also grateful to Radia TAMARAT and Stephane FLAMANT who reread the manuscript and made helpful comments.

REFERENCES

1. Fitzgerald JJ, Ustinova E, Koronowski KB, et al. Evidence for the role of mast cells in colon-bladder cross organ sensitization. *Auton Neurosci* 2013;173:6-13.
2. Andreyev HJ, Wotherspoon A, Denham JW, et al. Defining pelvic-radiation disease for the survivorship era. *Lancet Oncol* 2010;11:310-2.
3. Andreyev J. Gastrointestinal symptoms after pelvic radiotherapy: a new understanding to improve management of symptomatic patients. *Lancet Oncol* 2007;8:1007-17.
4. Lowery AE, Starr T, Dhingra LK, et al. Frequency, characteristics, and correlates of pain in a pilot study of colorectal cancer survivors 1-10 years post-treatment. *Pain Med* 2013;14:1673-80.
5. Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, et al. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004;126:693-702.
6. Barbara G, Wang B, Stanghellini V, et al. Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007;132:26-37.
7. Barreau F, Salvador-Cartier C, Houdeau E, et al. Long-term alterations of colonic nerve-mast cell interactions induced by neonatal maternal deprivation in rats. *Gut* 2008;57:582-90.
8. Kleij HP, Bienenstock J. Significance of Conversation between Mast Cells and Nerves. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2005;1:65-80.

9. Wang J, Zheng H, Kulkarni A, et al. Regulation of early and delayed radiation responses in rat small intestine by capsaicin-sensitive nerves. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64:1528-36.
10. Berbee M, Hauer-Jensen M. Novel drugs to ameliorate gastrointestinal normal tissue radiation toxicity in clinical practice: what is emerging from the laboratory? *Curr Opin Support Palliat Care* 2012;6:54-9.
11. Bessout R, Semont A, Demarquay C, et al. Mesenchymal stem cell therapy induces glucocorticoid synthesis in colonic mucosa and suppresses radiation-activated T cells: new insights into MSC immunomodulation. *Mucosal Immunol* 2013.
12. Linard C, Busson E, Holler V, et al. Repeated autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell injections improve radiation-induced proctitis in pigs. *Stem Cells Transl Med* 2013;2:916-27.
13. Semont A, Demarquay C, Bessout R, et al. Mesenchymal stem cell therapy stimulates endogenous host progenitor cells to improve colonic epithelial regeneration. *PLoS One* 2013;8:e70170.
14. Bonfield TL, Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells: an innovative therapeutic for lung diseases. *Discov Med* 2010;9:337-45.
15. Rochefort GY, Delorme B, Lopez A, et al. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells* 2006;24:2202-8.
16. Morteau O, Hachet T, Caussette M, et al. Experimental colitis alters visceromotor response to colorectal distension in awake rats. *Dig Dis Sci* 1994;39:1239-48.
17. Keith IM, Jin J, Saban R. Nerve-mast cell interaction in normal guinea pig urinary bladder. *J Comp Neurol* 1995;363:28-36.

18. Blirando K, Milliat F, Martelly I, et al. Mast cells are an essential component of human radiation proctitis and contribute to experimental colorectal damage in mice. *Am J Pathol* 2011;178:640-51.
19. Hirschowitz L, Rode J. Changes in neurons, neuroendocrine cells and nerve fibers in the lamina propria of irradiated bowel. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1991;418:163-8.
20. Hockerfelt U, Franzen L, Norrgard O, et al. Early increase and later decrease in VIP and substance P nerve fiber densities following abdominal radiotherapy: a study on the human colon. *Int J Radiat Biol* 2002;78:1045-53.
21. Otterson MF. Effects of radiation upon gastrointestinal motility. *World J Gastroenterol* 2007;13:2684-92.
22. Sarna SK. Enteric descending and afferent neural signaling stimulated by giant migrating contractions: essential contributing factors to visceral pain. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G572-81.
23. Bueno L, Fioramonti J. Visceral perception: inflammatory and non-inflammatory mediators. *Gut* 2002;51 Suppl 1:i19-23.
24. Demir IE, Schafer KH, Tieftrunk E, et al. Neural plasticity in the gastrointestinal tract: chronic inflammation, neurotrophic signals, and hypersensitivity. *Acta Neuropathol* 2013;125:491-509.
25. Mawe GM, Strong DS, Sharkey KA. Plasticity of enteric nerve functions in the inflamed and postinflamed gut. *Neurogastroenterol Motil* 2009;21:481-91.

26. Di Nardo G, Barbara G, Cucchiara S, et al. Neuroimmune interactions at different intestinal sites are related to abdominal pain symptoms in children with IBS. *Neurogastroenterol Motil* 2014;26:196-204.
27. Reed DE, Barajas-Lopez C, Cottrell G, et al. Mast cell tryptase and proteinase-activated receptor 2 induce hyperexcitability of guinea-pig submucosal neurons. *J Physiol* 2003;547:531-42.
28. Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R, et al. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine. *Trends Neurosci* 1996;19:514-20.
29. Cenac N, Andrews CN, Holzhausen M, et al. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J Clin Invest* 2007;117:636-47.
30. Vergnolle N. Clinical relevance of proteinase activated receptors (par2) in the gut. *Gut* 2005;54:867-74.
31. Wang J, Zheng H, Hollenberg MD, et al. Up-regulation and activation of proteinase-activated receptor 2 in early and delayed radiation injury in the rat intestine: influence of biological activators of proteinase-activated receptor 2. *Radiat Res* 2003;160:524-35.
32. Voswinkel J, Francois S, Simon JM, et al. Use of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic inflammatory fistulizing and fibrotic diseases: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2013;45:180-92.
33. Brown JM, Nemeth K, Kushnir-Sukhov NM, et al. Bone marrow stromal cells inhibit mast cell function via a COX2-dependent mechanism. *Clin Exp Allergy* 2011;41:526-34.

34. Siniscalco D, Giordano C, Galderisi U, et al. Long-lasting effects of human mesenchymal stem cell systemic administration on pain-like behaviors, cellular, and biomolecular modifications in neuropathic mice. *Front Integr Neurosci* 2011;5:79.
35. Guo W, Wang H, Zou S, et al. Bone marrow stromal cells produce long-term pain relief in rat models of persistent pain. *Stem Cells* 2011;29:1294-303.

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

The choice of radiation procedure

In this study we identified an experimental model of radiation-induced persistent VH. In the pelvis, the colorectum has high levels of radiation-induced toxicity and gastrointestinal complications have a great effect on the patient's quality of life ^{1, 2}. So, we used a model of irradiation centered on the rat pelvic zone targeting the colorectum. Nevertheless, our irradiation configuration allows the exposure of some other visceral organs, the prostate, the bladder and the seminal vesicles, which may participate in the visceral response, as is the case for patients. Injured visceral afferent nerves become more sensitive. So, as described for patients, we needed a model allowing the development of severe and irreversible histological lesions ³. In keeping with this and motivated by previous data obtained in our laboratory in rats, we chose to apply a single 27 Gy dose of ionizing radiation ^{3, 4}.

MSC culture and characterization

Bone marrow MSCs were obtained by flushing femurs of seven-week-old female rats as previously described in the literature ⁵. After ten days, the monolayer of adherent cells was trypsinized, re-suspended in culture medium, and seeded at 5×10^3 cells per cm^2 (passage P1). During the culture, the medium was changed twice a week. Before i.v. injection, the quality of MSCs was checked by analyzing their phenotype, differentiation potential and ability to form colony-forming unit fibroblasts (CFU-Fs). The phenotype of amplified MSCs was verified by flow cytometry using FACSsort (BD Biosciences). Cells were incubated for 20 min at 4°C with phycoerythrin-conjugated mouse monoclonal antibodies against rat antigens. The percentage of CD90+ (clone OX-7; BD Biosciences) and CD73+ (clone 5F/B9; BD Biosciences) cells was analyzed and the absence of hematopoietic cells was verified with CD34 (clone ICO115, Santa Cruz) and CD45 (clone OX-1; Becton Dickinson, France) markers. On average, MSCs expressed 98.5% CD90 (+/-0.6), 84.2% CD73 (+/-8.6), 2.85% CD34 (+/-1.24) and 4.4% CD45 (+/-1.2). Identical isotope antibodies served as controls. Then, as described by Rochefort et al ⁵, MSCs were characterized for their multipotentiality, i.e. their ability to differentiate into cells of distinct lineages: adipocytes, chondrocytes and osteoblasts. Finally, their ability to form CFU-Fs, as a characteristic of progenitor cells, was also quantified. To this end, bone marrow total cells were plated in triplicate at densities of 5×10^6 cells per 25 cm^2 and CFU-Fs were stained with violet crystal and counted after 11 days of culture.

Histology and immunohistochemistry

Tissue preparations

Spinal cord

Rats were deeply anesthetized using isoflurane and quickly perfused transcardially with 400 mL of saline buffer and then with 400 mL of saline fixative solution (4% paraformaldehyde (PFA) with 15% saturated picric acid). The spinal cord samples lumbar 6–sacral 1 (L6 –S1) were then excised, successively post-fixed 12 hours in the perfusion fixative and cryoprotected in 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer for 24 hours at 4°C. These samples were frozen in Optimal Cutting Temperature (O.C.T.) (Sakura Tissue-Tek 4583) compound at -45°C and stored at -80°C. Transverse L6-S1 spinal cord 30 µm sections were cut with a cryostat and put in phosphate-buffered saline (PBS) before starting the experiment.

Rat colon samples

On the day of euthanasia, cardiac puncture was performed under isoflurane anesthesia. The distal colon was fixed either (i) in 4% formaldehyde and embedded in paraffin or (ii) in Zamboni's fixative solution (4% PFA with 15% saturated picric acid in 0.1 M PBS) for 4 hours before being cryoprotected overnight in 30% sucrose 0.1 M phosphate buffer, and then frozen in O.C.T. compound at -45°C before storage at -80°C. Circular 5 µm sections were cut on a rotary microtome (i) (Leica Microsystems AG, Wetzlar Germany) or on a cryostat (ii) before mounting on polysine slides.

Human colon samples

Human tissues were acquired following institutional ethical guidelines (Gustave Roussy Institute) and French Medical Research Council guidelines. Six tissue samples were obtained from tiny pieces removed surgically from patients treated for rectal adenocarcinoma with preoperative radiotherapy (45 Gy, fraction of 2 or 1.8 Gy) 6 weeks after the end of treatment. Patients were notified that resections would be sent to pathologists for analysis but no ethics committee was consulted for operating waste. Nevertheless, with the laws (articles L1245-2, L1211-3, L1211-4, L1211-5, L1211-6 and LA211-7 of the Public Health Code) the surgical residues were subjected to the principles and rules in relation to the donation and procurement of human tissues. For each patient, resections were taken from the irradiated field, either adjacent to the tumor (with moderate to severe lesions, up to 50% of the rectal section) or far from the tumor (without or with slight lesions, less than 5% of the

rectal section). So, patients serve as their own controls. The samples were embedded in paraffin (few indications were given regarding fixation).

Immunohistochemistry procedure for spinal cord

Free-floating sections were incubated overnight at 4°C with PBS containing 0.3% Triton X-100, rabbit anti-phospho-p44/42 MAPK (mitogen-activated protein kinases) (erk1/2) (Thr202/Tyr204) antibody (1/200; Cell Signaling) and mouse anti-NeuN (A60) antibody (1/1000; Millipore). After 5 changes in PBS, sections were incubated with Alexafluor 568–conjugated immunoglobulin (Ig)G goat anti-rabbit (1/200) and Alexafluor 488–conjugated IgG goat anti-mouse (1/200) for 2 hours at room temperature. Section were then rinsed in PBS 3 times and mounted in coated slides with fluorescence mounting medium Vectashield H-1000 (VectorLabs). For each section (at least 5 sections for each animals), 4 stacks in the Z direction were made using a confocal microscope (LSM 780 NLO, Carl Zeiss MicroImaging). P-p44/42 and NeuN (neuronal protein) co-labeling of cells was quantified in the dorsal horn (laminae I-II and laminae III-IV) using Histolab software.

Histological and immunohistochemistry procedure for colon

After procedure (i), sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through ethanol baths and PBS. Hydrated sections were either stained with HES or submitted to immunohistological processing. Before immunostaining, colon sections for each animal were histologically analyzed to screen for those with the highest degree of epithelial ulceration. Tissue sections were treated with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS 1x (Gibco-BRL) at room temperature (RT) for 10 min. Endogenous peroxidases were inhibited by incubation with 3% H₂O₂ in methanol at RT for 10 min. For some experiments, antigenic unmasking was performed using the retrieval solution (0.01 M citrate buffer, pH= 6 (DakoCytomation) for 3x5min at 350W (see following table). Staining was begun 30 minutes after saturation in X0909 solution (DakoCytomation) or in 6% BSA, PBS 1X for 2 hours (tryptase / PGP9.5 immunostaining). When necessary, sections were counterstained with Dako Fast Nuclear Red (S1963).

After procedure (ii), sections were treated with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS 1X (Gibco-BRL) at RT for 15 min and then incubated in X0909 (DakoCytomation) for 30 min.

Protein extracts and ELISA

Fresh feces were placed in 20 mM Tris-HCl solution (pH = 8) with stirring for 10 min. After centrifugation, supernatants containing protein were obtained and stored at -80°C.

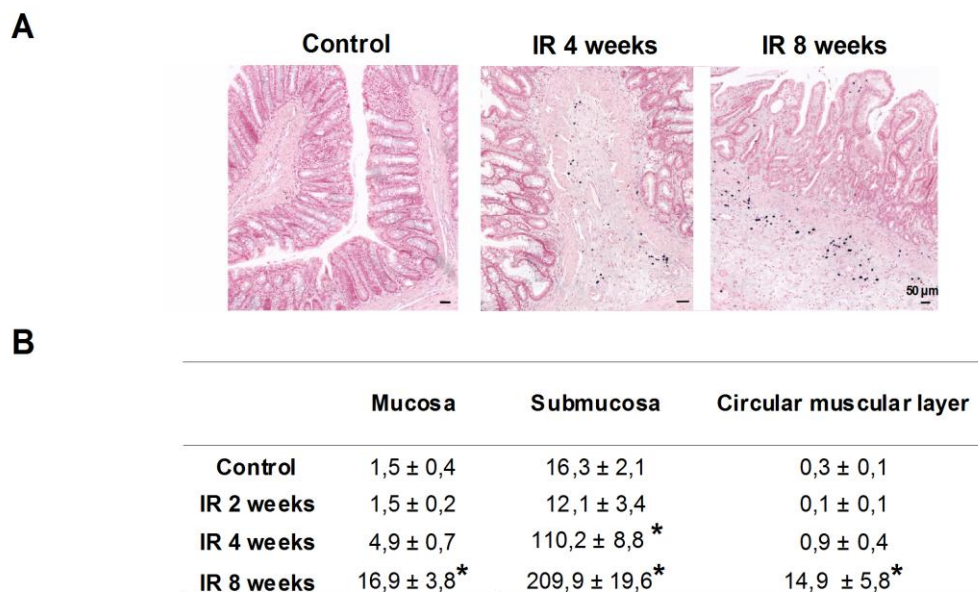
Protein was measured using a BCA assay kit (Sigma Aldrich). Fecal supernatant tryptase in each sample of 80 µg of total protein was determined by ELISA, according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, Invitrogen, USCN life) and expressed in ng/µg of total protein extract.

Goal	Fixation procedure	Antibodies or coloration	Microscopy and analysis procedure
Study of neuroplasticity: neuron hyperplasia in the submucosal plexus	(i)	Primary antibody: Mouse anti-Human HuC/D (Molecular Probes) (1/100, one hour of incubation at RT) Revelation system : Envision Kit mouse-HRP (K4000 Dako) and substrate Histogreen Kit for peroxidase (Abcys E109)	Leica MicroVision Instrument Quantification using Histolab: number of neurons / submucosal plexus
Study of neuroplasticity: number of submucosal plexus	(i)	Primary antibody: Rabbit anti-PGP9.5 (AbD Serotec) (1/5000, one hour of incubation at RT) Revelation system : Envision Kit rabbit-HRP (K4002 Dako) and substrate Histogreen Kit for peroxidase (Abcys E109)	Leica MicroVision Instrument Quantification using Histolab: number of submucosal plexus / area of submucosa
Study of neuronal plasticity: synaptogenesis and/ or synaptic activity	(i)	Primary antibody: Mouse anti Synaptophysin (DAKO) (1/40, one hour of incubation at RT) Revelation system : Envision Kit mouse-HRP (K4000 Dako) and substrate Histogreen Kit for peroxidase ((Abcys E109)	Leica MicroVision Instrument Quantification using Histolab: area stained / surface of LP
Study of neuronal plasticity: nervous fiber hyperplasia	(ii)	Primary antibody: Rabbit anti-PGP9.5 (AbD Serotec) (1/5000, incubation OV at 4°C) Secondary antibody: Alexa fluor 568- conjugated immunoglobulin (Ig)G goat anti-rabbit (1/200, 30 minutes of incubation at RT)	Leica MicroVision Instrument Quantification using Histolab: area stained / total surface of LP
Study of algogenic substances: implication of SP	(ii)	Primary antibody: Rabbit anti-SP (Abcam) (1/1000, incubation OV at 4°C) Secondary antibody: Alexa fluor 568- conjugated immunoglobulin (Ig)G goat anti-rabbit (1/200, 30 minutes of incubation at RT)	Leica MicroVision Instrument Quantification using Histolab : area stained / total surface of LP
Study of algogenic substances: implication of CGRP	(ii)	Primary antibody: Rabbit anti-CGRP (Sigma Aldrich) (1/5000, incubation OV) Secondary antibody: Alexa fluor 568- conjugated immunoglobulin(Ig)G goat anti-rabbit (1/200, 30 minutes of incubation at RT)	Leica MicroVision Instrument Quantification using Histolab: area stained / surface of LP
Study of peripheric sensitization and MSC modulation: implication of tryptase+MC	(i)	Primary antibodies: Mouse Anti-Mast Cell Tryptase (AA1) (Sigma Aldrich) (1/200, incubation OV at 4°C) and Rabbit anti-PGP9.5 (AbD Serotec) (1/5000, OV at 4°C) Secondary antibodies: Alexa fluor 488- conjugated immunoglobulin(Ig)G goat anti-mouse (1/200,30 minutes of incubation at RT) Alexa fluor 568- conjugated immunoglobulin(Ig)G goat anti-rabbit (1/200,30 minutes of incubation at RT)	Confocal microscope (LSM 780 NLO, Carl Zeiss MicroImaging, Germany) using a 405 nm and a 637 nm LASER Quantification using Histolab : number of MC tryptase+ and number of MC with tryptase+ stained surface > 80µm ² (for colonic rat sections), and number of MC tryptase+ near PGP9.5 nervous fiber (<2µm) (for colonic rat sections and patients resections) / area of submucosa
Histological analysis after Ketotifen and MSC treatment	(i)	HES	Leica MicroVision Instrument The severity of colorectal damage was assessed using the radiation injury score described above

Supplementary Fig.1 Time-dependent increase of the number of MCs in the colon

Methods: After procedure (i) described in the supplementary material, sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through ethanol baths and PBS. Hydrated colonic sections were stained with 1% toluidine blue (pH= 0.5) for 20 min. Sections were incubated in a solution of 0.7N HCL for 5 min and then counterstained with Fast nuclear red (H-3403; Vector).

Results: In control tissues, MCs were very sparse and mainly observed in the submucosa, the external muscularis layers and, in rare cases, also in the LP. Two weeks post-irradiation, the number of MCs was not modified. In 4 weeks irradiated animals we quantified an increase ($*P < 0.05$) in the number of submucosal MCs. Radiation-induced submucosal MC hyperplasia remained high at 8 weeks and was associated with a few MC infiltrations in the LP and external muscularis layers. Thus, the peripheral emergence of MC hyperplasia 4 weeks post-CI seems to correlate closely with the period of central hyperactivation stabilization (twice the basal level, Fig. 2) and nerve hyperplasia (Fig. 3).



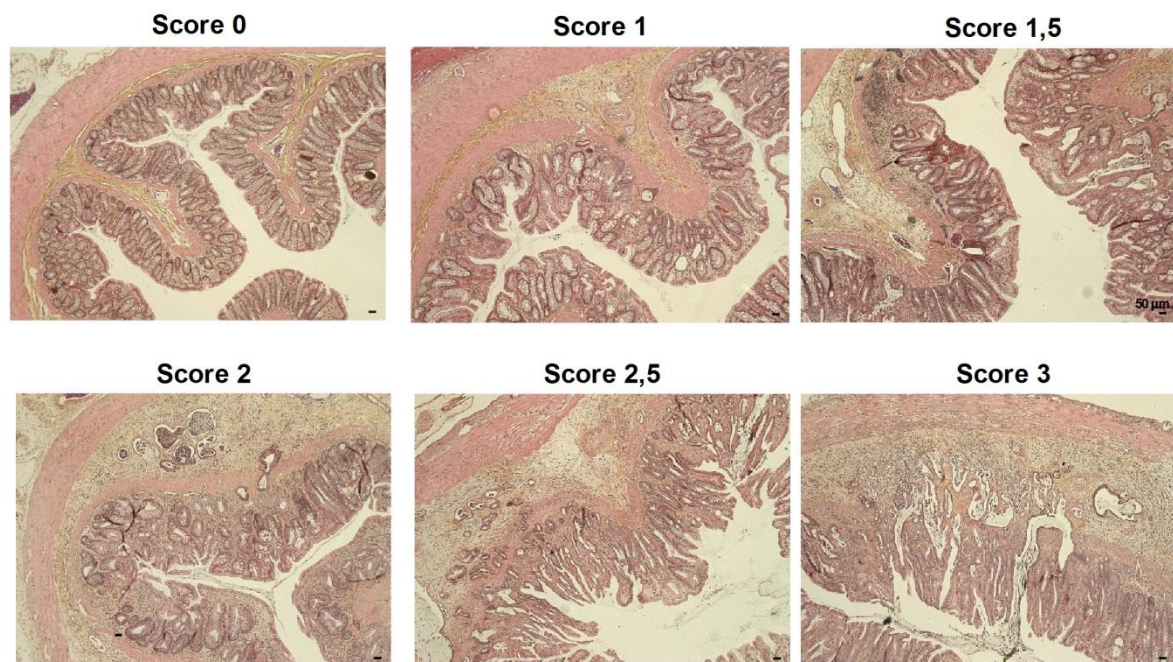
Supplementary figure 1

Supplementary Fig. 1 Characterization over time of radiation-induced colonic MC increase. (a-c) Representative photomicrographs of toluidine blue-stained MCs in colonic sections of control and irradiated rats 4 and 8 weeks post-CI. (d) Quantification of the number of toluidine blue+ MCs per colonic section. Each group represents the mean ± SEM for 8 to 10 rats. $*P < 0.05$ vs controls.

Supplementary Fig.2 Effects of ketotifen or MSC treatment on radiation-induced colonic epithelial damage

Method: Scoring of epithelial lesions

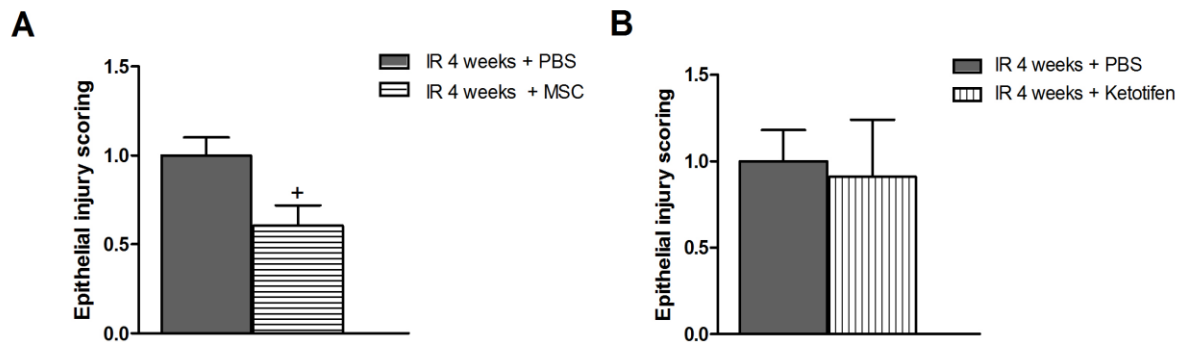
Distal colon (3 cm) of each rat was cut into 4 pieces, embedded in paraffin, cut into circular 5µm sections and stained with HES. The severity of colorectal damage induced by irradiation was assessed using an injury mucosal score. A variable of the injury score was mucosal damage (epithelial atypia, inflammatory infiltrate in the lamina propria and ulceration) and submucosal damage (edema, colitis cystica profunda). Graduation of the injury was 0= null; 1= slight (epithelial atypia and slight edema); 1,5= moderate (epithelial atypia, inflammatory infiltrate, moderate edema), 2= moderate + (epithelial atypia, inflammatory infiltrate, dense edema and colitis cystica profunda), 2,5= severe (moderate ulceration, dense edema and colitis cystica profunda) and 3= severe+ (high ulceration, high edema and colitis cystica profunda ghosts) as shown in the following pictures. The score by cup is the sum of the grade weighted by the percentage in the cup of corresponding surface of each grade. For each animal we considered 4 sections (1 per subdivided piece of colon).



Results: By contrast with ketotifen, MSC treatment reduced radiation-induced severe colonic epithelial ulceration.

Epithelial damage of the colon was analyzed on histological sections using the injury score as described above. Five weeks after irradiation, we observed dystrophic epithelial zones including 1) areas with atypical and disorganized crypts or 2) areas with mucosal ulceration (loss of epithelial cells) and submucosal edema. Colitis cystica profunda often present after deeper inflammation was also observed 5 weeks after irradiation. The cysts were commonly observed in edematous submucosa beneath the zone of mucosa with marked ulceration.

A single injection of MSCs significantly ($*P < 0.05$) reduced the epithelial injury score, corresponding to 38.6% improvement. Decreases in edema and ulceration were observed, but the principal effect of MSCs was reduction of colitis cystica profunda in the submucosa. By contrast, oral treatment with ketotifen twice a day for one week did not change the epithelial injury score.



Supplementary figure 2

Supplementary Fig. 2 Characterization of radiation-induced colonic epithelium damage. Representative micrographs of colorectal lesions observed after irradiation. Epithelial injury score after treatment of irradiated rats with (a) 1.5 million MSCs or (b) ketotifen. Animals were treated 4 weeks after irradiation and the effects were analyzed 1 week later. Each group represents the mean $\pm$ SEM for 4 to 6 rats. Values of each group were normalized to their corresponding control value. + $P < 0.05$ vs irradiated rats.

REFERENCES

1. Andreyev HJ, Wotherspoon A, Denham JW, et al. Defining pelvic-radiation disease for the survivorship era. *Lancet Oncol* 2010;11:310-2.
2. Bacon CG, Giovannucci E, Testa M, et al. The association of treatment-related symptoms with quality-of-life outcomes for localized prostate carcinoma patients. *Cancer* 2002;94:862-71.
3. Semont A, Demarquay C, Bessout R, et al. Mesenchymal stem cell therapy stimulates endogenous host progenitor cells to improve colonic epithelial regeneration. *PLoS One* 2013;8:e70170.
4. Gremy O, Benderitter M, Linard C. Acute and persisting Th2-like immune response after fractionated colorectal gamma-irradiation. *World J Gastroenterol* 2008;14:7075-85.
5. Rochefort GY, Delorme B, Lopez A, et al. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells* 2006;24:2202-8.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

1 INTRODUCTION

Les altérations physiopathologiques responsables de la survenue de douleurs d'origine viscérale sont diverses, et, peuvent agir de manière séparée ou combinée. Parmi elles se distinguent notamment : (i) la sensibilisation des mécanorécepteurs au niveau périphérique, (ii) la sensibilisation du système nerveux central et, (iii) une modification de l'activité fonctionnelle de l'organe, comme par exemple une altération de la motricité colique (Wood, 2007).

Les deux premiers aspects cités ci-dessus ont déjà fait l'objet d'études dans notre modèle d'hypersensibilité viscérale chronique radio-induite. Les résultats découlant de ces expérimentations ont été présentés dans le chapitre III de ce manuscrit de thèse.

Outre ces mécanismes de sensibilisation, l'implication de l'altération de la motricité intestinale dans les sensations douloureuses abdominales ressenties par des patients atteints d'IBS et de IBD, lors d'études cliniques, a été suggérée (Annese et al., 1997; Chey et al., 2001; Clemens et al., 2003; Kellow and Phillips, 1987). Une corrélation a en effet été clairement établie entre la fréquence des contractions migratoires géantes et les sensations de douleurs intermittentes chez les patients atteints de pathologies gastro-intestinales (Annese et al., 1997; Chey et al., 2001; Clemens et al., 2003; Kellow and Phillips, 1987).

Les patients ayant été soumis à des radiothérapies abdomino-pelviennes souffrent de troubles du transit (Andreyev, 2007; Harb et al., 2014; Theis et al., 2010), comme conséquence, notamment, d'une modification de l'activité motrice intestinale. De plus, dans des études expérimentales effectuées chez des chiens ayant subi des irradiations abdominales, Otterson et al., suggèrent que les contractions abdominales observées (index probable d'une douleur ressentie par l'animal) seraient la conséquence de l'altération radio-induite de leur activité motrice intestinale (Otterson et al., 1988, 1992).

Afin de participer à la compréhension des différents mécanismes impliqués dans l'altération de la sensibilité viscérale, dans cette deuxième partie de l'étude, nous avons choisi d'évaluer dans notre modèle expérimental (cf. chapitre V partie 1.1) :

- L'altération de la contractibilité des muscles circulaires du côlon après irradiation, et

- Les mécanismes biologiques sous-tendant une telle altération. Cette étude nous a notamment orientée vers l'identification d'un neuromédiateur, le NO^{*}, dont l'évaluation propre dans la pathophysiologie de l'hypersensibilité viscérale peut être envisagée. En effet, les neurones à NO^{*} au niveau intestinal sont considérés classiquement comme des motoneurones jouant un rôle dans la motricité intestinale, cependant, leur implication dans les altérations de la sensibilité viscérale est aussi décrite.
- Enfin, dans ce contexte l'efficacité thérapeutique des CSM ainsi que leur mode d'action ont été également étudiés.

Le matériel expérimental spécifique à cette deuxième étude, ainsi que la procédure expérimentale mise en place sont explicités en suivant.

2 MATÉRIELS, MÉTHODES ET PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

Dans cette étude, des prélèvements du côlon distal sont réalisés de manière similaire à ce qui a été décrit dans le matériel et méthode présenté dans le chapitre III de cette thèse.

2.1 *Le test de contractibilité musculaire ex-vivo*

L'objectif de ce test est l'évaluation de la contractibilité musculaire du muscle circulaire colique.

Pour chaque rat, deux morceaux du côlon distal de 0,5 cm de longueur sont prélevés. Ces pièces de côlon, fraîchement disséquées, sont maintenues en survie dans des bains organiques oxygénés contenant 10 ml de solution de tyrode (milieu physiologique), à 37°C. Ces segments de côlon sont pré-chargés avec une force de 9,8 mN (équivalent à une masse de 1 gramme) exercée sur les fibres musculaires circulaires et nous les laissons se stabiliser pendant 30 minutes, avant de commencer les expérimentations pharmacologiques.

Entre chaque injection de drogue, les échantillons de tissus sont rincés trois fois avec la solution de tyrode et une stabilisation du signal est attendue avant chaque nouvelle stimulation (de 15 à 30 minutes). Pour convertir les variations de pression ou de force, obtenues après chaque stimulation, en signaux électriques, un transducteur de pression isométrique (Harvard

APPARATUS Holliston, MA, USA transducteur 724493) est utilisé. Ces signaux électriques sont ensuite analysés informatiquement à l'aide du logiciel « AcqKnowledge ».

2.2 L'immunohistochimie permettant de mettre en évidence les neurones à monoxyde d'azote (NO•) ou neurones nitrergiques.

L'objectif de cette expérience est l'évaluation des variations potentielles du pourcentage des neurones nitrergiques au niveau des plexus myentériques du côlon distal, et ce, en fonction des différentes conditions expérimentales testées.

Les échantillons de côlons sont prélevés et coupés dans le sens de la longueur afin d'être épinglés à plat sur un support siliconé. Ils sont ensuite fixés dans une solution de Bouin pendant 6 heures avant d'être cryo-protégés dans une solution de PBS contenant 30% de sucrose toute la nuit, à 4°C. Des coupes de 5 µm sont ensuite réalisées au cryostat au niveau des plexus myentériques. Sur ces coupes, un double immuno-marquage Huc/D (corps cellulaires des neurones) et nNOS (neurones nitrergiques) est réalisé.

Brièvement, l'expérimentation se fait à température ambiante. Les coupes sont d'abord perméabilisées avec une solution de PBS à 0,5 % en triton, puis soumises à une solution de saturation DakoCytomation (X0909, DakoCytomation) pendant 15 minutes. A ce stade, les deux anticorps primaires, le Mouse anti-Human Huc/D (1/100, A21271 de chez Molecular Probes) et le Sheep anti-nitric oxyde synthase (1/100, AB1529 de chez Millipore) sont incubés dans une solution de PBS 0,1% en triton et 5% en albumine de sérum bovin, pendant 1 heure. Après rinçage, les anticorps secondaires, l'anti-mouse alexa Fluor 488 (1/200 A11017 de chez Invitrogen) et l'anti-sheep alexa Fluor 568 (1/200 A21099 de chez Invitrogen) sont incubés pendant 30 minutes dans une solution de PBS. Finalement, les lames sont montées avec du glycérol.

2.3 Procédure expérimentale

2.3.1 Les expériences de contractibilité ex vivo

Pour les tests de contractibilité réalisés *ex-vivo*, trois groupes d'animaux sont utilisés : des animaux contrôles, des animaux irradiés depuis 4 semaines et des animaux irradiés depuis 4 semaines et qui ont reçus une injection sous anesthésie gazeuse (isoflurane) de 5 millions de CSM par voie i.v. 7 jours auparavant.

Trois types d'expérimentations sont réalisés dans ce contexte :

Première série d'expérience : l'objectif est l'évaluation de la capacité de la contractibilité du muscle circulaire (ou du tonus musculaire) colique à une stimulation de type cholinergique. Des doses croissantes de carbacol ou Carbomoylcholine chloride (CCh) (C4382, de chez sigma) (5.10^{-8} M à 5.10^{-4} M), un agoniste non-sélectif des récepteurs de l'ACh sont ainsi appliquées et, la réponse électrique est évaluée pour chaque concentration utilisée. En fin d'expérimentation, la réponse contractile colique maximale non spécifique est évaluée en appliquant dans le bain du KCl (150 μ M). Les courbes doses-réponses obtenues sont exprimées en fonction du pourcentage de la réponse maximale obtenue lorsque le KCl est appliqué. La réponse obtenue correspond alors à la somme des réponses liées à l'activation des récepteurs cholinergiques localisés sur les fibres musculaires du côlon mais également sur le système nerveux entérique (plus spécifiquement dans ce contexte sur les neurones du plexus myentérique).

Deuxième série d'expérience : l'objectif est l'évaluation de la part que prend le système nerveux entérique dans la réponse obtenue suite à la stimulation par le CCh. La première étape de cette expérience est l'évaluation de la contractibilité musculaire suite à une application de CCh à la dose de 5.10^{-6} M (EC50 : concentration permettant l'obtention de la moitié de la réponse maximale). La force de contraction musculaire dosée ici correspond à la réponse n°1 de l'expérience. Après rinçage des échantillons par du tyrode, la deuxième étape de cette expérience vise à évaluer cette même réponse au CCh (5.10^{-6} M) lorsque la transmission nerveuse intrinsèque est préalablement inhibée par de la tétródotoxine (TTX, inhibiteur des canaux sodiques) (10^{-3} M) (T8024 de chez Sigma). Dans ce contexte, 10 min après une application de TTX, le CCh est successivement ajouté dans le bain. La réponse alors mesurée correspond à la réponse n°2 de l'expérimentation.

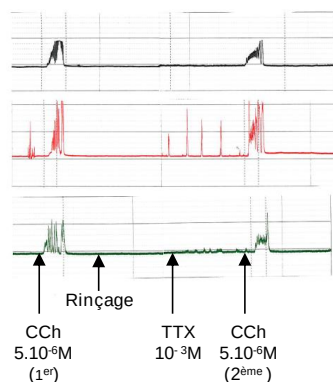


Figure 23 : Procédure expérimentale et exemple associé du type de réponse obtenue lors de l'expérimentation visant à évaluer la part de l'implication du SNE dans la réponse contractile du muscle circulaire colique lorsqu'une stimulation au CCh ($5.10^{-6}M$) est pratiquée.

Troisième série d'expérience : l'objectif est l'évaluation de la part que prend le contrôle inhibiteur de type nitroergique dans la réponse obtenue suite à la stimulation par le CCh. L'expérience réalisée ici est la même que celle décrite ci-dessus (dans la deuxième série d'expérience) à l'exception près que l'application de TTX est remplacée par une application de L-NG-Nitroarginine Methyl Ester (L-NAME) ($10^{-3} M$) (N5751 de chez Sigma), un antagoniste de la production de NO par inhibition de la NO synthase (NOS).

Dans les deux dernières séries d'expériences, les résultats sont exprimés en facteur d'augmentation mesuré, en faisant le rapport des réponses électriques n°2 sur les réponses électriques n°1 (figures 26 et 27).

2.3.2 Les expériences de viscérosensibilité motrice in vivo

Deux séries d'expériences ont été réalisées afin d'étudier l'impact d'un traitement (i) par les CSM (par voie i.v.) ou (ii) pharmacologique (par voie i.p.) en inhibant la production de NO sur l'allodynie mécanique radio-induite établie (cf. chapitre I partie 3.1.4). Dans un premier temps, nous avons vérifié que l'injection de PBS (par voie i.v. ou i.p.) ne modifiait pas les profils de réponse abdominale obtenus pour les animaux contrôles et irradiés. Ainsi, dans ces deux séries d'expériences, chaque animal est considéré comme étant son propre contrôle.

Première série d'expérience (i) : Dans un premier temps, afin d'évaluer le niveau basal de sensibilité viscérale des animaux contrôles et irradiés depuis 3 semaines, une distension colorectale (DCR) de 15 mmHg est appliquée sur chacun des animaux des deux groupes et les contractions abdominales (ou réponse de viscérosensibilité motrice (RVM)) enregistrées. Immédiatement après cet enregistrement les animaux sont passés sous anesthésie gazeuse (isoflurane) et sont injectés par voie i.v. avec 500 µl de PBS pour les animaux contrôles et avec 500 µl de PBS ou 5 millions de CSM pour les animaux irradiés. Une semaine après leur injection, ces animaux sont à nouveau soumis à une DCR de 15 mmHg et la RVM évaluée.

Deuxième série d'expérience (ii) : Comme précédemment le niveau basal de sensibilité viscérale des animaux contrôles et irradiés depuis 3 semaines et 5 jours est dans un premier temps évalué sur chacun des animaux des deux groupes après une DCR de 15 mmHg, et, la RVM est enregistrée. Deux jours plus tard, les animaux sont injectés par voie i.p. avec du PBS (1 ml) pour les animaux contrôles et avec du PBS (1 ml) ou du L-NAME (100 mg/Kg) pour les animaux irradiés. Deux heures après leurs injections une nouvelle DCR de 15 mmHg est réalisée, et, la RVM est enregistrée.

2.3.3 L'expérience d'immuno-histochimie

Les expériences immuno-histochimiques ont été réalisées à partir de trois groupes d'animaux : des animaux contrôles, des animaux irradiés depuis 4 semaines, et, des animaux irradiés depuis 4 semaines et qui ont reçu une injection de 5 millions de CSM par voie i.v. sous anesthésie gazeuse (isoflurane) une semaine auparavant.

Pour les acquisitions nous avons utilisé un microscope confocal (LSM 780 NLO, Carl Zeiss MicroImaging, Germany) et la quantification a été effectuée à l'aide du logiciel Histolab.

2.4 L'expression des résultats et le test statistique utilisé

Les résultats obtenus correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (erreur standard de la moyenne) de 5 à 8 animaux calculée à l'aide du logiciel SigmaPlot 11.0 software (Systat Software Incorporation). La différence entre les groupes a été analysée en réalisant un test one-way ANOVA suivi d'un test Tukey avec des différences qui sont considérées comme statistiquement différentes pour $P \leq 0.05$ (elles sont exprimées ainsi : * $P \leq 0.05$ versus contrôles et + $P \leq 0.05$ versus irradiés).

3 LES ÉTUDES EXPÉRIMENTALES

3.1 Les CSM résorbent l'effet de l'irradiation sur la contractibilité musculaire du côlon et sur la sensibilité viscérale.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'altération de la contractibilité du muscle circulaire. Nous avons aussi évalué sur ce paramètre l'impact d'une injection de 5 millions de CSM.

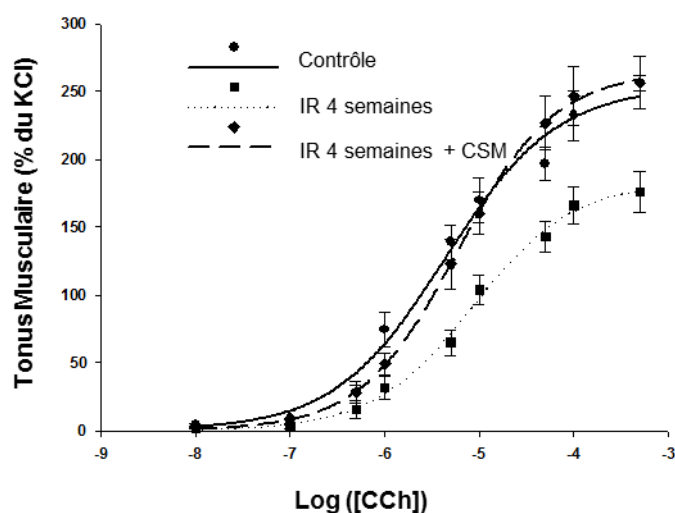


Figure 24 : Effet de l'irradiation sur le tonus du muscle circulaire colique en réponse à des doses croissantes de CCh, et, bénéfice thérapeutique de l'injection de CSM. Les CSM (5 millions) ont été injectées 3 semaines après l'irradiation (n= 7 à 8 par groupe).

Les courbes de la figure 24 représentent le tonus musculaire du muscle circulaire colique, exprimée en % de la réponse maximale au KCl, en fonction du logarithme des concentrations de CCh appliquées, et, ce, pour les trois groupes d'animaux testés. Nous obtenons une EC50 d'environ $4,6 \cdot 10^{-6}$ M, $8,58 \cdot 10^{-6}$ M et $6 \cdot 10^{-6}$ M ainsi qu'une réponse maximale (Emax) de $256,7 \pm 19,1$, de $175,9 \pm 14,7$ et de $256,1 \pm 5,3$, respectivement pour des animaux contrôles, irradiés et irradiés traités par CSM. Des différences statistiquement différentes sont obtenues pour la EC50 et la Emax entre les animaux contrôles et irradiés (* $P \leq 0.05$) et entre les animaux irradiés et irradiés traités par CSM (+ $P \leq 0.05$). Pour ces deux paramètres, i.e. la EC50 et la Emax, il n'existe pas de différence statistique entre les groupes contrôles et irradiés traités par CSM.

Ces résultats démontrent qu'après irradiation l'activité contractile du muscle circulaire colique est diminuée. De plus, nos données montrent que les CSM ont la capacité de restaurer le tonus musculaire altéré par l'irradiation une semaine après leur injection.

En parallèle de cette expérience, des tests de RVM pour une DCR appliquée de 15 mmHg ont été réalisés afin d'évaluer le potentiel antinociceptif des CSM dans des conditions expérimentales similaires.

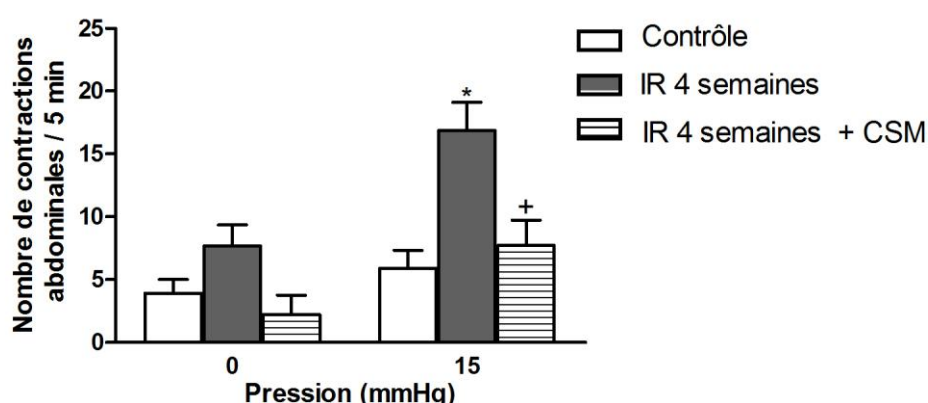


Figure 25 : Effet de l'irradiation sur la sensibilité viscérale et bénéfice thérapeutique des CSM. Les CSM (5 millions) ont été injectées 3 semaines après l'irradiation (n=5 à 7 par groupe).

Les histogrammes de la figure 25 représentent la RVM obtenue pour une DCR de 15mmHg chez des animaux contrôles et irradiés, dans ce deuxième cas, avant et après traitement par les CSM. Dans cette expérience chaque animal est considéré comme étant son propre contrôle. Au cours de cette expérience, nous retrouvons une augmentation statistique (* $P \leq 0.05$) de la réponse abdominale à la DCR de 15 mmHg chez les animaux irradiés par rapport aux animaux contrôles, traduisant une allodynie mécanique radio-induite. Une semaine après l'injection de 5 millions de CSM une diminution statistique (+ $P \leq 0.05$) de la réponse abdominale chez les animaux irradiés est obtenue. Après traitement des animaux irradiés par les CSM, la RVM obtenue après une CRD de 15 mmHg pendant 5 minutes est équivalente à celle obtenue pour des animaux contrôles.

Ces résultats démontrent que les CSM, dans ces conditions expérimentales, sont aussi capables de reverser l'allodynie mécanique observée chez les animaux irradiés une semaine après leur injection.

3.2 L'altération radio-induite de la contractibilité musculaire est en outre liée à une augmentation du contrôle inhibiteur du SNE, effet modulé par les CSM.

Comme explicité en 2.3.1, les réponses obtenues en figure 24 sont le résultat de la stimulation des fibres nerveuses et des fibres musculaires lisses par le CCh.

Dans l'étude qui suit, nous avons évalué quelle était la part du SNE dans la réponse contractile de la couche musculaire circulaire du côlon.

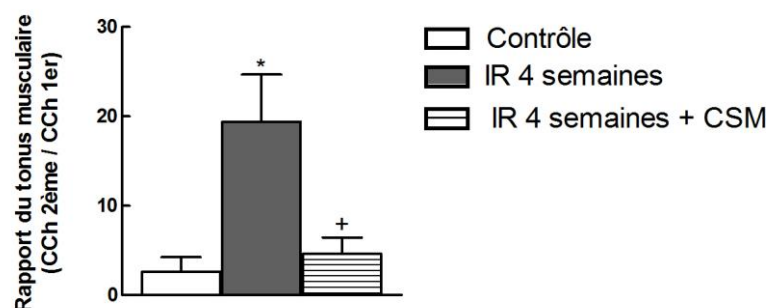


Figure 26 : Effet de l'inhibition de la transmission nerveuse, par la TTX, sur la réponse contractile du muscle circulaire colique lorsqu'une stimulation de CCh ($5 \cdot 10^{-6}$ M) est pratiquée, dans les trois groupes d'animaux testés. Les CSM (5 millions) ont été injectées 3 semaines après l'irradiation (n= 6 à 8 animaux par groupe).

Nous avons tout d'abord comparé les réponses contractiles obtenues suite à une stimulation au CCh ($5 \cdot 10^{-6}$ M) avant (réponse n°1) et après (réponse n°2) une inhibition de la transmission nerveuse du SNE par la TTX. Les histogrammes de la figure 26 correspondent à la moyenne des rapports de la réponse n°2 sur la réponse n°1 et, ce, pour des animaux contrôles, irradiés et irradiés traités par CSM. Nous observons un facteur d'augmentation de 7,4 de la réponse n°2 par rapport à la réponse n°1 pour les animaux irradiés en comparaison avec les animaux contrôles (* $P \leq 0.05$) et une diminution de ce facteur pour les animaux irradiés traités par des CSM en comparaison aux animaux irradiés (+ $P \leq 0.05$).

Ces résultats démontrent qu'après irradiation, le contrôle inhibiteur qu'exerce le SNE sur la contractibilité musculaire est augmenté. Ce résultat pourrait expliquer, au moins en partie, la diminution du tonus musculaire observée en figure 24. Les CSM, en favorisant le rétablissement de l'équilibre entre le contrôle inhibiteur et le contrôle exciteur du SNE, chez les animaux irradiés, pourrait ainsi participer à la restauration de l'altération du tonus musculaire induite par l'irradiation.

Le contrôle inhibiteur exercé par le SNE dépend majoritairement de deux neurotransmetteurs, le VIP et le NO^{*}. Parmi ces deux neurotransmetteurs nous avons fait le choix d'évaluer l'influence du NO^{*} dans la réponse de contractibilité du muscle circulaire colique à la stimulation par le CCh.

L'obtention du NO^{*} étant le résultat de la transformation de la L-arginine par les NOS, nous avons utilisé un antagoniste de ces enzymes, le L-NAME dans cette étude.

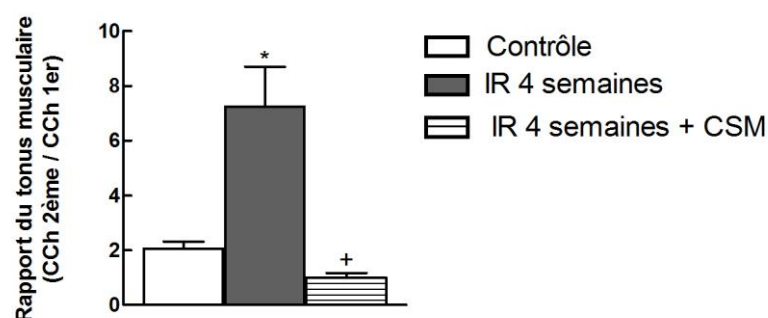


Figure 27 : Effet de l'inhibition de la NOS, par le L-NAME, sur la réponse contractile du muscle circulaire colique lorsqu'une stimulation de CCh ($5 \cdot 10^{-6}$ M) est appliquée, dans les trois groupes d'animaux testés. Les CSM (5 millions) ont été injectées 3 semaines après l'irradiation (n= 6 à 8 animaux par groupe).

La stratégie expérimentale mise en place pour cette expérience et l'exploitation des résultats ont été calquées sur celles de l'expérimentation réalisée avec la TTX, et les résultats obtenus présentés en figure 27. Dans ce cadre, le rapport d'augmentation de la réponse n°2 par rapport à la réponse n°1 est de 3,5 (* $P \leq 0.05$), pour les animaux irradiés en comparaison avec les animaux contrôles. De plus, une baisse significative de ce facteur est aussi observée pour les animaux irradiés ayant été traités par CSM en comparaison avec les animaux irradiés.

Ces résultats démontrent que le NO[•] est impliqué dans le dysfonctionnement radio-induit de la contractibilité du muscle circulaire colique et que les CSM sont capable d'agir sur cette dérégulation.

3.3 Le NO[•] joue également un rôle dans la physiopathologie de l'hypersensibilité viscérale radio-induite

Dans la littérature, une augmentation du NO[•] dans la muqueuse rectale de patients atteints d'IBS par rapport à des individus contrôles a notamment été décrite (Reinders et al., 2005). De plus, Kuiken *et al.*, démontrent que le L-NAME permet d'augmenter le seuil d'apparition de la douleur pour des patients hypersensibles atteints d'IBS. Les auteurs de cette étude suggèrent une implication du NO[•] dans la physiopathologie de la douleur viscérale des patients IBS (Kuiken et al., 2006). De plus, des études expérimentales menées dans des modèles de rongeurs d'hypersensibilité viscérale attestent également de l'implication du NO[•] dans les mécanismes de l'hypersensibilité viscérale (Shamshiri et al., 2009; Tjong et al., 2011).

Nous avons donc évalué dans notre modèle d'ulcération colorectale radio-induite, le rôle du NO[•] sur l'hypersensibilité viscérale obtenue.

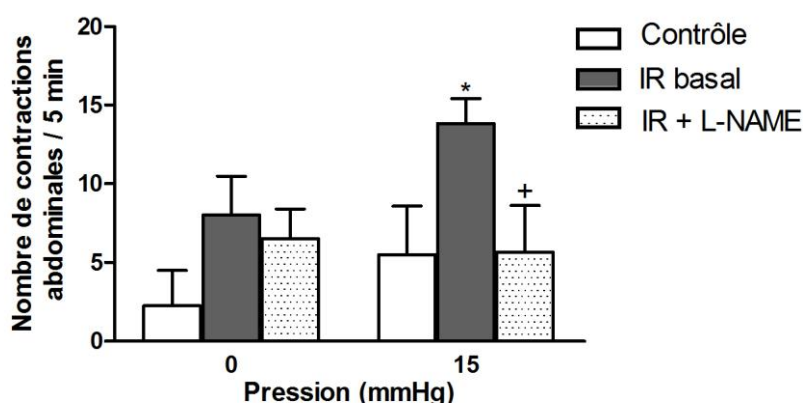


Figure 28 : Effet de l'inhibition de la NOS sur l'hypersensibilité viscérale radio-induite. Le L-NAME est injecté chez les animaux irradiés (10^{-3} M) deux heures avant le passage au barostat (n= 5 à 6 par groupe).

Les histogrammes de la figure 28 représentent la RVM obtenue pour une DCR de 15mmHg chez des animaux contrôles et irradiés, dans ce deuxième cas, avant et après injection par voie i.p. de L-NAME (100 mg/kg). Dans cette expérience, chaque animal de chaque groupe est considéré comme étant son propre contrôle. L'allodynie mécanique précédemment observée 2, 4 et 8 semaines après irradiation est retrouvée dans cette expérience à 3 semaines et 5 jours après irradiation ($*P \leq 0.05$). Deux jours après le passage des animaux en basal, et deux heures après l'injection de L-NAME, la RVM des animaux irradiés est diminuée de manière statistique par rapport à celle obtenue en conditions basales ($+P \leq 0.05$), atteignant ainsi le niveau de réponse des animaux contrôles.

Ces résultats préliminaires suggèrent une implication du NO^{*} dans les processus radio-induits de l'hypersensibilité viscérale. Afin de valider ces résultats, cette expérience devra être reproduite.

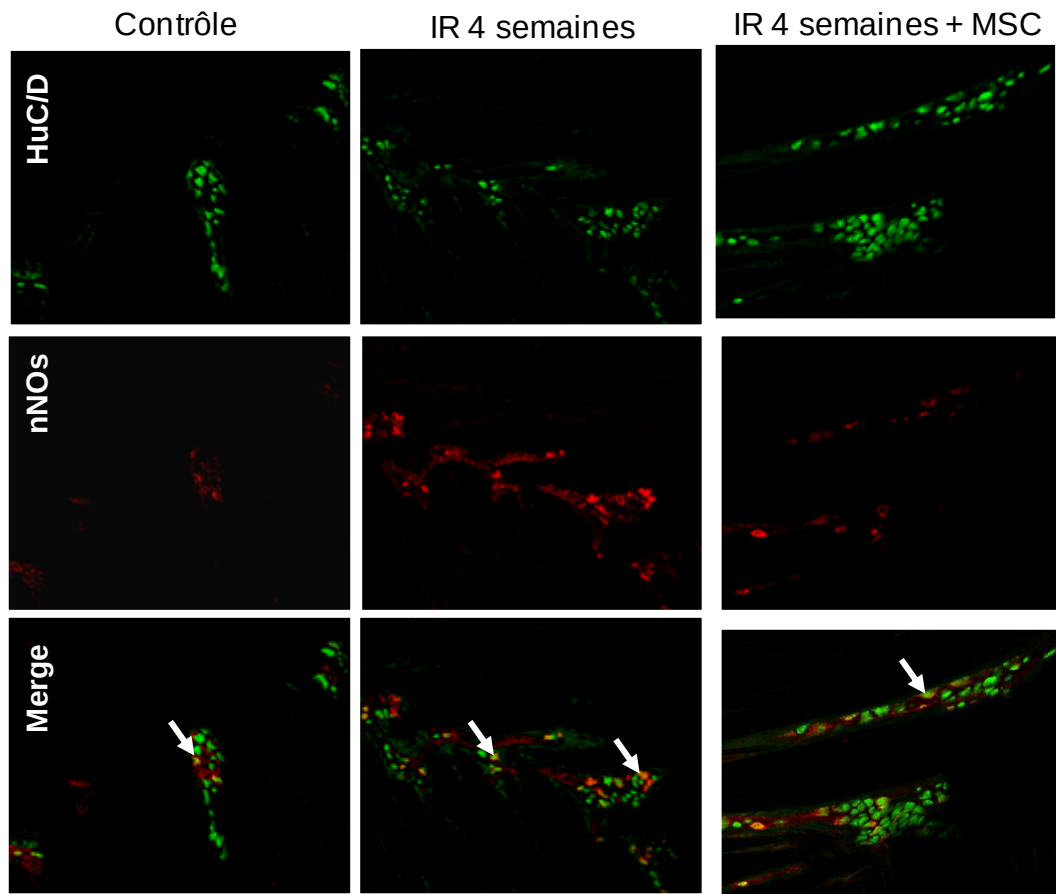
Trois isoformes de la NOS sont classiquement distingués : (i) la NO synthase neuronale (nNOS), (ii) la NO synthase endothéliale (eNOS) et (iii) la NO synthase inductible (iNOS). Les deux premières formes sont présentes respectivement au niveau des neurones et des cellules endothéliales. Leurs expressions sont constitutives contrairement à la iNOS qui est induite en particulier dans les contextes inflammatoires (Shah et al., 2004).

Le L-NAME étant un inhibiteur non spécifique des NOS, les expériences menées sur le rôle du NO^{*} ne permettent donc pas de conclure strictement sur l'implication du NO^{*} d'origine neuronale dans les résultats obtenus en 3.2 et 3.3.

Dans l'objectif de répondre de manière précise à une implication du nNO^{*} dans notre contexte d'étude des tests de contractibilité musculaire *ex vivo* et de RVM pourront être réalisés en utilisant des antagonistes spécifiques de la nNOS, de la eNOS et de la iNOS.

3.4 Les CSM réduisent l'augmentation du pourcentage de neurones nitrergiques observée après irradiation au niveau des plexus myentériques

Les expérimentations que nous avons réalisées nous permettent d'évaluer la proportion des neurones exprimant la nNOS au sein des plexus nerveux myentériques dans nos trois groupes d'animaux.



A

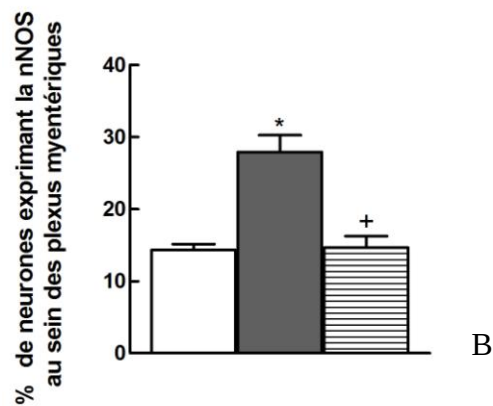


Figure 29 : Effet de l'irradiation avec ou sans traitement par CSM sur les variations du pourcentage de neurones nitrergiques au sein des plexus myentériques entre les groupes. (A. Photos représentatives des marquages immuno-histochimiques obtenus, B. Quantification du pourcentage de neurones (Huc/D) positifs pour le marquage de la nNOS par rapport au nombre total de neurones Huc/D positifs). Les CSM (5 millions) ont été injectées 3 semaines après l'irradiation (n= 8 à 10 animaux par groupe).

Nous avons réalisé en immuno-histochimie un co-marquage des neurones (Huc/D) NO⁺ au sein des plexus myentériques (figure 29 A). Le pourcentage des neurones nitrergiques au sein de la population totale des neurones composant les plexus myentériques a été évalué pour les animaux contrôles, irradiés et irradiés traités par CSM. Le résultat est représenté sous forme d'histogramme en figure 29B.

Chez les animaux irradiés, nous observons un doublement significatif du pourcentage de neurones nitrergiques par rapport aux animaux contrôles au sein des plexus myentériques (*P ≤ 0.05). Pour les animaux irradiés traités par CSM, le pourcentage de neurones nitrergiques est similaire à celui obtenu pour les animaux contrôles. Nous observons en effet une diminution statistique de leur pourcentage chez les animaux irradiés traités en CSM par rapport à celui quantifié chez les animaux irradiés non traités (+P ≤ 0.05).

Ces résultats suggèrent que l'irradiation entraîne une augmentation du NO⁺ d'origine neuronale au niveau du côlon qui pourrait être réduite suite à un traitement par des CSM.

Le rôle de ces neurones dans les processus d'altération de la contractibilité colique et de la sensibilité viscérale, ainsi que l'effet bénéfique de leur régulation par les CSM sur ces altérations radio-induites, peuvent être suggérés dans cette étude.

4 RÉCAPITULATIF DES RÉSULTATS OBTENUS ET DISCUSSION

4.1 *Recapitulatif des résultats*

Les résultats complémentaires de cette étude, obtenus au cours de ma thèse, ont été présentés dans ce chapitre de résultats.

La réalisation de ces études expérimentales permet (figure 30):

- de caractériser plus précisément les mécanismes de la physiopathologie des complications intestinales radio-induites dans notre modèle. En effet, nous démontrons après irradiation, associée à l'altération de la sensibilité viscérale, une diminution de la contractibilité du muscle circulaire colique lorsqu'une stimulation cholinergique est appliquée. Cette diminution est notamment liée à une augmentation du contrôle inhibiteur, exercé par le SNE, sur les fibres musculaires,

- de suggérer une double implication du NO^{*}, et notamment du nNO^{*}, dans les altérations radio-induites décrites (figure 30, flèches bleues et flèches 2 et 3), et,
- de démontrer le bénéfice thérapeutique des CSM sur ces deux altérations radio-induites dans nos conditions expérimentales. La capacité des CSM à réguler le NO^{*} d'origine neuronale au niveau du côlon pourrait jouer un rôle important dans le rétablissement du dysfonctionnement de la contractibilité musculaire colique mais également de l'altération de la sensibilité viscérale (figure 30, flèches vertes).

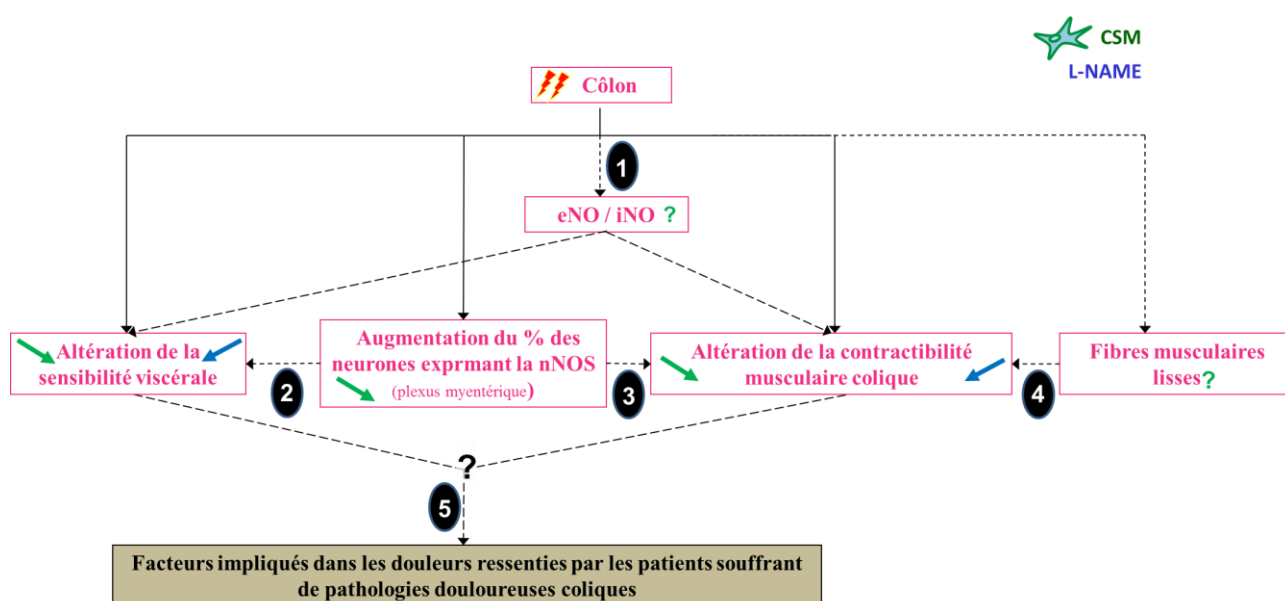


Figure 30 : Schéma récapitulatif des différents résultats présentés dans cette partie et de leurs intrications supposées.

Les flèches pleines correspondent aux démonstrations expérimentales effectuées dans notre modèle d'étude. Les flèches en pointillées correspondent (i) aux modifications biologiques présumées après irradiation que nous n'avons pas étudié dans cette étude, et, (ii) aux intrications probables entre les altérations biologiques et/ou fonctionnelles démontrées ou suggérées dans cette étude. Les éléments donnés en rose, en vert et en bleu correspondent respectivement aux altérations radio-induites, à l'effet du traitement par les CSM ou le L-NAME sur ces altérations (éléments démontrées ou présumés).

Des expérimentations supplémentaires pourront être envisagées afin de compléter cette étude et ainsi valider les hypothèses qui sont proposées dans la partie discussion qui suit.

4.2 Discussion des résultats

Au regard de ces résultats nous avons décidé de discuter dans cette sous-partie :

- de l'implication du NO^{*} dans les mécanismes de l'hypersensibilité viscérale ;
- du rôle que pourrait jouer l'altération des fibres musculaires lisses dans la réponse contractile que nous observons après irradiation. Nous évoquons aussi le bénéfice de l'injection des CSM dans leur potentiel de restauration ;
- du double bénéfice thérapeutique de l'injection des CSM dans la restauration des altérations radio-induites observées.

4.2.1 Le rôle du NO^{*} et la sensibilité viscérale

Nous démontrons après irradiation une implication fonctionnelle du NO^{*} (barostat, expérimentation avec le L-NAME) dans l'altération de la sensibilité viscérale.

L'origine du NO^{*} peut être mixte : neuronale, endothéliale (figure 30, flèche 1) et inflammatoire (figure 30, flèche 1). Dans le contexte de l'irradiation, l'augmentation du NO^{*} dans la muqueuse intestinale chez des rongeurs est au moins en partie d'origine inflammatoire (Erbil et al., 1998; Freeman and MacNaughton, 2000) et d'ailleurs probablement mixte. Les résultats obtenus suite à l'inhibition de la NOS dans notre modèle pourraient donc être la résultante de l'inhibition de la production de NO^{*} d'origine diverse. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des différentes NOS, comme évoqué précédemment, nous permettrait de répondre à cette question.

Lors de nos expériences nous avons cependant démontré une augmentation du pourcentage des neurones nitrergiques au sein des plexus myentériques. Or, des études attestent d'une implication du NO^{*} d'origine neuronale et/ou des neurones nitrergiques dans la physiopathologie de l'hypersensibilité viscérale.

D'une part Tjong *et al.*, mettent en évidence dans un modèle de stress de déprivation maternelle que l'augmentation du NO^{*}, spécifiquement d'origine neuronale, au niveau de l'intestin, est impliquée dans les mécanismes périphériques de l'hypersensibilité viscérale (Tjong et al., 2011). D'autre part, Suckow *et al.*, suggèrent même l'existence d'une population spécifique de neurones nitrergiques du SNE, les neurones Afférents Colospinaux (CAN), qui seraient directement impliqués dans la nociception viscérale. Ces CAN projettent directement

au niveau L6-S1 de la moelle épinière dans les laminae I-II. Ils expriment le récepteur PAR2 mais pas le récepteur TRPV1 (Suckow and Caudle, 2008). De plus, dans leurs études de 2009 et 2012, ces auteurs suggèrent que les CAN seraient plus précisément impliqués dans les processus de maintien de l'hypersensibilité viscérale en conditions inflammatoires (Suckow and Caudle, 2009 and Suckow et al 2012). Ainsi, l'augmentation des neurones nitrergiques dans notre modèle où une inflammation radio-induite a été décrite (Bessout et al., 2013) pourrait correspondre en partie à une augmentation de ces CAN. Par une telle hyperplasie de ces neurones, le NO^{*} pourrait donc participer aux mécanismes de maintien de l'hypersensibilité viscérale radio-induite que nous avons mis en évidence dans notre modèle d'étude (cf. chapitre III article 1).

Cependant, une implication directe du neuromédiateur NO^{*} dans les processus physiopathologiques de la douleur viscérale est aussi à considérer au niveau du système nerveux central. A ce titre, Coutinho *et al.*, démontrent par exemple au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, l'implication de ce neuromédiateur dans le maintien de l'hypersensibilité viscérale dans un modèle d'inflammation colique chez le rat (Coutinho et al., 1996). Dans notre étude expérimentale, nous avons utilisé le L-NAME qui est un composé capable de traverser la barrière hémato-encéphalique. L'implication du NO^{*} au niveau du système nerveux central dans la physiopathologie de l'hypersensibilité viscérale radio-induite n'est donc pas à mésestimer dans notre modèle d'étude. Une injection intrathécale de NOS, préalablement à la réalisation d'un test de RVM en réponse à des DCR permettrait d'amener des éléments de réponse sur ce point dans notre modèle d'étude.

4.2.2 L'implication des fibres musculaires lisses dans les réponses de contractibilité musculaires coliques observées.

Nous avons démontré que la diminution de la contractibilité musculaire observée dans notre modèle après irradiation est en partie, le résultat d'une augmentation du contrôle inhibiteur exercé par le SNE sur les fibres musculaire lisses coliques.

L'activité contractile du côlon est aussi soumise à un contrôle myogénique i.e. à la capacité des cellules musculaires lisses de l'intestin à générer une activité électrique.

Or, l'altération des fibres musculaires lisses coliques après irradiation (figure 30, flèche 4), bien que ce point n'ait pas été étudié au cours de ma thèse, participe probablement à l'altération de la contractibilité musculaire colique observée après irradiation. En effet, des

altérations moléculaires, structurelles et fonctionnelles des fibres lisses musculaires après irradiation ont déjà été démontrées dans différents modèles d'étude (Alexakis et al., 2001, 2004; Esposito et al., 1996; Heckenkamp et al., 2004; Schachinger et al., 1982). Particulièrement, Esposito *et al.*, démontrent l'augmentation des récepteurs à la SP au niveau des fibres musculaires lisses intestinales après irradiation (Esposito et al., 1996). Or, la SP est décrite comme étant directement impliquée dans les régulations physiologiques intestinales notamment du péristaltisme et de l'activité propulsive de cet organe. D'autre part, la présence d'un processus inflammatoire, comme décrit dans notre modèle (Bessout et al., 2013), peut également favoriser de telles modifications. En effet, Chéon *et al.*, démontrent notamment une diminution de l'expression, par les fibres musculaires lisses, des Transient Receptor Potentiel Canonical TRPC dans un modèle d'inflammation au TNBS chez la souris. Les auteurs de cette étude démontrent que de telles modifications moléculaires sont associées à une diminution de la contractibilité musculaire colique (Cheon et al., 2012).

Ensuite, nous avons démontré que la restauration de la contractibilité colique par les CSM est favorisée par leur modulation de la balance inhibitrice/excitatrice du SNE, altérée par l'irradiation.

Outre cet effet observé expérimentalement, la capacité des CSM à agir par une action directe sur les fibres musculaires lisses peut être suggérée, et, probablement participer ainsi à la restauration de l'activité contractile du muscle circulaire colique. En effet, de nombreuses études réalisées *in vitro* démontrent la capacité des CSM à se différencier en cellules ayant un phénotype et/ou une activité contractile similaires à celles de cellules musculaires lisses (Espagnollet et al., 2014; Gong and Niklason, 2011; Kinner et al., 2002; Park et al., 2013; Wang et al., 2006). De plus, des résultats similaires ont été obtenus *in vivo* dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le rongeur lorsque les CSM sont injectées localement. Les auteurs de cette étude suggèrent qu'elles pourraient exercer leur effet *via* leur différenciation *in vivo* (Quevedo et al., 2009). Cependant, dans cette dernière étude, une action paracrine des CSM dans la restauration de l'activité contractile du myocarde ne peut cependant être exclue.

Ainsi l'altération radio-induite de la contractibilité musculaire du côlon, et sa restauration successivement au traitement par CSM pourraient aussi être dépendante de l'état d'activité des fibres musculaires lisses dans notre modèle d'étude.

4.2.3 Le double bénéfice thérapeutique des CSM

L'altération chronique de la motricité intestinale peut participer à une sensibilisation des fibres nerveuses sensorielles et entraîner à terme une augmentation de la sensibilité viscérale. De plus, dans un contexte périphérique déjà sensibilisé, la genèse de contractions géantes migrantes intestinales peuvent être à l'origine des douleurs abdominales, comme cela est décrit pour des patients atteints d'IBS ou d'IBD (Annese et al., 1997; Chey et al., 2001; Clemens et al., 2003; Kellow and Phillips, 1987; Wood, 2007) (figure 30, flèche 5).

Dans le chapitre III de cette thèse, nous avons décrit les mécanismes d'une sensibilisation périphérique après irradiation et suggérons l'implication des MC et de leur communication avec les fibres nerveuses dans ce processus pathologique.

Les résultats de nos expériences présentés dans ce chapitre IV suggèrent une altération radio-induite de la motricité du côlon. En effet, nous observons dans les zones irradiées coliques (i) une diminution de l'efficacité du contrôle excitateur cholinergique sur la contractibilité des muscles circulaires, (ii) une augmentation du contrôle inhibiteur de type nitrergique sur la contractibilité des muscles circulaires, et, (iii) une augmentation de l'immuno-marquage par la SP des fibres nerveuses observées dans la couche musculaire circulaire (résultats décrits et discutés dans l'article 1 du chapitre III).

Dans nos diverses études, nous démontrons aussi que les CSM modulent les différentes altérations radio-induites : sensibilisation périphérique (résultats du chapitre III) **et altérations fonctionnelles de la contractibilité musculaire** (résultats du chapitre IV). Par ce double bénéfice thérapeutique, les CSM pourraient ainsi certainement favoriser la réversion de l'allodynie mécanique radio-induite dans notre modèle.

CHAPITRE V

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

La thérapie cellulaire s'inscrit comme un outil prometteur en médecine régénérative pour le traitement des altérations tissulaires et fonctionnelles organiques. Les stratégies thérapeutiques, à base de cellules souches, sont désormais plébiscitées par la communauté scientifique et médicale dans le cadre du traitement de pathologies incurables, comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou le diabète. Les avancées scientifiques et technologiques, réalisées dans le domaine des cellules souches ces 20 dernières années, ont en effet favorisé leur utilisation en tant que produit de thérapie cellulaire.

Plus particulièrement, les CSM, de par leurs caractéristiques et leurs propriétés biologiques, sont un des produits cellulaires les plus utilisés en médecine régénérative. Leur potentiel thérapeutique a déjà fait ses preuves, notamment dans le traitement des pathologies inflammatoires du tube digestif ou IBD, et ceci, à la fois dans le cadre d'études expérimentales (Chen et al., 2013) et d'essais cliniques (Duijvestein et al., 2010; Lazebnik et al., 2010). Dans ces contextes pathologiques, leurs propriétés immuno-modulatrices et régénératrices constituent un réel atout thérapeutique.

La « pelvic radiation disease » est une pathologie multi-organes, induite par l'effet des rayonnements ionisants, délivrés localement et à forte dose (radiothérapie), au niveau des tissus sains ; et, elle est caractérisée par des dommages lésionnels et fonctionnels multiples et irréversibles. Les affections occasionnées engendrent des complications gastro-intestinales notamment tardives très invalidantes pour un nombre grandissant de patients. Les traitements utilisés dans ce contexte sont seulement symptomatiques. A ce jour, aucune stratégie curative, qui permettrait de s'attaquer directement aux altérations biologiques sous-tendant ces symptômes, n'a été validée.

Ainsi, et, sur la base des caractéristiques physiopathologiques décrites de cette pathologie radio-induite, l'utilisation des CSM en thérapie cellulaire, semble être une stratégie prometteuse pour induire un processus de guérison chez les patients concernés.

Parmi les symptômes attribués à la « pelvic radiation disease », les douleurs viscérales chroniques font partie de ceux qui impactent le plus considérablement la vie de ces « survivants au cancer ». Les co-morbidités psychiatriques occasionnées peuvent être ravageuses, et, pour autant, la prise en charge de ces douleurs, complexes, reste insatisfaisante. Un tel constat découle notamment de l'absence d'études expérimentales sur ces douleurs viscérales radio-induites et sur le manque de compréhension des mécanismes

biologiques spécifiques les sous-tendant. Une analyse mécanistique semble pourtant nécessaire afin de proposer des solutions de traitements efficaces.

Au sein de notre laboratoire, un modèle d'ulcération colorectale chez le rat reproduisant des lésions histologiques similaires à celles observées chez des patients soumis à une radiothérapie pelvienne a été développé et caractérisé (François et al., 2013; Sémont et al., 2013). Dans ce modèle, une augmentation du processus inflammatoire a aussi été caractérisée après irradiation (Bessout et al., 2013). A ce titre, une hyperplasie mastocytaire a notamment été décrite. De plus, des données internes du laboratoire suggèrent des altérations de la motricité colique. Dans des pathologies de type IBS et IBD, de telles altérations biologiques participent aux mécanismes périphériques de l'hypersensibilité viscérale. Ainsi, l'étude de l'hypersensibilité viscérale radio-induite dans le modèle développé au laboratoire peut être envisagée. D'autre part, l'implication des modifications biologiques précédemment évoquées, dans les mécanismes périphériques sous-tendant ce type de douleur, après irradiation, peut être examinée.

En outre, les connaissances sur le bénéfice thérapeutique des CSM, caractérisées dans ce modèle d'étude, doivent être élargies. Dans ce modèle, les CSM sont capables de moduler les altérations radio-induites susceptibles d'être étiologiquement responsables de l'apparition de sensations douloureuses, comme les processus inflammatoires (Bessout et al., 2013). De plus, les CSM, par leurs actions biologiques pléiotropiques et multi-sites, pourraient représenter un outil thérapeutique de choix dans la modulation de telles douleurs chroniques. En effet, en agissant à différents niveaux, périphérique et/ou central, les CSM injectées par voie i.v. modulent la douleur chronique neuropathique d'origine somatique chez les rongeurs, et ceci pendant plusieurs mois après leur injection (Guo et al., 2011; Siniscalco et al., 2011). Enfin, l'étude de Voswinkel *et al.*, suggère une diminution de la douleur chez trois patients ayant reçu, à titre compassionnel, des injections de CSM. Toutefois, jusqu'à présent aucune étude expérimentale ne s'est attachée à démontrer le potentiel antinociceptif d'une injection systémique de CSM dans un modèle d'hypersensibilité viscérale, qu'elle soit d'origine radio-induite ou tout autre.

Ce travail, dans la continuité des recherches du laboratoire, s'est ainsi articulé autour de plusieurs axes majeurs.

Tout d'abord, le modèle d'ulcération colorectale radio-induite chez le rat a été validé en tant que modèle de douleur viscérale chronique. En effet, une hypersensibilité viscérale à la DCR, associée à une hyperexcitabilité neuronale (immuno-histochimie) spinale qui perdure dans le temps ont d'abord été démontrées. Cette étude cinétique a été menée de 2 semaines jusqu'à 8 semaines après irradiation.

Ensuite, nous avons mis en évidence l'implication fonctionnelle des MC dans les mécanismes périphériques de l'hypersensibilité viscérale radio-induite. Une corrélation a d'ailleurs été observée entre l'augmentation de la proximité des MC tryptase⁺ et des fibres nerveuses au niveau du côlon et, l'altération de la sensibilité viscérale après irradiation. Dans cette étude, la participation du NO^{*} dans les mécanismes périphériques de sensibilisation a aussi été suggérée. Elle pourrait notamment être le résultat d'une augmentation du pourcentage des neurones entériques du côlon exprimant la nNOS après irradiation.

Une altération de la contractibilité colique a aussi été démontrée après irradiation dans notre modèle. Une telle altération pourrait jouer un rôle dans l'altération de la motricité intestinale et favoriser de manière indirecte l'altération de la sensibilité viscérale.

Enfin, l'efficacité des CSM comme agent antinociceptif pour moduler l'hypersensibilité viscérale radio-induite chronique a été démontrée, et ceci, dans des conditions expérimentales diverses. Au niveau du côlon irradié, 1 semaine après le traitement par CSM, une diminution à la fois des interactions entre les MC tryptase⁺ et les fibres nerveuses et du pourcentage des neurones entériques nitrergiques au sein des plexus myentériques a été observée. De plus, le traitement par CSM permet aussi de rétablir la contractibilité colique altérée au niveau du côlon irradié. Le potentiel antinociceptif des CSM pourrait résulter notamment de ces modifications biologiques observées après traitement chez des animaux irradiés.

Dans une première partie, je me propose d'explicitier et de valider, au regard de la littérature, les choix stratégiques expérimentaux mis en œuvre au cours de mon projet doctoral.

1 LE CHOIX DES STRATÉGIES EXPÉRIMENTALES

1.1 La pertinence du modèle d'étude de la « pelvic radiation disease »

Nous avons décidé d'étudier l'hypersensibilité viscérale chronique radio-induite dans le modèle d'ulcération colorectale radio-induite mis en place, chez le rat, au sein du laboratoire.

Dans ce modèle, les rats sont soumis à une irradiation localisée au niveau colorectal à la dose unique de 27 Gy. La fenêtre d'irradiation correspond à une zone de 2 cm sur 3 cm comme représenté sur la figure 31.

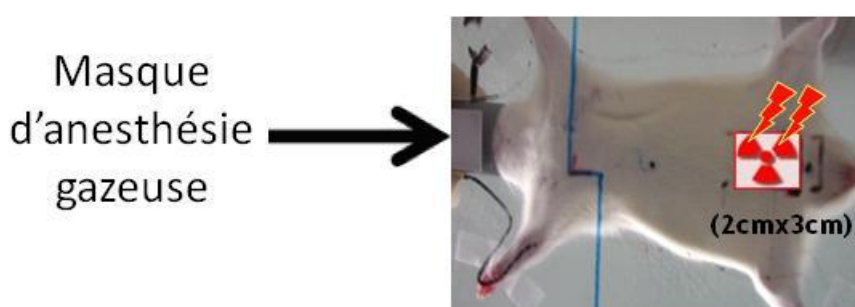


Figure 31 : Vue de dessous d'un rat (275 grammes) et délimitation de la fenêtre d'irradiation colorectale. L'application de la dose de 27 Gy se fait via une source de cobalt 60 sous anesthésie gazeuse (rayonnement γ , 1 Gy/ min).

Les raisons pour lesquelles mon étude a été menée dans ce modèle d'étude ont déjà été discutées, notamment, en introduction de cette discussion.

En revanche, l'ensemble des paramètres qui valide l'utilisation d'un tel modèle en tant que modèle de « pelvic radiation disease » adapté à l'étude des lésions intestinales radio-induites, n'a été que partiellement évoquées. Ces paramètres sont donc discutés dans cette sous-partie.

1.1.1 Le choix de l'application d'une dose d'irradiation forte et unique au niveau intestinal

Tout d'abord, parmi l'ensemble des organes sains exposés aux rayonnements ionisants lors d'une radiothérapie pelvienne, le laboratoire a choisi de s'intéresser plus spécifiquement aux effets des rayonnements ionisants sur le tractus digestif. En effet, lors de ce type de traitement, il est à la fois l'organe qui présente la plus grande toxicité organique et celui qui

engendre les complications qui altèrent le plus grandement la qualité de vie de ces « survivants au cancer » (Andreyev, 2007; Andreyev et al., 2010, 2011).

Bien que la mise en place d'une telle procédure expérimentale soit éloignée des protocoles de radiothérapie, fractionnés (classiquement par dose de 2 Gy), elle est indispensable à l'obtention des lésions sévères avec l'apparition d'une fibrose intestinale dans des modèles de rongeurs. En effet, ces animaux sont plus radiorésistants et ont une meilleure capacité de régénération que les hommes. Ainsi, afin d'obtenir le type de lésions souhaité dans les modèles murins, une forte dose d'irradiation et une application unique sont préférables (Followill and Travis, 1995; Followill et al., 1993; Gremy et al., 2008; Langberg et al., 1992).

De telles conditions expérimentales (fortes doses d'irradiation) impliquent alors l'utilisation d'une irradiation localisée, et exclue la pratique d'une irradiation corps entier, qui entraînerait la mort des animaux avant l'apparition d'une fibrose intestinale radio-induite.

1.1.2 Le choix d'un modèle d'irradiation localisée au niveau colorectal

Il est alors possible de travailler sur l'intestin grêle ou le côlon-rectum. Avant d'expliquer notre choix qui s'est porté sur le côlon-rectum, je me propose de vous présenter brièvement les différents modèles d'études de lésions intestinales radio-induites existants.

Les modèles d'études de lésions radio-induites de l'intestin grêle de rongeurs ont été d'abord développés et caractérisés en précoce et en tardif dans d'autres laboratoires (Hauer-Jensen et al., 1983, 1985, 1998; Rubio and Jalnas, 1996). Dans ces modèles, une chirurgie est nécessaire pour permettre d'irradier l'intestin grêle à forte dose sans exposer d'autres organes. Deux techniques peuvent être mises en place : (i) la technique de l'intestin scrotalisé et (ii) celle de la anse intestinale extériorisée (Hauer-Jensen et al., 1983; Rubio and Jalnas, 1996). Dans le premier cas, une anse du grêle est positionnée dans le scrotum du rat castré, et peut être irradiée à plusieurs reprises. Dans le deuxième cas, l'anse intestinale est externalisée, irradiée puis replacée dans l'abdomen de l'animal ; et, l'intestin ne peut donc être irradié qu'une seule fois. Des modèles d'irradiation colorectale chez le rongeur ont aussi été développés et caractérisés (Followill and Travis, 1995; Followill et al., 1993). Ils permettent entre autre de s'affranchir de l'étape chirurgicale et du biais expérimental que ce type de procédure peut occasionner, avec notamment un risque d'infection.

Dans notre cas, nous avons souhaité travailler avec un modèle d'irradiation localisée au niveau du côlon-rectum, ce qui nous permet de nous affranchir de l'étape de chirurgie, mais aussi et surtout, sur la base des arguments expliqués en suivant. Tout d'abord, comme décrit dans le premier chapitre de cette thèse, un grand nombre de patients est concerné par les effets des rayonnements ionisants au niveau de la partie distale du tractus digestif. En effet, le côlon et le rectum sont des OAR de cancers pelviens à forte prévalence dans la population (cf. chapitre I partie 1.3). De plus, leur position fixe dans le pelvis favorise la répétition de leurs expositions aux rayonnements ionisants lors des différentes séances de radiothérapie (Bessout et al., 2013). Enfin, en utilisant une telle configuration d'irradiation, des portions d'autres organes pelviens, comme la vessie, la prostate et les vésicules séminales, sont exposées aux rayonnements ionisants. La « pelvic radiation disease » étant une pathologie multi-organes, ceci est intéressant dans le contexte de notre étude.

De plus, comme démontré dans notre laboratoire, l'utilisation de la dose unique de 27 Gy localisée au niveau colorectal permet de reproduire les altérations histologiques observées dans des résections de patients 5 à 7 semaines après avoir été soumis à une radiothérapie pré-opérative pelvienne (45 Gy, fraction of 2 or 1.8 Gy) pour lutter contre des adénocarcinomes multiples rectaux (François et al., 2013; Sémont et al., 2013). En effet, des lésions sévères et irréversibles, comme celles décrites chez les patients avec l'apparition de processus inflammatoires, d'une ulcération de la muqueuse, de la mise en place de fibrose et de dommages vasculaires et musculaires, sont observées (François et al., 2013; Jullien et al., 2009; Sémont et al., 2013).

Dans mon travail de thèse, ce modèle a donc été utilisé afin d'étudier l'hypersensibilité viscérale radio-induite et sa modulation par les CSM.

1.2 Le choix des CSM et des conditions expérimentales de leur utilisation

Le bénéfice thérapeutique des CSM est avéré expérimentalement dans un contexte radio-induit, et, en tant qu'agent antinociceptif dans le cas des douleurs somatiques d'origine neuropathique (cf. chapitre I partie 6.3.2). Leurs effets biologiques pléiotropiques et multi-sites en font des armes thérapeutiques de choix pour évaluer leur potentiel dans la modulation de l'hypersensibilité viscérale radio-induite.

De plus, dans un cadre clinique, leur faible immunogénicité et leurs propriétés immunosuppressives facilitent leur utilisation dans un contexte allogénique. Au-delà de ces aspects, leur utilisation est favorisée par : (i) leur accessibilité, (ii) leur potentiel d'expansion en culture, (iii) l'absence de problème éthique que leur utilisation pourrait susciter, et, enfin (iv) leur innocuité, avérée jusqu'à ce jour (cf. chapitre I partie 6.3).

Ces éléments sont autant d'arguments qui ont orienté notre choix vers les CSM en tant que stratégie thérapeutique dans le cadre de mon projet doctoral.

Les conditions expérimentales que nous avons mises en œuvre au cours de ce travail de recherche pour évaluer leur efficacité sont discutées ci-après.

1.2.1 Le choix de la voie d'injection systémique des CSM

Afin de se rapprocher des conditions cliniques et d'obtenir un bénéfice thérapeutique optimal, dans notre contexte, nous avons décidé de procéder à l'injection des CSM par voie i.v. .

En effet, lors d'essais cliniques utilisant les CSM , la voie d'injection par i.v. est la plus communément utilisée (<http://clinicaltrials.gov>). En outre, dans le cas d'une pathologie multi-organes, ce type d'injection plutôt qu'une injection locale peut être préféré, car elle permet une meilleure dispersion des cellules vers les sites lésés ou inflammés. De plus, dans le cas d'un organe interne, comme le côlon, la voie d'injection locale est délicate et plus contraignante pour le patient.

Enfin, l'utilisation d'une telle stratégie nous a également permis de pouvoir nous appuyer sur les données du laboratoire obtenues dans notre modèle d'étude dans des conditions expérimentales similaires.

1.2.2 Le choix de la quantité de CSM injectées

Afin d'évaluer le potentiel antinociceptif des CSM dans notre étude, sur la base de recherches bibliographiques et de l'expérience acquise au sein du laboratoire, nous avons défini deux quantités de cellules à injecter.

Dans une première série d'expériences, nous avons décidé d'évaluer l'effet d'une injection de 1,5 millions de CSM sur l'hypersensibilité viscérale radio-induite.

Jusqu'alors, l'effet antinociceptif d'une injection systémique de CSM avait été évalué dans quelques études à l'aide de modèles murins de douleur neuropathique. Guo *et al.*, ont démontré un effet antinociceptif des CSM chez des rats neuropathiques lorsque 1,5 millions de cellules étaient injectées par voie i.v. . Lorsque ces auteurs injectaient une quantité moindre de cellules, cet effet n'était pas retrouvé (Guo et al., 2011). Nous nous sommes basés sur les résultats obtenus par cette équipe car la comparaison avec l'étude de Klass *et al.*, ainsi que celle de Siniscalco *et al.*, s'avérerait plus délicate au regard de nos contextes expérimentaux respectifs. En effet, dans l'étude de Klass *et al.*, ce sont des cellules mononuclées de moelle osseuse totale qui sont injectées (Klass et al., 2007) alors que dans l'étude de Siniscalco *et al.*, les animaux neuropathiques sont des souris (Siniscalco et al., 2011).

D'autre part, dans une deuxième série d'expériences, nous avons décidé d'évaluer le bénéfice de l'injection par voie i.v. de 5 millions de cellules sur l'hypersensibilité viscérale radio-induite, pour se rapprocher des conditions expérimentales classiquement utilisées au laboratoire.

En effet dans notre modèle d'étude, l'efficacité thérapeutique de l'injection de différentes quantités de CSM a été testée sur leur potentiel de réparation des lésions radio-induites. Tandis que pour 100 000 et 1 million de cellules injectées, aucune amélioration statistique du score lésionnel n'a été obtenue, l'injection de 5 ou 10 millions de cellules a permis une amélioration significative de ce score (Sémont et al., 2013). Comme l'injection de 10 millions de cellules augmente le risque d'embolie pulmonaire et de mort chez les animaux traités (données internes au laboratoire), l'injection de 5 millions de cellules lui a été préférée. Pour cette quantité de cellules injectées, une modulation des processus inflammatoires radio-induits a d'ailleurs aussi été mise en évidence au sein du laboratoire (Bessout et al., 2013).

Nous avons injecté les cellules à chaque fois après leur 1^{er} passage de culture, en P1. Le bénéfice thérapeutique des CSM dans de nombreuses études semble en effet être dépendant du nombre de passages avant leur injection. Ceci semble aussi être le cas en ce qui concerne leur potentiel antinociceptif (Guo et al., 2011).

Pour les deux quantités de CSM injectées, nous avons démontré une réversion de l'allodynie mécanique radio-induite une semaine après leur injection. Un tel potentiel antinociceptif des CSM n'a jusqu'alors été démontré expérimentalement que dans le cas de douleurs neuropathiques somatiques (Guo et al., 2011; Klass et al., 2007; Musolino et al., 2007; Siniscalco et al., 2010, 2011). Nos résultats démontrent expérimentalement, pour la première fois, le pouvoir antinociceptif des CSM dans le cadre d'une hypersensibilité d'origine viscérale et dans un autre contexte pathologique, complexe, radio-induit.

En revanche, nous n'avons pas mis en évidence un tel effet 1 jour après leur injection, à la dose de 1,5 millions. Ce dernier résultat est en accord avec celui obtenu par Siniscalco *et al.*, en 2010 dans un modèle de douleur neuropathique établie. En effet, dans ce modèle, un effet antinociceptif des CSM n'a été mis en évidence que 6 jours après leur injection locale alors qu'après 3 jours aucun effet n'a été observé (Siniscalco et al., 2010). L'effet antalgique des CSM semble donc se mettre en place progressivement, au bout de quelques jours, comme cela a été également décrit pour les patients d'Epinal ayant reçu des CSM à titre de traitement compassionnel (Voswinkel et al., 2013).

1.2.3 Le choix du moment de l'injection des CSM

Nous avons décidé d'évaluer le potentiel antinociceptif des CSM lorsque les cellules sont injectées 3 et 4 semaines après irradiation à savoir lorsque l'hypersensibilité viscérale est établie et persistante.

En effet, l'application de la thérapie cellulaire par CSM dans le cadre des effets secondaires des radiothérapies est envisagée à titre curatif i.e. dans un contexte où les complications sont importantes et tardives. Dans le contexte de la clinique, un traitement par CSM préventif semble en effet peu envisageable. Ainsi, dans l'objectif de mener une recherche expérimentale à visée transrationnelle, nous avons décidé d'évaluer l'effet des CSM sur une douleur pouvant être considérée comme chronique.

Pour les deux temps d'injection des CSM sélectionnés, nous avons obtenu une réversion de l'allodynie mécanique une semaine après le traitement.

Perspectives expérimentales de cette partie 1.2 :

Les résultats de cette thèse suscitent de nouvelles questions scientifiques. Sans lister les perspectives multiples de ce travail autour du potentiel antinociceptif des CSM, deux types d'expérimentations pourraient être directement envisagés. Ces expérimentations permettraient d'aller plus loin dans l'évaluation de la pertinence de l'utilisation d'une telle stratégie thérapeutique et dans la connaissance des paramètres importants à considérer au moment de l'appliquer.

Tout d'abord, afin de mieux appréhender l'effet antinociceptif des CSM, il serait intéressant d'évaluer la durée de cet effet, et, ceci notamment pour différentes quantités de cellules injectées. Dans le cadre de cette étude, nous n'avons pas été en mesure d'étudier un effet de ces CSM à plus long terme après leur injection pour des raisons d'ordre technique et éthique liées à l'utilisation des électrodes. Un moyen de remédier à ce problème serait d'utiliser un dispositif de télémétrie qui permettrait d'enregistrer à distance les contractions abdominales des animaux, et, donc, de s'affranchir du problème posé par les électrodes.

De plus, il serait intéressant d'évaluer l'effet antinociceptif des CSM pour des temps plus tardifs après irradiation. En effet, bien que les courbes de RVM obtenues suite à des DCR soient identiques aux temps testés, la physiopathologie de l'hypersensibilité viscérale (au moins au niveau périphérique) évolue au cours du temps. Des données du laboratoire démontrent notamment au niveau du côlon, une évolution des phénomènes inflammatoires et neuroplastiques après irradiation. Il semble donc important d'évaluer le potentiel antinociceptif des CSM injectées pour des temps plus tardifs après irradiation, par exemple à 8 semaines.

Dans cette deuxième partie, les résultats obtenus lors des études de la douleur viscérale radio-induite et de sa physiopathologie, menées au niveau du côlon, sont replacés dans le contexte général de la littérature.

2 LES CARACTÉRISTIQUES DE LA DOULEUR VISCÉRALE RADIO-INDUITE ET DE SA PHYSIOPATHOLOGIE

Nous avons procédé, pour la première fois, à l'étude expérimentale de la douleur viscérale suite à une irradiation de la zone pelvienne chez le rat. Dans un premier temps, afin de valider la pertinence de l'utilisation du modèle d'ulcération colorectale radio-induite (27 Gy) en tant que modèle de douleur viscérale chronique, nous avons mené une étude cinétique 2, 4 et 8 semaines après irradiation, et démontré:

- que les profils de courbes de RVM en réponse à des DCR étaient similaires aux différents temps testés, et
- le maintien d'une activation neuronale, au niveau spinal, par le biais d'une étude immuno-histochimique. En effet, le maintien dans le temps d'une hyperexcitabilité neuronale (sensibilisation centrale) est considéré comme un marqueur de neuroplasticité centrale pouvant attester d'un caractère persistant de la douleur (Coffin et al., 2004; Latremoliere and Woolf, 2009).

La sous-partie qui suit donne des éléments qui pourraient permettre d'expliquer les profils de courbes obtenues en test de RVM, dans notre modèle.

2.1 Des hypothèses pour expliquer l'hypo-réponse obtenue lors du test au barostat

Dans ce travail de recherche, nous avons observé chez les animaux irradiés une allodynie, qui atteste d'une hypersensibilité viscérale à la DCR. Puis, pour l'application de pressions nociceptives, 45 et 60 mmHg, nous avons obtenu une hyposensibilité chez les animaux irradiés en comparaison avec les réponses obtenues pour des animaux contrôles. La compliance entre les animaux témoins et irradiés ne diffère pas dans ces expériences.

Dans la littérature, à notre connaissance, ce type de réponse n'a jamais été décrit. Deux types de réponse sont généralement observés dans les modèles de rongeurs: (i) une hypersensibilité, c'est le cas le plus courant (cf. chapitre I partie 5) ou (ii) une hyposensibilité, très rarement, comme dans l'étude de Wang *et al.*, par exemple lors d'une phase inflammatoire intestinale sévère (Yang et al., 2009).

Nous ne nous sommes pas intéressés, d'un point de vue expérimental, aux causes de l'apparition de cette hypo-réponse. Cependant, les courbes de RVM en réponse à des DCR permettent d'évaluer l'état du système nociceptif des animaux. Ainsi, plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer la survenue de cette hypo-réponse obtenue au barostat dans nos expérimentations.

L'hypothèse que nous émettons est que cette hypo-réponse pourrait notamment être le résultat d'un processus de désensibilisation des fibres nerveuses, au cours du passage des animaux au barostat et ce, suite à l'application répétées et/ou croissantes de stimulations mécaniques du côlon. Une désensibilisation des fibres nerveuses (i) innervant le côlon et/ou (ii) du système nerveux central pourrait alors être envisagée. Ces deux hypothèses (i) et (ii) (non exhaustives) sont présentées de manière plus détaillée dans les deux sous-parties suivantes.

2.1.1 L'hypothèse d'une désensibilisation des fibres sensorielles afférentes au côlon

La première hypothèse que nous émettons est celle de la désensibilisation partielle des fibres nerveuses afférentes au côlon au cours de l'expérimentation.

2.1.1.1 Quel processus biologique permettrait d'expliquer l'obtention d'une hypersensibilité suivie d'une hypo-réponse, dans notre modèle d'étude ?

Un tel phénomène, observé dans notre modèle d'étude, pourrait résulter notamment du contexte inflammatoire radio-induit périphérique, et, de sa modulation potentielle, lors du passage des animaux au barostat (figure 32).

Nous nous trouvons dans un contexte dans lequel les fibres nerveuses coliques sont déjà hyper-sensibilisées, et, ceci, en raison notamment de l'existence d'un processus inflammatoire inné et adaptatif radio-induit, décrit comme allant de moyen à sévère, qui persiste depuis plusieurs semaines (Bessout et al., 2013) (données internes du laboratoire). Un tel contexte inflammatoire peut déjà expliquer l'allodynie mécanique radio-induite observée. De plus, lors du passage au barostat, la stimulation des fibres nerveuses entraîne la libération de substances biologiques susceptibles d'activer ces cellules immunitaires. L'activation ou la « sur-activation » des différents types de cellules immunitaires en présence, au cours de

l'application des DCR, pourrait favoriser la libération de divers types de molécules biologiques par ces cellules. Ainsi, après l'hypersensibilité observée (allodynie), de telles molécules libérées, pourraient agir sur les fibres nerveuses coliques, et favoriser leur désensibilisation, au moins partiellement. L'hypo-réponse observée chez les animaux irradiés, en comparaison avec la réponse obtenue pour les animaux contrôles, pour les DCR de 45 et 60 mmHg pourrait ainsi s'expliquer.

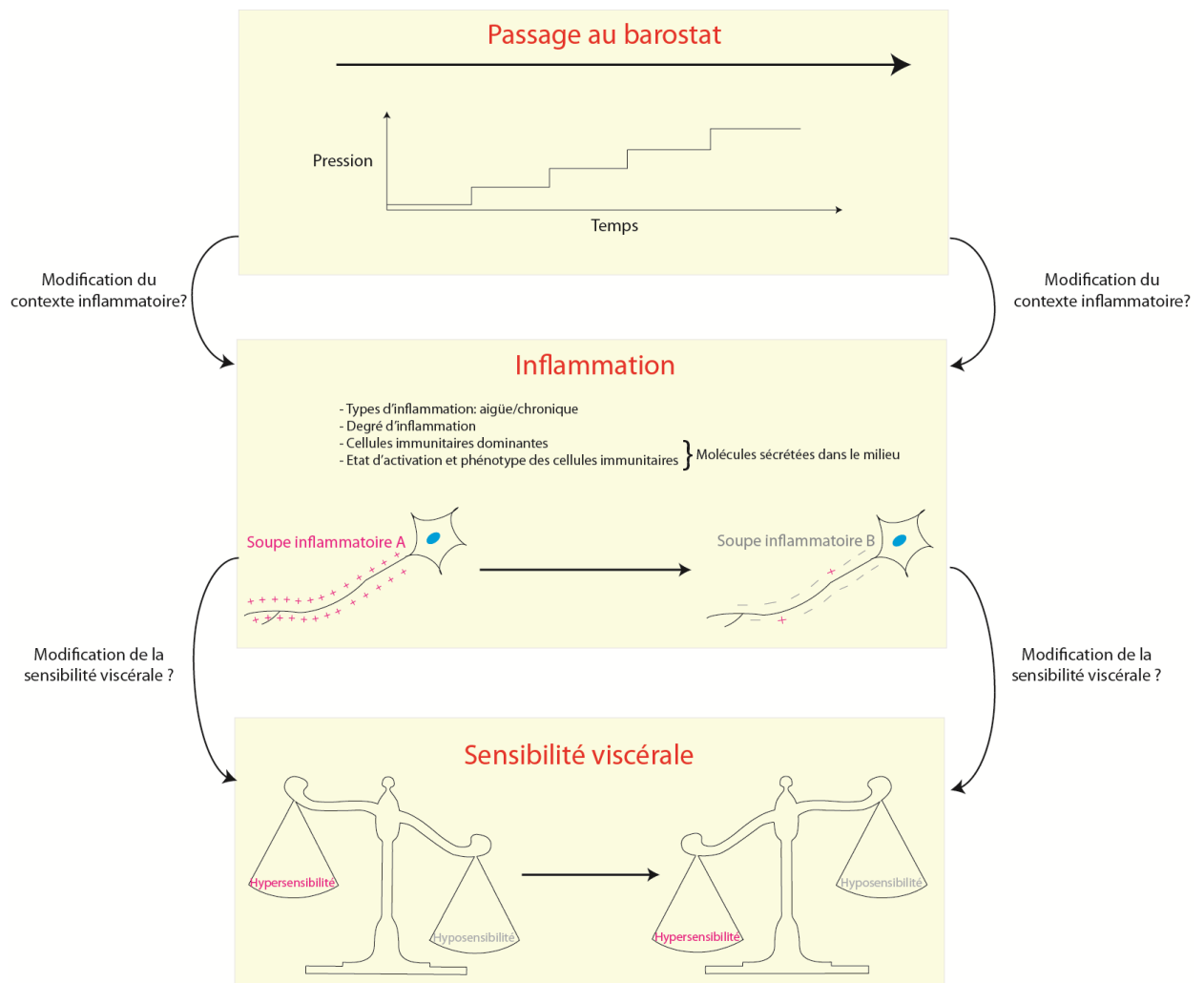


Figure 32 : Hypothèse pour expliquer les profils de courbes de RVM obtenus chez les animaux irradiés qui sont soumis à l'application de DCR au barostat : la modification de la soupe inflammatoire pourrait favoriser la désensibilisation des fibres nerveuses en périphérie. Au cours du passage au barostat la soupe inflammatoire est modifiée (soupe inflammatoire A qui devient progressivement la soupe inflammatoire B). Une augmentation de certains médiateurs biologiques, une modification du type de médiateurs ou du ratio d'un type de médiateurs par rapport à un autre, dans la soupe inflammatoire, pourrait être susceptible de modifier l'excitabilité des fibres nerveuses en périphérie; et finalement, traduire les réponses de RVM observées (cf. b de cette sous-partie).

2.1.1.2 Comment l'inflammation ou les médiateurs de l'inflammation pourraient désensibiliser les fibres nerveuses en périphérie ?

Plusieurs études démontrent que la perception de la douleur viscérale dépend : (i) de la nature de l'infiltrat inflammatoire, (ii) de la physiologie ou du phénotype des cellules inflammatoires en présence, (iii) du type de médiateurs inflammatoires libérés, (iv) du degré de sévérité de l'inflammation, et (v) de son caractère aiguë ou persistant.

Ceci est explicité en suivant de manière non exhaustive par trois cas de figure.

Cas de figure numéro 1 : Une sur-stimulation des fibres nerveuses par un médiateur biologique pourrait participer à la désensibilisation des fibres nerveuses en périphérie.

Park *et al.*, démontrent par exemple qu'en fonction de l'importance de l'hyperplasie mastocytaire au niveau intestinal, chez des patients atteints d'IBS, une hypersensibilité ou une hyposensibilité à la DCR peut être obtenue. Ils émettent l'hypothèse qu'une désensibilisation des fibres nerveuses intestinales aux médiateurs mastocytaires pourrait se produire quand l'hyperplasie des MC est trop importante (Park *et al.*, 2006).

Dans notre modèle, nous avons démontré une hyperplasie mastocytaire qui se propage progressivement à l'ensemble des compartiments coliques après irradiation. Les médiateurs de ces MC, à proximité des fibres nerveuses, doivent déjà sensibiliser les fibres nerveuses coliques dans un état basal (cf. résultats du chapitre III). Lors du passage au barostat, une libération accrue de ces médiateurs pourrait finir par désensibiliser les fibres nerveuses périphériques.

Cas de figure numéro 2 : Des médiateurs biologiques de l'inflammation innée pourraient favoriser la désensibilisation des fibres nerveuses en périphérie.

Des études démontrent que des différences de seuil d'apparition de la douleur pour des patients atteints de différentes pathologies intestinales, sont corrélées au type de protéines sériques présentes au sein de leur lumière intestinale. Plus particulièrement, le ratio d'un type de protéines sériques par rapport à l'autre est corrélé au type de réponse obtenue (Annaházi *et al.*, 2009). D'autres études expérimentales démontrent cette même corrélation (Annaházi *et al.*, 2009; Augé *et al.*, 2009). Les différences de réponses obtenues, i.e. l'obtention d'une hypersensibilité ou d'une hyposensibilité, dépendraient ainsi du type de récepteurs que la sérine protéase majoritaire activerait préférentiellement. Par exemple, la tryptase, libérée par

les MC, active préférentiellement PAR2, provoquant de l'hypersensibilité, et, la Cathepsine G, libérée notamment par les neutrophiles, en activant plutôt PAR4 entraîne de l'hyposensibilité (Annaházi et al., 2009; Augé et al., 2009; Cenac et al., 2007). Le type de cellule immunitaire dominant, et certainement leur état d'activation et/ou leur physiologie, semblent ainsi être impliqués dans le type de sensation douloureuse ressentie.

A ce titre, dans notre modèle d'étude, une infiltration importante de cellules de l'immunité innée (neutrophiles, macrophages et mastocytes), au niveau de la LP et de la sous muqueuse qui persiste pendant des semaines après irradiation, a été caractérisée (Bessout et al., 2013). Parmi l'ensemble des cellules immunitaires décrites après irradiation, les neutrophiles représentent la population majoritaire des cellules immunitaires. Leur stimulation, et, *in fine*, leur libération accrue, par exemple de cathepsine G, au cours du passage des animaux au barostat pourrait ainsi favoriser la mise en place de processus antinociceptifs, contrebalançant potentiellement les processus qui eux favorisent l'excitabilité des fibres nerveuses.

Cas de figure numéro 3: Des médiateurs biologiques de l'immunité adaptative pourraient favoriser la désensibilisation des fibres nerveuses en périphérie.

L'immunité adaptative peut aussi jouer un rôle dans les processus de nociception viscérale. En effet, les lymphocytes T, notamment activés, peuvent libérer des opioïdes au niveau intestinal, et participer ainsi à la mise en place de processus antinociceptifs (Boué et al., 2014; Verma-Gandhu et al., 2006, 2007).

Dans notre modèle d'étude, une augmentation des lymphocytes T et B est observée dès 7 jours après irradiation et au moins jusqu'à 4 semaines après. De plus, ces lymphocytes T observés 4 semaines après irradiation sont dans un état activé (Bessout et al., 2013). Ainsi, la libération de telles molécules par les cellules de l'immunité adaptative pourrait participer à la réponse obtenue au barostat au cours de l'application des DCR.

Le processus inflammatoire radio-induit particulier décrit dans notre modèle d'étude pourrait expliquer la réponse inédite que nous obtenons au cours de l'expérimentation au barostat : une allodynie, puis une hyposensibilité pour l'application de pressions nociceptives, (caractérisées par rapport à la réponse d'animaux témoins). Cette réponse pourrait être liée à

une modification de la soupe inflammatoire, dans le milieu environnant les fibres nerveuses en périphérie, au cours de l'expérimentation au barostat.

2.1.2 L'hypothèse d'une désensibilisation des fibres nerveuses au niveau du système nerveux central

Outre ces phénomènes périphériques, la mise en place, chez nos animaux irradiés, de contrôles inhibiteurs descendants au cours de l'expérimentation au barostat pourrait expliquer le phénomène d'hypo-réponse que nous observons.

Tout d'abord, des processus inflammatoires périphériques sont susceptibles d'induire une neuroplasticité au niveau des centres supérieurs, et, d'influer ainsi dans le fonctionnement des systèmes inhibiteurs descendants (Mayer et al., 2005). Or dans notre contexte inflammatoire radio-induit chronique, une telle plasticité et de tels phénomènes sont envisageables.

De plus, Tsuruoka *et al.*, démontre une inhibition de la RVM en réponse à des DCR nociceptives chez le rat lorsque les neurones du locus coeruleus (LC) sont stimulés électriquement (Tsuruoka et al., 2005).

Ainsi, un état d'excitabilité anormal d'une zone particulière des centres supérieurs, comme le LC, lié par exemple au processus inflammatoire accru en périphérie dans notre modèle, pourrait favoriser l'inhibition de la réponse de RVM obtenue chez nos animaux irradiés, par rapport à celle obtenue chez des animaux contrôles, pour l'application de DCR nociceptives.

Dans le cadre de l'étude physiopathologique de l'hypersensibilité viscérale radio-induite, traduite par l'allodynie mécanique, nous nous sommes focalisés sur les mécanismes périphériques. Ces aspects sont explicités dans la fin de cette partie 2.

2.2 Les mécanismes périphériques de l'hypersensibilité viscérale radio-induite

2.2.1 Le rôle des MC

Dans les pathologies intestinales douloureuses et dans les modèles d'étude mimant de tels syndromes, l'implication des MC dans les mécanismes périphériques de l'hypersensibilité viscérale est clairement établie (Barreau et al., 2004a; Gué et al., 1997; Klooker et al., 2010; Marshall and Irvine, 1998). De plus, dans des modèles d'étude d'irradiation colorectale à la

dose de 27 Gy, une augmentation du nombre de MC a été mise en évidence dans 2 études. En effet, Blirando *et al.*, ont observé en immuno-histologie ce phénomène dans la séreuse et le mésentère 2 semaines après irradiation, chez la souris (Blirando et al., 2011). D'autre part, une augmentation du nombre de MC a également été observée en cytométrie en flux dans la muqueuse colique 3 semaines après irradiation, chez le rat (Bessout et al., 2013).

Nous avons donc souhaité évaluer le rôle de ce type cellulaire dans la physiopathologie de l'hypersensibilité viscérale radio-induite.

Dans notre modèle, nous avons décrit précisément une hyperplasie mastocytaire qui affecte progressivement l'ensemble des compartiments coliques après irradiation. Nous retrouvons aussi une hyperplasie de ces cellules, dans des résections rectales de patients soumis à une radiothérapie pelvienne, comme ce qui est observé dans l'étude de Blirando *et al.*, (Blirando et al., 2011).

Cependant chez les patients atteints d'IBS, c'est l'augmentation des interactions neuro-immunitaires entre les MC et les fibres nerveuses, et non l'hyperplasie des MC, qui est corrélée à la fréquence et à la sévérité de la douleur de ces patients (Barbara et al., 2004; Di Nardo et al., 2014).

Nous avons donc évalué ce paramètre après exposition du tractus digestif aux rayonnements ionisants. Dans un premier temps, nous avons démontré, à partir des mêmes résections de patients traités par une radiothérapie pelvienne que celles utilisées dans l'étude de Blirando *et al.*, que la majorité des MC tryptase⁺ présents au niveau de la LP des rectums sont en interaction étroite avec les fibres nerveuses, quelque soit le degré d'atteinte tissulaire des organes. Au niveau de la sous-muqueuse, une augmentation significative de ces interactions est mesurée pour les rectums histologiquement altérés par rapport à ceux qui ne le sont pas. De même, au niveau des rats exposés à une irradiation colorectale, les interactions entre les MC tryptase⁺ et les fibres nerveuses, au niveau de la sous-muqueuse colique sont augmentées significativement par rapport à celles quantifiées chez les rats contrôles. Nous avons donc bien obtenu dans notre modèle une corrélation entre l'augmentation de ce type d'interaction et l'altération de la sensibilité viscérale, comme cela est également décrit dans des modèles d'hypersensibilité viscérale d'IBS chez le rongeur (Barreau et al., 2008).

De plus, dans notre étude, nous avons aussi caractérisé après irradiation une augmentation de la densité de surface du marquage des MC par la tryptase au niveau de la sous-muqueuse colique. Cette augmentation est corrélée à une augmentation de la quantité de tryptase dans les fèces des rats. Un état d'activation accrue des MC chez les animaux irradiés peut donc être supposé.

De plus, l'augmentation de la tryptase libérée, associée à une hypersensibilité (pour de faibles stimuli de pressions imposées), tel que nous l'observons dans notre modèle, paraît être en accord avec la littérature. En effet, une augmentation des sérines protéase, et plus particulièrement de la tryptase, dans les fèces de patients est généralement corrélée à l'hypersensibilité, observée chez les patients IBS-D (Annaházi et al., 2009).

L'ensemble de ces éléments suggère que les MC pourraient jouer un rôle dans la physiopathologie de l'hypersensibilité viscérale radio-induite.

Afin de démontrer une implication fonctionnelle des MC dans les mécanismes périphériques sous-tendant l'hypersensibilité viscérale radio-induite, nous avons souhaité évaluer l'effet de leur stabilisation sur l'hypersensibilité viscérale observée au moment de la DCR.

Plusieurs molécules sont décrites comme des stabilisateurs mastocytaires, par exemple le kétotifène, le doxantrazole et le cromolyn. Ces molécules, utilisées notamment dans le cas du traitement de l'asthme, joueraient un rôle sur les canaux calciques et stabiliseraient les membranes de ces cellules, empêchant ainsi les phénomènes de dégranulation mastocytaire.

Nous avons décidé d'effectuer un traitement au kétotifène, par voie orale, à partir de la quatrième semaine après irradiation et chez des animaux témoins. Après traitement, nous avons obtenu une réversion de l'allodynie mécanique chez nos animaux irradiés, sans que le profil de RVM des animaux témoins ne soit modifié. De plus, le kétotifène entraîne une diminution de la quantité de tryptase relarguée dans les fèces de nos rats irradiés (mais pas de nos animaux témoins), validant ainsi l'efficacité du traitement.

Ces résultats démontrent une implication des MC dans la physiopathologie de l'hypersensibilité viscérale radio-induite.

Toutefois, le kétotifen est également décrit comme un antagoniste des récepteurs H1 à l'histamine. Ce récepteur est présent à la surface de divers types cellulaires de l'intestin. Une

action du kétotifène dans la modulation d'autres processus radio-induits dans cette expérimentation ne peut donc être exclue.

2.2.2 Comment, dans notre modèle, la sensibilisation périphérique via les mastocytes pourrait-elle s'expliquer ?

2.2.2.1 Une action multiple *via* les médiateurs mastocytaires et plus particulièrement la tryptase

Nous avons observé après irradiation une augmentation de l'immuno-marquage des MC par la tryptase et de la quantité de tryptase dans les fèces de nos rats irradiés. De plus, Wang *et al.*, démontrent dans un modèle de rongeur qu'une irradiation intestinale entraîne une augmentation de l'expression et de l'activation de PAR2 (Wang et al., 2003). Or, dans la littérature, des études démontrent la capacité de la tryptase, ou de ses analogues, à cliver et activer le PAR2, et, à jouer ainsi un rôle dans les phénomènes d'hypersensibilité viscérale, ceci de diverses manières (Vergnolle, 2000; Vergnolle et al., 2001).

Dans cette sous-partie, le rôle de la tryptase, par l'activation de PAR2 (non démontré dans notre étude), au niveau des fibres nerveuses et d'autres types cellulaires, dans les mécanismes de la sensibilisation périphérique est discuté en premier lieu. L'implication d'autres molécules biologiques dans ces mécanismes est aussi évoquée.

a) Une action via les fibres nerveuses

Dans notre modèle, la communication entre les fibres nerveuses et les MC tryptase+, ainsi que la libération de tryptase sont exacerbées.

Dans ce contexte, la sécrétion de tryptase par les MC situés à proximité des fibres nerveuses, pourrait ainsi participer aux processus d'hypersensibilité viscérale *via* l'activation de PAR2, et, ceci en favorisant directement l'excitabilité neuronale (Barbara et al., 2007; Cenac et al., 2007) et/ou en participant aux processus de neuro-inflammation entretenu (Coelho et al., 2002; Shanahan et al., 1985; Steinhoff et al., 2000; Van der Kleij et al., 2003).

Cependant, le rôle d'autres molécules activant les fibres nerveuses dans notre modèle d'étude ne peut être exclu. En effet, d'une part, Wang *et al.*, décrivent l'implication d'autres protéinases pancréatiques, et notamment la trypsine, dans les atteintes intestinales radio-induites par leur capacité notamment à cliver PAR2 (Wang et al., 2003). L'implication de la

trypsine activant PAR2 dans les processus de sensibilisation périphérique dans notre modèle peut alors être envisagée. De plus, d'autres molécules sécrétées notamment par les MC, comme l'histamine et la sérotonine, peuvent également voir leur quantité augmentée après irradiation au niveau intestinal (Blirando et al., 2011; Ropenga et al., 2004). Or, ces molécules biologiques sont décrites comme étant impliquées dans l'excitabilité neuronale et dans l'hypersensibilité viscérale (Bueno et al., 1997; Coelho et al., 1998; Frieling et al., 1995; Jiang et al., 2000). Bien que nous n'ayons pas étudié leur rôle dans les mécanismes périphériques sous-tendant l'hypersensibilité viscérale radio-induite, ces facteurs sont certainement impliqués dans ce type de mécanisme.

b) Une activation des CAN ?

Une population spécifique de neurones entériques pourrait également jouer un rôle dans la physiopathologie de la douleur viscérale radio-induite, notamment via leur activation par la tryptase.

Suckow et al., décrivent en effet une population spécifique de neurones entériques projetant vers le SNC, qui expriment notamment le PAR2 et la nNOS. De tels neurones seraient directement impliqués dans les processus d'hypersensibilité viscérale chronique (Suckow and Caudle, 2008, 2009; Suckow et al., 2012).

Or, dans notre modèle, nous avons démontré une implication fonctionnelle du NO^{*} dans l'hypersensibilité viscérale radio-induite. Bien que nous n'ayons pas démontré l'origine de ce NO^{*} impliqué, nous suggérons qu'elle est au moins en partie neuronale. En effet, nous démontrons après irradiation une augmentation au niveau des plexus myentériques du pourcentage des neurones exprimant la nNOS (cf. chapitre IV).

Dans ce contexte, l'hypothèse que nous émettons est la suivante : les neurones nitrergiques augmentés après irradiation pourraient être des CAN. Ils participeraient aux mécanismes de l'hypersensibilité viscérale radio-induite persistante ; ceci, notamment via leur activation par la tryptase augmentée dans notre modèle après irradiation.

Perspectives :

Dans notre modèle d'étude, nous pourrions vérifier une implication fonctionnelle au barostat du nNO^{*} dans la physiopathologie de l'hypersensibilité viscérale radio-induite, en utilisation un antagoniste spécifique de la nNOS. Ensuite, nous souhaiterions évaluer

l'expression de PAR2 par les neurones nitrergiques, augmentés après irradiation (au niveau des plexus myentériques mais aussi sous-muqueux). Ces expériences permettraient de tester notre hypothèse, et, dans le cas de sa vérification expérimentale, d'envisager PAR2 comme cible thérapeutique intéressante pour soulager les douleurs viscérales radio-induites persistantes.

c) Hypothèses d'une action via l'altération des fonctions intestinales

Les altérations fonctionnelles intestinales, comme par exemple une altération de la perméabilité (Ait-Belgnaoui et al., 2005; Barreau et al., 2004a; Coelho et al., 2002) ou de la motilité (Annese et al., 1997; Chey et al., 2001; Clemens et al., 2003; Kellow and Phillips, 1987; Sarna, 2007), sont impliquées ou corrélées à l'altération de la sensibilité viscérale à l'origine de sensations douloureuses.

Or, l'implication des médiateurs mastocytaires dans ces altérations fonctionnelles intestinales est décrite.

En effet, à titre d'exemple, l'activation par la tryptase de PAR2, exprimé par des colonocytes, altère la perméabilité intestinale (Jacob et al., 2005). Dans ce contexte Coelho *et al.*, suggère d'ailleurs que l'altération de la perméabilité intestinale *via* l'activation de PAR2, pourrait être étiologiquement responsable de l'hypersensibilité viscérale chez un rongeur (Coelho et al., 2002).

De plus, Covera *et al.*, ont également démontré que l'activation de PAR2 à la surface des myocytes coliques joue un rôle dans les altérations de la motilité intestinale (Corvera et al., 1997).

Ainsi, l'activation de PAR2, par la tryptase pourrait aussi participer à la modification de la sensibilité viscérale dans notre modèle, en altérant les fonctions intestinales.

2.2.2.2 Une participation aux mécanismes de neuroplasticité périphérique?

Indépendamment des processus précédemment décrits, les MC peuvent aussi être impliqués dans la physiopathologie de l'hypersensibilité viscérale radio-induite *via* une libération de NGF, facteur décrit comme favorisant la mise en place de phénomènes neuroplastiques.

En effet, les MC sont aussi capables de libérer du NGF. Or, le NGF favorise les processus d'hyperplasie nerveuse et de synaptogénèse (Burgos et al., 1995). Il est également impliqué dans l'expression des neuromédiateurs SP et CGRP au niveau des neurones sensoriels (Lindsay and Harmar, 1989). Or, de telles modifications neuroplastiques au niveau périphériques sont impliquées dans les mécanismes de sensibilisation sous-tendant les processus d'hypersensibilité (Bueno and Fioramonti, 2002; Demir et al., 2013; Petersen-Felix and Curatolo, 2002). Dans la littérature, un lien a notamment été clairement établie entre la plasticité synaptique et l'hypersensibilité viscérale, dans des conditions d'inflammation chronique du côlon (Yang et al., 2009). De plus, dans des conditions non inflammatoires, le rôle du NGF, *via* sa libération par les MC, augmentés, est d'ailleurs fortement suggéré dans la mise en place de modifications neuroplastiques et de l'hypersensibilité viscérale (Barreau et al., 2008).

Dans notre modèle, nous avons démontré une augmentation de l'expression des mRNA du NGF au niveau de la muqueuse et de la sous-muqueuse colique après irradiation. Cette augmentation est associée à la présence de phénomènes neuroplastiques dans notre modèle d'étude 4 semaines après irradiation. En effet, une hyperplasie nerveuse, une modification de la neurochimie des fibres nerveuses (plus nombreuses à exprimer la SP et le CGRP) ainsi que, l'apparition d'une synaptogénèse ont été caractérisées au niveau du côlon irradié.

Nous pouvons suggérer dans notre modèle que, les MC augmentés, et, à proximité des fibres nerveuses pourraient, en libérant du NGF, favoriser la mise en place des modifications neuroplastiques périphériques susceptibles de favoriser l'hypersensibilité viscérale.

Cependant, l'augmentation de NGF chez nos animaux irradiés a certainement plusieurs origines. En effet, dans notre modèle d'étude, Bessout *et al.*, ont mis en évidence une inflammation persistante après irradiation (Bessout et al., 2013). Dans un tel contexte inflammatoire, une augmentation de l'expression du NGF est souvent attribuée aux cellules immunitaires mais aussi aux cellules épithéliales et aux fibres nerveuses intestinales (Di Mola et al., 2000; Stanzel et al., 2008). De plus, dans un environnement inflammatoire, d'autres processus peuvent certainement favoriser la mise en place de telles modifications neuroplastiques (Bueno and Fioramonti, 2002; Demir et al., 2013; Strobach et al., 1990; Yang et al., 2009).

Par conséquent, l'implication des MC dans les phénomènes neuroplastiques que nous avons caractérisés dans notre modèle, *via* la libération de NGF, si elle est avérée, n'est certainement que partielle.

2.2.3 Récapitulatif sur la manière dont les MC pourraient être impliqués dans l'hypersensibilité viscérale radio-induite

La stabilisation des MC favorise donc la diminution de l'hypersensibilité viscérale radio-induite, par des mécanismes qui pourraient impliquer :

- une moindre dégranulation ou libération de leurs médiateurs,
- une modulation de leur proximité et de leur communication avec les fibres nerveuses,
- une moindre altération des fonctions coliques, qui sont corrélées aux mécanismes de l'hypersensibilité viscérale,
- une diminution des phénomènes neuroplastiques impliqués dans la sensibilisation périphérique,
- une modification de leur amplification et de leur état d'activation. En effet les MC sont capables, à eux seuls, *via* une sécrétion autocrine de NGF, de tels processus (Kleij and Bienenstock, 2005) (Aloe and Levi-Montalcini, 1977).

La question qui pourrait se poser à ce stade est donc la suivante :

3 POUR QUELLES RAISONS LES CSM SERAIENT-ELLES PLUS ADAPTÉES À MODULER L'HYPERSENSIBILITÉ VISCÉRALE PERSISTANTE?

3.1 La comparaison des stratégies thérapeutiques testées

Nous avons démontré qu'une seule injection de CSM par voie i.v., au même titre qu'un traitement journalier au kétotifène, permettait de reverser l'allodynie mécanique radio-induite, et ce, au bout d'une semaine.

Cependant, bien que le kétotifène, en stabilisant les MC (cf. chapitre III), agisse sur diverses altérations induites par l'irradiation au niveau de l'intestin, favorisant ainsi la modulation de l'hypersensibilité viscérale, son action est surtout symptomatique.

Dans notre étude, nous avons notamment démontré que les deux traitements n'étaient pas équivalents, au moins du point de vue de la réparation ou régénération tissulaire après irradiation (cf. chapitre III). En effet, les MC sont décrits comme ayant un impact néfaste dans les processus de cicatrisation pathologique intestinale radio-induite, au moins à long terme (Blirando et al., 2011; Zheng et al., 2000). Dans notre modèle, la stabilisation des MC, par le kétotifène, ne permet cependant pas d'obtenir d'amélioration du score lésionnel chez nos animaux irradiés ; et ceci sur des lésions radio-induites intestinales déjà établies depuis 4 semaines. En revanche, un bénéfice des CSM sur ce score lésionnel a été observé dans nos conditions expérimentales, comme dans d'autres travaux du laboratoire (Sémont et al., 2013), 1 semaine après l'injection des CSM.

Or, au-delà d'être très invalidantes pour les « survivants au cancer », les altérations biologiques et fonctionnelles multiples radio-induites observées après radiothérapie favorisent le maintien de douleurs persistantes.

Dans nos conditions expérimentales, le kétotifène ne parait pas représenter une stratégie thérapeutique, à visée curative, qui permettrait de s'attaquer directement aux causes multiples de ces altérations qui favorisent le maintien de la douleur.

3.2 Les diverses raisons validant l'utilisation des CSM

A l'inverse, aux vues de nos résultats et de la littérature, une stratégie thérapeutique utilisant les CSM, semble permettre :

- d'exercer une action purement antinociceptive,
- de s'attaquer aux différentes altérations biologiques radio-induites intestinales. Par ce biais, elles favoriseraient la réparation de l'organe et de ses fonctions. Elles pourraient donc, par cette action curative, agir sur les divers symptômes de la « pelvic radiation disease » et notamment sur la douleur viscérale radio-induite.

3.2.1 Une action qui peut être décrite comme « directement » antinociceptive

3.2.1.1 Les mécanismes périphériques

La très grande majorité des études expérimentales menées sur les mécanismes d'action des CSM dans la modulation de l'hypersensibilité ont été réalisées au niveau du SNC.

Notre étude est à notre connaissance, la première à s'être intéressée à la modulation de la douleur viscérale par les CSM. Elle est aussi une des rares à s'être focalisée sur la modulation, par les CSM, des mécanismes périphériques sous tendant une telle hypersensibilité.

Les études que nous avons menées sur la physiopathologie de l'hypersensibilité viscérale radio-induite nous ont permis de mettre en avant le rôle des MC dans les processus de sensibilisation périphérique radio-induit. Ces résultats mettent en avant l'intérêt de stabiliser les MC dans le contexte radio-induit de l'hypersensibilité viscérale. Nous avons donc cherché à savoir si après irradiation, les CSM étaient capables d'exercer leur pouvoir antinociceptif *via* une action sur les MC.

Tout d'abord, après injection de CSM chez des animaux irradiés, nous avons démontré une modification de l'état physiologique de ces cellules, alors que leur nombre est inchangé. En effet, nous avons observé (i) une diminution de la surface de marquage des granules des MC par la tryptase et (ii) une diminution de la quantité de tryptase dans les fèces. Les CSM sont donc capables de diminuer la quantité de tryptase synthétisée par les MC et/ou de favoriser un état stabilisé de ces cellules. Brown *et al.*, ont par ailleurs montré *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de choc anaphylactique chez le rongeur cette aptitude des CSM à stabiliser les MC (Brown *et al.*, 2011).

De plus, nous démontrons que le traitement par des CSM permet la diminution du pourcentage des MC situés à proximité des fibres nerveuses. Ce résultat suggère que les CSM sont aussi capables de moduler la communication neuro-immunitaire pathologique entre les MC et les fibres nerveuses, paramètre directement corrélé aux états douloureux des patients atteints d'IBS (Barbara *et al.*, 2004; Di Nardo *et al.*, 2014).

Ainsi, les CSM par un effet stabilisateur sur les MC pourraient jouer un rôle équivalent à celui du traitement par le kétotifène.

Cependant, leur potentiel antalgique est très certainement lié à d'autres mécanismes prenant place au niveau périphérique et central. Au niveau périphérique, Guo *et al.*,

démontrent par exemple que ces cellules peuvent exercer un effet antinociceptif par la modulation du système opioïdérique (Guo et al., 2011).

3.2.1.2 Les mécanismes centraux

Dans notre modèle, nous n'avons pas étudié les mécanismes centraux par lesquels les CSM pourraient moduler l'hypersensibilité viscérale radio-induite. Cependant, après irradiation, il est intéressant de rappeler que nous avons caractérisé une sur-activation des neurones spinaux de la corne dorsale, associée à l'hypersensibilité centrale. Dans notre modèle, ce phénomène d'hyperexcitabilité neuronale, au niveau du SNC, pourrait traduire une transmission nerveuse accrue vers les centres nerveux supérieurs. Par ailleurs, Mauri *et al.*, démontrent que des neurones mis en culture avec des CSM acquièrent un phénotype et des propriétés électriques de type gabaergique (Mauri et al., 2012). Ainsi, l'ensemble de ces données nous permettent d'envisager l'hypothèse qui suit : les CSM injectées pourraient exercer un effet antinociceptif en agissant directement au niveau des neurones du SNC, et ce, en contrebalançant la transmission nerveuse excitatrice exacerbée après irradiation.

En outre, d'autres actions antinociceptives des CSM exercées au niveau du SNC ne sont pas à exclure dans notre modèle d'étude. Parmi de telles actions, nous pouvons citer la capacité des CSM injectées par voie i.v. à migrer vers le SNC pour y moduler une inflammation pathologique, favorisant ainsi la diminution de l'hypersensibilité. De telles propriétés des CSM sont particulièrement avantageuses dans le contexte des douleurs chroniques, où une inflammation du SNC favorise leur maintien (Siniscalco et al., 2011). De plus, les CSM sont aussi susceptibles d'exercer un pouvoir antalgique par la modulation d'autres processus physiologiques au niveau du SNC, notamment en modulant l'action du système opioïdérique (Guo et al., 2011).

3.2.2 Les bénéfices multiples engendrés par l'action des CSM au niveau du côlon irradié favorisent probablement la modulation de l'hypersensibilité viscérale radio-induite.

Les CSM, en agissant localement au niveau du côlon irradié, permettent la diminution du degré de sévérité des lésions radio-induites et favorisent le retour vers un fonctionnement plus « physiologique » de l'organe. Elles limitent ainsi les processus pathologiques qui pourraient être impliqués dans la douleur viscérale radio-induite.

3.2.2.1 La perméabilité intestinale

L'altération de la perméabilité intestinale est impliquée dans l'hypersensibilité viscérale. La perméabilité dépend directement de l'intégrité de la muqueuse intestinale. Or, cette dernière est altérée après une exposition aux rayonnements ionisants. Dans ce contexte, bien que nous n'ayons que des résultats préliminaires sur le potentiel des CSM à restaurer la perméabilité intestinale, un certain nombre d'éléments suggère que les CSM favorisent la restauration de l'intégrité de la muqueuse intestinale.

Les CSM, par diverses actions biologiques, favorisent en effet la régénération de la muqueuse intestinale irradiée.

D'un point de vue structurel, la sévérité des lésions épithéliales radio-induites est diminuée après traitement par CSM (Chang et al., 2013; Sémont et al., 2006, 2010, 2013).

D'une part, un tel potentiel est lié à leur capacité à favoriser la prolifération des cellules de la cryptes, notamment des ISC intestinales, après irradiation (Chang et al., 2013; Sémont et al., 2006, 2010, 2013). De tels mécanismes de réparation ont aussi été mis en avant dans d'autres modèles expérimentaux, notamment de colite (Chen et al., 2013) ou de lésions ischémiques intestinales (Jiang et al., 2013) chez les rongeurs.

D'autre part, les CSM modulent l'inflammation radio-induite dans notre modèle de rat irradié (Bessout et al., 2013). Or, par de telles propriétés immuno-modulatrices des CSM favorisent la diminution des lésions dans des modèles murins de colite (Chen et al., 2013; González et al., 2009; Gonzalez-Rey et al., 2009; Hayashi et al., 2010; Kim et al., 2007). Ces propriétés associées à leur pouvoir pro-angiogénique et leur capacité de soutien de la régénération et de la réparation des vaisseaux sanguins, notamment dans des contextes ischémiques (Al-Khaldi et al., 2003; Hayashi et al., 2010; Zhang et al., 2014), sont des atouts majeurs permettant de favoriser les processus de ré-épithélisation par les CSM.

De plus, des études du laboratoire montrent que l'intégrité compromise du côlon, après irradiation, est certainement améliorée après injection de CSM. La restauration à la fois de la présence de protéines de jonction et potentiellement de la sécrétion de mucus par les cellules de la crypte (Sémont et al., 2013) peuvent en effet, à ce titre, être citées.

3.2.2.2 Action sur la contractibilité musculaire *via* une modulation du système nerveux

L'altération de la motricité ou de la contractibilité musculaire colique est probablement impliquée dans la survenue de douleurs dans le cas des pathologies douloureuses du tube digestif (cf. chapitre I partie 5.2).

Dans notre étude, nous avons mis en évidence la capacité des CSM à restaurer la contractibilité musculaire altérée après irradiation.

L'altération de cette fonction peut résulter d'un dysfonctionnement du système nerveux. Dans notre étude, nous avons notamment mis en évidence, après irradiation, une augmentation du contrôle inhibiteur exercé par le SNE, notamment de type nitrergique, sur la contractibilité musculaire. Les CSM sont capables de réduire le pourcentage de neurones entériques exprimant la nNOS, augmenté après irradiation dans notre modèle. Ainsi, nous suggérons que les CSM, en modulant ce nombre de neurones, augmenté après irradiation, pourraient favoriser la restauration de la fonction de contractibilité colique altérée après irradiation.

Qiu *et al.*, ont quant à eux démontré, suite à des irradiations réalisées au niveau pelvien chez le rat, que l'injection d'ADSC permet la restauration partielle des fibres caverneuses exprimant la nNOS, parallèlement au rétablissement de la fonction érectile des animaux traités (Qiu et al., 2012).

Nos résultats ainsi que ceux de Qiu *et al.*, démontrent la capacité des CSM à s'adapter au contexte pathologique dans lequel elles se trouvent (en diminuant le pourcentage des neurones nitrergiques dans notre cas et en l'augmentant dans l'étude de Qiu *et al.*), pour agir de manière appropriée, afin de rétablir les fonctions organiques altérées.

4 QUEL AVENIR POUR LES BIOTHÉRAPIES DANS LE TRAITEMENT DE LA « PELVIC RADIATION DISEASE » ?

Les douleurs, au même titre que les autres complications, qui peuvent apparaître suite à l'exposition aux rayonnements ionisants des tissus sains de la zone abdomino-pelvienne, après un traitement par radiothérapie, sont le résultat de dommages multiples et complexes, qui affectent notamment l'intestin, organe particulièrement radiosensible. Dans les cas les plus graves, pour des grades de sévérité de complications gastrointestinales évalués de 3 à 4 (cf.chapitre I tableau 2), la prise en charge médicale de ces patients est primordiale, et, n'est pas, à ce jour, satisfaisante.

Le bénéfice du traitement compassionnel des 3 patients d'Epinal ainsi que les résultats de nombreuses études expérimentales sont prometteurs, et ouvrent vers une future utilisation des CSM comme solutions thérapeutiques dans le contexte de la « pelvic radiation disease ».

Dans ce contexte, un essai thérapeutique de phase II, PRISME, fondé sur les résultats précliniques de notre laboratoire et sur l'expérience clinique du Département d'Hématologie de l'Hôpital Saint-Antoine, a été accepté en 2013. Il permettra d'évaluer l'efficacité d'injections itératives de CSM allogéniques sur la symptomatologie des complications chroniques sévères de la « pelvic radiation disease », réfractaire aux thérapies conventionnelles.

Si les résultats de cet essai clinique s'avèrent encourageant, des optimisations pourraient être envisagées.

Notamment dans le cas de patients souffrant de fistules radio-induites, des injections locales de CSM pourraient aussi être pratiquées. Le bénéfice de telles injections de cellules, intégrées ou pas dans des biomatériaux (colle de fibrine), a déjà été évalué dans la cicatrisation de fistules chez des patients atteints d'IBD (García-Olmo et al., 2005, 2009; Guadalajara et al., 2012). Au sein de notre groupe le bénéfice d'injection locale de CSM, seules ou en association avec des biomatériaux, est en cours d'étude dans le modèle d'ulcération colique radio-induite que j'ai utilisé au cours de ma thèse.

5 CONCLUSION

L'ensemble de ces travaux de recherche démontre la capacité des CSM à moduler l'hypersensibilité viscérale persistante radio-induite chez l'animal. Un tel effet pourrait résulter de leurs actions pléiotropes dans la modulation de diverses altérations intestinales radio-induites. Plus particulièrement, nous suggérons qu'elles pourraient exercer leur effet antinociceptif notamment en modulant la physiologie des MC et/ou leur sécrétion de tryptase et/ou leur communication avec les fibres nerveuses au niveau du côlon.

Ce travail apporte un éclairage nouveau sur le spectre d'action thérapeutique des CSM dans le cadre du traitement des complications gastro-intestinales radio-induites. Il apporte un argument préclinique supplémentaire en vue de la mise en place de l'essai clinique de phase II PRISME qui vise à évaluer l'alternative d'un traitement curatif par CSM pour lutter contre les symptômes chroniques sévères de la « pelvic radiation disease ».

RÉFÉRENCES

- Al-Chaer, E.D., Feng, Y., and Willis, W.D. (1998). A role for the dorsal column in nociceptive visceral input into the thalamus of primates. *J. Neurophysiol.* 79, 3143–3150.
- Al-Chaer, E.D., Kawasaki, M., and Pasricha, P.J. (2000). A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development. *Gastroenterology* 119, 1276–1285.
- Al-Chaer, E.D., and Traub, R.J. (2002). Biological basis of visceral pain: recent developments. *Pain* 96, 221–225.
- Abbott, J.D., Huang, Y., Liu, D., Hickey, R., Krause, D.S., and Giordano, F.J. (2004). Stromal cell-derived factor-1 α plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* 110, 3300–3305.
- Abraham, C., and Cho, J.H. (2009). Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 361, 2066–2078.
- Agarwal-Kozlowski, K., Lorke, D.E., Habermann, C.R., Am Esch, J.S., and Beck, H. (2009). CT-guided blocks and neuroablation of the ganglion impar (Walther) in perineal pain: anatomy, technique, safety, and efficacy. *Clin. J. Pain* 25, 570–576.
- Ait-Belgnaoui, A., Bradesi, S., Fioramonti, J., Theodorou, V., and Bueno, L. (2005). Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase. *Pain* 113, 141–147.
- Alexakis, C., Guettoufi, A., Mestries, P., Strup, C., Mathé, D., Barbaud, C., Barritault, D., Caruelle, J.-P., and Kern, P. (2001). Heparan mimetic regulates collagen expression and TGF- β 1 distribution in gamma-irradiated human intestinal smooth muscle cells. *FASEB J.* 15, 1546–1554.
- Alexakis, C., Strup, C., Mestries, P., Mathé, D., Caruelle, J.P., Barritault, D., and Kern, P. (2004). Regulation of the collagen phenotype expression of gamma-irradiated vascular smooth muscle cells by heparan mimetics (RGTA). *J. Biomed. Mater. Res. A* 70, 594–602.
- Al-Khalidi, A., Al-Sabti, H., Galipeau, J., and Lachapelle, K. (2003). Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann. Thorac. Surg.* 75, 204–209.
- Al-Nbaheen, M., Vishnubalaji, R., Ali, D., Bouslimi, A., Al-Jassir, F., Megges, M., Prigione, A., Adjaye, J., Kassem, M., and Aldahmash, A. (2013). Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev.* 9, 32–43.
- Aloe, L., and Levi-Montalcini, R. (1977). Mast cells increase in tissues of neonatal rats injected with the nerve growth factor. *Brain Res.* 133, 358–366.
- Andreyev, J. (2007). Gastrointestinal symptoms after pelvic radiotherapy: a new understanding to improve management of symptomatic patients. *Lancet Oncol.* 8, 1007–1017.

- Andreyev, H.J.N., Wotherspoon, A., Denham, J.W., and Hauer-Jensen, M. (2010). Defining pelvic-radiation disease for the survivorship era. *Lancet Oncol.* 11, 310–312.
- Andreyev, H.J.N., Wotherspoon, A., Denham, J.W., and Hauer-Jensen, M. (2011). “Pelvic radiation disease”: new understanding and new solutions for a new disease in the era of cancer survivorship. *Scand. J. Gastroenterol.* 46, 389–397.
- Annaházi, A., Gecse, K., Dabek, M., Ait-Belgnaoui, A., Rosztóczy, A., Róka, R., Molnár, T., Theodorou, V., Wittmann, T., Bueno, L., et al. (2009). Fecal proteases from diarrheic-IBS and ulcerative colitis patients exert opposite effect on visceral sensitivity in mice. *Pain* 144, 209–217.
- Annese, V., Bassotti, G., Napolitano, G., Usai, P., Andriulli, A., and Vantrappen, G. (1997). Gastrointestinal motility disorders in patients with inactive Crohn’s disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 32, 1107–1117.
- Arcangeli, G., Saracino, B., Gomellini, S., Petrongari, M.G., Arcangeli, S., Sentinelli, S., Marzi, S., Landoni, V., Fowler, J., and Strigari, L. (2010). A prospective phase III randomized trial of hypofractionation versus conventional fractionation in patients with high-risk prostate cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 78, 11–18.
- Arcangeli, G., Fowler, J., Gomellini, S., Arcangeli, S., Saracino, B., Petrongari, M.G., Benassi, M., and Strigari, L. (2011). Acute and late toxicity in a randomized trial of conventional versus hypofractionated three-dimensional conformal radiotherapy for prostate cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 79, 1013–1021.
- Arizono, N., Matsuda, S., Hattori, T., Kojima, Y., Maeda, T., and Galli, S.J. (1990). Anatomical variation in mast cell nerve associations in the rat small intestine, heart, lung, and skin. Similarities of distances between neural processes and mast cells, eosinophils, or plasma cells in the jejunal lamina propria. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 62, 626–634.
- Arterbery, V.E., Wallner, K., Roy, J., and Fuks, Z. (1993). Short-term morbidity from CT-planned transperineal I-125 prostate implants. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 25, 661–667.
- Ash, D. (2007). Lessons from Epinal. *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol. G. B.* 19, 614–615.
- Augé, C., Balz-Hara, D., Steinhoff, M., Vergnolle, N., and Cenac, N. (2009). Protease-activated receptor-4 (PAR 4): a role as inhibitor of visceral pain and hypersensitivity. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 21, 1189–e107.
- Avritscher, E.B.C., Cooksley, C.D., and Elting, L.S. (2004). Scope and epidemiology of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Semin. Oncol. Nurs.* 20, 3–10.
- Bahat-Stroomza, M., Barhum, Y., Levy, Y.S., Karpov, O., Bulvik, S., Melamed, E., and Offen, D. (2009). Induction of adult human bone marrow mesenchymal stromal cells into functional astrocyte-like cells: potential for restorative treatment in Parkinson’s disease. *J. Mol. Neurosci. MN* 39, 199–210.
- Ballas, L.K., Elkin, E.B., Schrag, D., Minsky, B.D., and Bach, P.B. (2006). Radiation therapy facilities in the United States. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 66, 1204–1211.
- Baraniak, P.R., and McDevitt, T.C. (2010). Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regen. Med.* 5, 121–143.

- Barbara, G., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Cremon, C., Cottrell, G.S., Santini, D., Pasquinelli, G., Morselli-Labate, A.M., Grady, E.F., Bunnett, N.W., et al. (2004). Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 126, 693–702.
- Barbara, G., Wang, B., Stanghellini, V., de Giorgio, R., Cremon, C., Di Nardo, G., Trevisani, M., Campi, B., Geppetti, P., Tonini, M., et al. (2007a). Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 132, 26–37.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449, 1003–1007.
- Barreau, F., Cartier C, Ferrier L, Fioramonti J, Bueno L. (2004a). Nerve growth factor mediates alterations of colonic sensitivity and mucosal barrier induced by neonatal stress in rats. *Gastroenterology* 127, 524–534.
- Barreau, F., Ferrier, L., Fioramonti, J., and Bueno, L. (2004b). Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. *Gut* 53, 501–506.
- Barreau, F., Salvador-Cartier, C., Houdeau, E., Bueno, L., and Fioramonti, J. (2008). Long-term alterations of colonic nerve-mast cell interactions induced by neonatal maternal deprivation in rats. *Gut* 57, 582–590.
- Beaulieu, J.F. (1999). Integrins and human intestinal cell functions. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 4, D310–321.
- Becker, R., Sure, U., and Bertalanffy, H. (1999). Punctate midline myelotomy. A new approach in the management of visceral pain. *Acta Neurochir. (Wien)* 141, 881–883.
- Bernard, J.F. (1999). La voie nociceptive spino-parabrachiale. *Douleur Analgésie* 12, 121–128.
- Benarroch, E.E. (2007a). Enteric nervous system Functional organization and neurologic implications. *Neurology* 69, 1953–1957.
- Bessout, R., Sémont, A., Demarquay, C., Charcosset, A., Benderitter, M., and Mathieu, N. (2013). Mesenchymal stem cell therapy induces glucocorticoid synthesis in colonic mucosa and suppresses radiation-activated T cells: new insights into MSC immunomodulation. *Mucosal Immunol.*
- Bieback, K., Kern, S., Kocaömer, A., Ferlik, K., and Bugert, P. (2008). Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed. Mater. Eng.* 18, S71–76.
- Bienenstock, J., Tomioka, M., Stead, R., Ernst, P., Jordana, M., Gauldie, J., Dolovich, J., and Denburg, J. (1987). Mast cell involvement in various inflammatory processes. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135, S5–8.
- Bjerknes, M., and Cheng, H. (1999). Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* 116, 7–14.
- Blirando, K., Milliat, F., Martelly, I., Sabourin, J.-C., Benderitter, M., and François, A. (2011). Mast cells are an essential component of human radiation proctitis and contribute to experimental colorectal damage in mice. *Am. J. Pathol.* 178, 640–651.
- Blum, B., and Benvenisty, N. (2008). The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv. Cancer Res.* 100, 133–158.

- Bonner, G.F. (2001). Exacerbation of inflammatory bowel disease associated with use of celecoxib. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 1306–1308.
- Bonnet, F., and Vézinet, C. (1997). Propriétés analgésiques des agonistes alpha 2 adrénergiques. In *Douleurs, Bases Fondamentales, Pharmacologie, Douleurs Aiguës, Douleurs Chroniques, Thérapeutiques*, (Brasseur L, Chauvin L, Guilbaud G), pp. 167–173.
- Boué, J., Basso, L., Cenac, N., Blanpied, C., Rolli-Derkinderen, M., Neunlist, M., Vergnolle, N., and Dietrich, G. (2014). Endogenous Regulation of Visceral Pain via Production of Opioids by Colitogenic CD4+ T Cells in Mice. *Gastroenterology* 146, 166–175.
- Bradesi, S., Kokkotou, E., Simeonidis, S., Patierno, S., Ennes, H.S., Mittal, Y., McRoberts, J.A., Ohning, G., McLean, P., Marvizon, J.C., et al. (2006). The Role of Neurokinin 1 Receptors in the Maintenance of Visceral Hyperalgesia Induced by Repeated Stress in Rats. *Gastroenterology* 130, 1729–1742.
- Brierley, S.M., Page, A.J., Hughes, P.A., Adam, B., Liebrechts, T., Cooper, N.J., Holtmann, G., Liedtke, W., and Blackshaw, L.A. (2008). Selective role for TRPV4 ion channels in visceral sensory pathways. *Gastroenterology* 134, 2059–2069.
- Bristol, I.J., Farmer, M.A., Cong, Y., Zheng, X.X., Strom, T.B., Elson, C.O., Sundberg, J.P., and Leiter, E.H. (2000). Heritable susceptibility for colitis in mice induced by IL-10 deficiency. *Inflamm. Bowel Dis.* 6, 290–302.
- Brown, J.M., Nemeth, K., Kushnir-Sukhov, N.M., Metcalfe, D.D., and Mezey, E. (2011). Bone marrow stromal cells inhibit mast cell function via a COX2-dependent mechanism. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 41, 526–534.
- Bueno, L., Fioramonti, J., Delvaux, M., and Frexinos, J. (1997). Mediators and pharmacology of visceral sensitivity: from basic to clinical investigations. *Gastroenterology* 112, 1714–1743.
- Bueno, L., and Fioramonti, J. (1999). Effects of inflammatory mediators on gut sensitivity. *Can. J. Gastroenterol. J. Can. Gastroenterol.* 13 Suppl A, 42A–46A.
- Buénio, L., Fioramonti, J., and Garcia-Villar, R. (2000). Pathobiology of visceral pain: molecular mechanisms and therapeutic implications. III. Visceral afferent pathways: a source of new therapeutic targets for abdominal pain. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278, G670–676.
- Bueno, L., and Fioramonti, J. (2002). Visceral perception: inflammatory and non-inflammatory mediators. *Gut* 51, i19–i23.
- Buffa, R., Capella, C., Fontana, P., Usellini, L., and Solcia, E. (1978). Types of endocrine cells in the human colon and rectum. *Cell Tissue Res.* 192, 227–240.
- Burgos, I., Cuello, A.C., Liberini, P., Pioro, E., and Masliah, E. (1995). NGF-mediated synaptic sprouting in the cerebral cortex of lesioned primate brain. *Brain Res.* 692, 154–160.
- Burton, A.W., and Hamid, B. (2007). Current challenges in cancer pain management: does the WHO ladder approach still have relevance? *Expert Rev. Anticancer Ther.* 7, 1501–1502.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9, 641–650.

- Castagliuolo, I., Keates, A.C., Qiu, B., Kelly, C.P., Nikulasson, S., Leeman, S.E., and Pothoulakis, C. (1997). Increased substance P responses in dorsal root ganglia and intestinal macrophages during *Clostridium difficile* toxin A enteritis in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4788–4793.
- Castro, G.A. (1989). Gut Immunophysiology: Regulatory Pathways Within a Common Mucosal Immune System. *Physiology* 4, 59–64.
- Cenac, N., Coelho, A.-M., Nguyen, C., Compton, S., Andrade-Gordon, P., MacNaughton, W.K., Wallace, J.L., Hollenberg, M.D., Bunnett, N.W., Garcia-Villar, R., et al. (2002). Induction of Intestinal Inflammation in Mouse by Activation of Proteinase-Activated Receptor-2. *Am. J. Pathol.* 161, 1903–1915.
- Cenac, N., Andrews, C.N., Holzhausen, M., Chapman, K., Cottrell, G., Andrade-Gordon, P., Steinhoff, M., Barbara, G., Beck, P., Bunnett, N.W., et al. (2007). Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J. Clin. Invest.* 117, 636–647.
- Cervero, F. (1995). Visceral Pain: Mechanisms of Peripheral and Central Sensitization. *Ann. Med.* 27, 235–239.
- Cervero, F., and Merskey, H. (1996). What is a noxious stimulus? *Pain Forum* 5, 157–161.
- Cervero, F. (2000). Visceral pain--central sensitisation. *Gut* 47, iv56–iv57.
- Cervero, F., and Laird, J.M.A. (2004). Understanding the signaling and transmission of visceral nociceptive events. *J. Neurobiol.* 61, 45–54.
- Chadwick, V.S., Chen, W., Shu, D., Paulus, B., Bethwaite, P., Tie, A., and Wilson, I. (2002). Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 122, 1778–1783.
- Chang, P., Qu, Y., Liu, Y., Cui, S., Zhu, D., Wang, H., and Jin, X. (2013). Multi-therapeutic effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells on radiation-induced intestinal injury. *Cell Death Dis.* 4, e685.
- Chapel, A., Bertho, J.M., Bensidhoum, M., Fouillard, L., Young, R.G., Frick, J., Demarquay, C., Cuvelier, F., Mathieu, E., Trompier, F., et al. (2003). Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J. Gene Med.* 5, 1028–1038.
- Chayvialle, J.A., Miyata, M., Rayford, P.L., and Thompson, J.C. (1980). Immunoreactive somatostatin and vasoactive intestinal peptide in the digestive tract of cats. *Gastroenterology* 79, 837–843.
- Chen, Q.-Q., Yan, L., Wang, C.-Z., Wang, W.-H., Shi, H., Su, B.-B., Zeng, Q.-H., Du, H.-T., and Wan, J. (2013). Mesenchymal stem cells alleviate TNBS-induced colitis by modulating inflammatory and autoimmune responses. *World J. Gastroenterol. WJG* 19, 4702–4717.
- Cheon, G.J., Cui, Y., Yeon, D.-S., Kwon, S.-C., and Park, B.-G. (2012). Mechanisms of motility change on trinitrobenzenesulfonic Acid-induced colonic inflammation in mice. *Korean J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Korean Physiol. Soc. Korean Soc. Pharmacol.* 16, 437–446.
- Chery-Croze, S., Bosshard, A., Martin, H., Cuber, J.C., Charnay, Y., and Chayvialle, J.A. (1988). Peptide immunocytochemistry in afferent neurons from lower gut in rats. *Peptides* 9, 873–881.
- Chey, W.Y., Jin, H.O., Lee, M.H., Sun, S.W., and Lee, K.Y. (2001). Colonic motility abnormality in patients with irritable bowel syndrome exhibiting abdominal pain and diarrhea. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 1499–1506.

- Choong, P.-F., Mok, P.-L., Cheong, S.-K., Leong, C.-F., and Then, K.-Y. (2007). Generating neuron-like cells from BM-derived mesenchymal stromal cells in vitro. *Cytotherapy* 9, 170–183.
- Church, M.K., and Levi-Schaffer, F. (1997). The human mast cell. *J. Allergy Clin. Immunol.* 99, 155–160.
- Clemens, C.H.M., Samsom, M., Roelofs, J.M.M., van Berge Henegouwen, G.P., and Smout, A.J.P.M. (2003). Association between pain episodes and high amplitude propagated pressure waves in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 98, 1838–1843.
- Coelho, A.M., Fioramonti, J., and Bueno, L. (1998). Mast cell degranulation induces delayed rectal allodynia in rats: role of histamine and 5-HT. *Dig. Dis. Sci.* 43, 727–737.
- Coelho, A.-M., Vergnolle, N., Guiard, B., Fioramonti, J., and Bueno, L. (2002). Proteinases and proteinase-activated receptor 2: a possible role to promote visceral hyperalgesia in rats. *Gastroenterology* 122, 1035–1047.
- Coffin, B., Bouhassira, D., Sabate, J.-M., Barbe, L., and Jian, R. (2004). Alteration of the spinal modulation of nociceptive processing in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 53, 1465–1470.
- Conget, P.A., and Minguell, J.J. (1999). Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell. Physiol.* 181, 67–73.
- Corvera, C.U., Déry, O., McConalogue, K., Böhm, S.K., Khitin, L.M., Caughey, G.H., Payan, D.G., and Bunnett, N.W. (1997). Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2. *J. Clin. Invest.* 100, 1383–1393.
- Corvera, C.U., Déry, O., McConalogue, K., Gamp, P., Thoma, M., Al-Ani, B., Caughey, G.H., Hollenberg, M.D., and Bunnett, N.W. (1999). Thrombin and mast cell tryptase regulate guinea-pig myenteric neurons through proteinase-activated receptors-1 and -2. *J. Physiol.* 517 (Pt 3), 741–756.
- Cosset, J.-M., Mornex, F., and Eschwège, F. (2013). Hypofractionnement en radiothérapie : l'éternel retour. *Cancer/Radiothérapie* 17, 355–362.
- Coutinho, S.V., Meller, S.T., and Gebhart, G.F. (1996). Intracolonic zymosan produces visceral hyperalgesia in the rat that is mediated by spinal NMDA and non-NMDA receptors. *Brain Res.* 736, 7–15.
- Coutinho, S.V., Plotsky, P.M., Sablad, M., Miller, J.C., Zhou, H., Bayati, A.I., McRoberts, J.A., and Mayer, E.A. (2002). Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 282, G307–G316.
- Cowles, V.E., and Sarna, S.K. (1990). Effect of *T. spiralis* infection on intestinal motor activity in the fasted state. *Am. J. Physiol.* 259, G693–701.
- Cowles, V.E., and Sarna, S.K. (1991). *Trichinella spiralis* infection alters small bowel motor activity in the fed state. *Gastroenterology* 101, 664–669.
- Da Silva Meirelles, L., Fontes, A.M., Covas, D.T., and Caplan, A.I. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20, 419–427.
- Davies, N.M. (1995). Toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the large intestine. *Dis. Colon Rectum* 38, 1311–1321.
- Dazzi, F., Ramasamy, R., Glennie, S., Jones, S.P., and Roberts, I. (2006). The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev.* 20, 161–171.

- Delanian, S., Lefaix, J.-L., and Pradat, P.-F. (2012). Radiation-induced neuropathy in cancer survivors. *Radiother. Oncol.* 105, 273–282.
- Demir, I.E., Schäfer, K.-H., Tieftrunk, E., Friess, H., and Ceyhan, G.O. (2013). Neural plasticity in the gastrointestinal tract: chronic inflammation, neurotrophic signals, and hypersensitivity. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 125, 491–509.
- Denham, J.W., Hauer-Jensen, M., and Peters, L.J. (2001). Is it time for a new formalism to categorize normal tissue radiation injury? *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 50, 1105–1106.
- Déry, O., Corvera, C.U., Steinhoff, M., and Bunnett, N.W. (1998). Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am. J. Physiol.* 274, C1429–1452.
- Di Mola, F.F., Friess, H., Zhu, Z.W., Koliopanos, A., Bley, T., Di Sebastiano, P., Innocenti, P., Zimmermann, A., and Büchler, M.W. (2000). Nerve growth factor and Trk high affinity receptor (TrkA) gene expression in inflammatory bowel disease. *Gut* 46, 670–679.
- Di Nardo, G., Barbara, G., Cucchiara, S., Cremon, C., Shulman, R.J., Isoldi, S., Zecchi, L., Drago, L., Oliva, S., Saulle, R., et al. (2014). Neuroimmune interactions at different intestinal sites are related to abdominal pain symptoms in children with IBS. *Neurogastroenterol. Motil.* 26, 196–204.
- Djouad, F., Fritz, V., Apparailly, F., Louis-Plence, P., Bony, C., Sany, J., Jorgensen, C., and Noël, D. (2005). Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 52, 1595–1603.
- Doerffler-Melly, J., and Neuhuber, W.L. (1988). Rectospinal neurons: evidence for a direct projection from the enteric to the central nervous system in the rat. *Neurosci. Lett.* 92, 121–125.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.
- Dryden, G.W. (2009). Overview of stem cell therapy for Crohn's disease. *Expert Opin. Biol. Ther.* 9, 841–847.
- Duijvestein, M., Vos, A.C.W., Roelofs, H., Wildenberg, M.E., Wendrich, B.B., Verspaget, H.W., Kooy-Winkelaar, E.M.C., Koning, F., Zwaginga, J.J., Fidler, H.H., et al. (2010). Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut* 59, 1662–1669.
- Eliopoulos, N., Stagg, J., Lejeune, L., Pommey, S., and Galipeau, J. (2005). Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood* 106, 4057–4065.
- Elman, J.S., Li, M., Wang, F., Gimble, J.M., and Parekkadan, B. (2014). A comparison of adipose and bone marrow-derived mesenchymal stromal cell secreted factors in the treatment of systemic inflammation. *J. Inflamm. Lond. Engl.* 11, 1.
- Elson, C.O., Sartor, R.B., Tennyson, G.S., and Riddell, R.H. (1995). Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109, 1344–1367.

- Erbil, Y., Dibekoglu, C., Turkoglu, U., Ademoglu, E., Berber, E., Kizir, A., Mercan, S., and Toker, G. (1998). Nitric oxide and radiation enteritis. *Eur. J. Surg. Acta Chir.* 164, 863–868.
- Espagnolle, N., Guilloton, F., Deschaseaux, F., Gadelorge, M., Sensébé, L., and Bourin, P. (2014). CD146 expression on mesenchymal stem cells is associated with their vascular smooth muscle commitment. *J. Cell. Mol. Med.* 18, 104–114.
- Esposito, V., Linard, C., Maubert, C., Aigueperse, J., and Gourmelon, P. (1996). Modulation of gut substance P after whole-body irradiation. *Dig. Dis. Sci.* 41, 2070–2077.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.
- Eysselein, V.E., Reinshagen, M., PaTŁ, A., Davis, W., Nast, C., and Sternini, C. (1992). Calcitonin Gene—Related Peptide in Inflammatory Bowel Disease and Experimentally Induced Colitis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 657, 319–327.
- Fathers, E., Thrush, D., Huson, S.M., and Norman, A. (2002). Radiation-induced brachial plexopathy in women treated for carcinoma of the breast. *Clin. Rehabil.* 16, 160–165.
- Followill, D.S., Kester, D., and Travis, E.L. (1993). Histological changes in mouse colon after single- and split-dose irradiation. *Radiat. Res.* 136, 280–288.
- Followill, D.S., and Travis, E.L. (1995). Differential expression of collagen types I and III in consequential and primary fibrosis in irradiated mouse colon. *Radiat. Res.* 144, 318–328.
- François, A., Milliat, F., Guipaud, O., and Benderitter, M. (2013). Inflammation and immunity in radiation damage to the gut mucosa. *BioMed Res. Int.* 2013, 123241.
- François, S., Bensidhoum, M., Mouiseddine, M., Mazurier, C., Allenet, B., Semont, A., Frick, J., Saché, A., Bouchet, S., Thierry, D., et al. (2006). Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells Dayt. Ohio* 24, 1020–1029.
- Freeman, S.L., and MacNaughton, W.K. (2000). Ionizing radiation induces iNOS-mediated epithelial dysfunction in the absence of an inflammatory response. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278, G243–250.
- Friedenstein, A., Kurolesova, A., and Frolova, G. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6, 230–247.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., and Kulagina, N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 4, 267–274.
- Frieling, T., Cooke, HJ., Wood, J.D. (1995). Neuroimmune communication in the submucous plexus of guinea pig colon after infection with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterology* 107, 1602–1609.
- Frizzell, R.A., Field, M., and Schultz, S.G. (1979). Sodium-coupled chloride transport by epithelial tissues. *Am. J. Physiol.* 236, F1–8.

- Furness, J.B., Johnson, P.J., Pompolo, S., and Bornstein, J.C. (1995). Evidence that enteric motility reflexes can be initiated through entirely intrinsic mechanisms in the guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 7, 89–96.
- Furness, J.B., Kunze, W.A., Bertrand, P.P., Clerc, N., and Bornstein, J.C. (1998). Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog. Neurobiol.* 54, 1–18.
- Furness, J.B. (2003). Intestino-fugal neurons and sympathetic reflexes that bypass the central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 455, 281–284.
- Furness, J.B., Jones, C., Nurgali, K., and Clerc, N. (2004). Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog. Neurobiol.* 72, 143–164.
- Furness, J.B. (2006). Novel gut afferents: Intrinsic afferent neurons and intestino-fugal neurons. *Auton. Neurosci.* 125, 81–85.
- Furness, J.B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 286–294.
- Furness, J.B., Rivera, L.R., Cho, H.-J., Bravo, D.M., and Callaghan, B. (2013). The gut as a sensory organ. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *advance online publication*.
- García-Olmo, D., García-Arranz, M., Herreros, D., Pascual, I., Peiro, C., and Rodríguez-Montes, J.A. (2005). A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis. Colon Rectum* 48, 1416–1423.
- García-Olmo, D., Herreros, D., Pascual, I., Pascual, J.A., Del-Valle, E., Zorrilla, J., De-La-Quintana, P., García-Arranz, M., and Pascual, M. (2009). Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis. Colon Rectum* 52, 79–86.
- Gebhart, G. (2000). Visceral pain--peripheral sensitisation. *Gut* 47, iv54–iv55.
- Geraci, J.P., Jackson, K.L., Christensen, G.M., Parker, R.G., Fox, M.S., and Thrower, P.D. (1974). The relative biological effectiveness of cyclotron fast neutrons for early and late damage to the small intestine of the mouse. *Eur. J. Cancer* 10, 99–102.
- Giesler, G.J., Jr, Menétrey, D., and Basbaum, A.I. (1979). Differential origins of spinothalamic tract projections to medial and lateral thalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 184, 107–126.
- Gildenberg, P.L., and Hirshberg, R.M. (1984). Limited myelotomy for the treatment of intractable cancer pain. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 47, 94–96.
- Gillespie, C. Radiation-induced events and their time scale in mammalian cells.
- Gong, Z., and Niklason, L.E. (2011). Use of human mesenchymal stem cells as alternative source of smooth muscle cells in vessel engineering. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 698, 279–294.
- González, M.A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Büscher, D., and Delgado, M. (2009). Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 136, 978–989.
- Gonzalez-Rey, E., Anderson, P., González, M.A., Rico, L., Büscher, D., and Delgado, M. (2009). Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* 58, 929–939.

- Gottwald, T., Coerper, S., Schäffer, M., Köveker, G., and Stead, R.H. (1998). The mast cell-nerve axis in wound healing: a hypothesis. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* 6, 8–20.
- Grady, E.F., Baluk, P., Böhm, S., Gamp, P.D., Wong, H., Payan, D.G., Ansel, J., Portbury, A.L., Furness, J.B., McDonald, D.M., et al. (1996). Characterization of antisera specific to NK1, NK2, and NK3 neurokinin receptors and their utilization to localize receptors in the rat gastrointestinal tract. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 6975–6986.
- Grant, G., and Koerber, H.R. (2004). Chapter 5 - Spinal Cord Cytoarchitecture. In *The Rat Nervous System* (Third Edition), G. Paxinos, ed. (Burlington: Academic Press), pp. 121–128.
- Gremy, O., Benderitter, M., and Linard, C. (2008). Acute and persisting Th2-like immune response after fractionated colorectal gamma-irradiation. *World J. Gastroenterol. WJG* 14, 7075–7085.
- Grinnemo, K.H., Månsson, A., Dellgren, G., Klingberg, D., Wardell, E., Drvota, V., Tammik, C., Holgersson, J., Ringdén, O., Sylvé, C., et al. (2004). Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 127, 1293–1300.
- Guadalajara, H., Herreros, D., De-La-Quintana, P., Trebol, J., Garcia-Arranz, M., and Garcia-Olmo, D. (2012). Long-term follow-up of patients undergoing adipose-derived adult stem cell administration to treat complex perianal fistulas. *Int. J. Colorectal Dis.* 27, 595–600.
- Gué, M., Del Rio-Lacheze, C., Eutamene, H., Théodorou, V., Fioramonti, J., and Bueno, L. (1997). Stress-induced visceral hypersensitivity to rectal distension in rats: role of CRF and mast cells. *Neurogastroenterol. Motil.* 9, 271–279.
- Guo, W., Wang, H., Zou, S., Gu, M., Watanabe, M., Wei, F., Dubner, R., Huang, G.T.-J., and Ren, K. (2011). Bone marrow stromal cells produce long-term pain relief in rat models of persistent pain. *Stem Cells Dayt. Ohio* 29, 1294–1303.
- Gybels, J.M., and Sweet, W.H. (1989). Neurosurgical treatment of persistent pain. Physiological and pathological mechanisms of human pain. *Pain Headache* 11, 1–402.
- Hanauer, S.B. (2006). Inflammatory bowel disease: Epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm. Bowel Dis.* 12, S3–S9.
- Harb, A.H., Abou Fadel, C., and Sharara, A.I. (2014). Radiation enteritis. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 16, 383.
- Hauer-Jensen, M., Sauer, T., Devik, F., and Nygaard, K. (1983). Effects of dose fractionation on late roentgen radiation damage of rat small intestine. *Acta Radiol. Oncol.* 22, 381–384.
- Hauer-Jensen, M., Sauer, T., Berstad, T., and Nygaard, K. (1985). Influence of pancreatic secretion on late radiation enteropathy in the rat. *Acta Radiol. Oncol.* 24, 555–560.
- Hauer-Jensen, M., Poulakos, L., and Osborne, J.W. (1988). Effects of accelerated fractionation on radiation injury of the small intestine: a new rat model. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 14, 1205–1212.
- Hauer-Jensen, M., Richter, K.K., Wang, J., Abe, E., Sung, C.C., and Hardin, J.W. (1998). Changes in transforming growth factor beta1 gene expression and immunoreactivity levels during development of chronic radiation enteropathy. *Radiat. Res.* 150, 673–680.

- Hayashi, K., Shibata, C., Nagao, M., Sato, M., Kakyo, M., Kinouchi, M., Saijo, F., Miura, K., Ogawa, H., and Sasaki, I. (2010). Intracolonic capsaicin stimulates colonic motility and defecation in conscious dogs. *Surgery* 147, 789–797.
- Heckenkamp, J., Nigri, G.R., Waterman, P.R., Overhaus, M., Kossodo, S.C., and Lamuraglia, G.M. (2004). Gamma-irradiation modulates vascular smooth muscle cell and extracellular matrix function: Implications for neointimal development. *J. Vasc. Surg.* 39, 1097–1103.
- Hirschowitz, L., and Rode, J. (1991). Changes in neurons, neuroendocrine cells and nerve fibers in the lamina propria of irradiated bowel. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 418, 163–168.
- Hirshberg, R.M., Al-Chaer, E.D., Lawand, N.B., Westlund, K.N., and Willis, W.D. (1996). Is there a pathway in the posterior funiculus that signals visceral pain? *Pain* 67, 291–305.
- Holzer, P. (2004). TRPV1 and the gut: from a tasty receptor for a painful vanilloid to a key player in hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 231–241.
- Honczarenko, M., Le, Y., Swierkowski, M., Ghiran, I., Glodek, A.M., and Silberstein, L.E. (2006). Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells* Dayt. Ohio 24, 1030–1041.
- Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., Keating, A., and International Society for Cellular Therapy (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393–395.
- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D.A. (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* 26, 1269–1275.
- Jacob, C., Yang, P.-C., Darmoul, D., Amadesi, S., Saito, T., Cottrell, G.S., Coelho, A.-M., Singh, P., Grady, E.F., Perdue, M., et al. (2005). Mast Cell Tryptase Controls Paracellular Permeability of the Intestine ROLE OF PROTEASE-ACTIVATED RECEPTOR 2 AND β -ARRESTINS. *J. Biol. Chem.* 280, 31936–31948.
- Janeczek Portalska, K., Leferink, A., Groen, N., Fernandes, H., Moroni, L., van Blitterswijk, C., and de Boer, J. (2012). Endothelial Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells. *PLoS ONE* 7, e46842.
- Jänig, W., and Morrison, J.F. (1986). Functional properties of spinal visceral afferents supplying abdominal and pelvic organs, with special emphasis on visceral nociception. *Prog. Brain Res.* 67, 87–114.
- Jiang, H., Qu, L., Dou, R., Lu, L., Bian, S., and Zhu, W. (2013). Potential Role of Mesenchymal Stem Cells in Alleviating Intestinal Ischemia/Reperfusion Impairment. *PLoS ONE* 8, e74468.
- Jiang, W., Kreis, M.E., Eastwood, C., Kirkup, A.J., Humphrey, P.P., and Grundy, D. (2000). 5-HT(3) and histamine H(1) receptors mediate afferent nerve sensitivity to intestinal anaphylaxis in rats. *Gastroenterology* 119, 1267–1275.
- Jori, F.P., Napolitano, M.A., Melone, M.A.B., Cipollaro, M., Cascino, A., Altucci, L., Peluso, G., Giordano, A., and Galderisi, U. (2005). Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 94, 645–655.

- Joyce, N., Annett, G., Wirthlin, L., Olson, S., Bauer, G., and Nolta, J.A. (2010). Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen. Med.* 5, 933–946.
- Jullien, N., Blirando, K., Milliat, F., Sabourin, J.-C., Benderitter, M., and François, A. (2009). Up-regulation of endothelin type a receptor in human and rat radiation proctitis: preclinical therapeutic approach with endothelin receptor blockade. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 74, 528–538.
- Kapural, L., and Rakic, M. (2008). Spinal cord stimulation for chronic visceral pain secondary to chronic non-alcoholic pancreatitis. *J. Clin. Gastroenterol.* 42, 750–751.
- Kapural, L., Cywinski, J.B., and Sparks, D.A. (2011). Spinal cord stimulation for visceral pain from chronic pancreatitis. *Neuromodulation J. Int. Neuromodulation Soc.* 14, 423–426; discussion 426–427.
- Kaufmann, H.J., and Taubin, H.L. (1987). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs activate quiescent inflammatory bowel disease. *Ann. Intern. Med.* 107, 513–516.
- Keefe, D.M., Schubert, M.M., Elting, L.S., Sonis, S.T., Epstein, J.B., Raber-Durlacher, J.E., Migliorati, C.A., McGuire, D.B., Hutchins, R.D., Peterson, D.E., et al. (2007). Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer* 109, 820–831.
- Kellow, J.E., and Phillips, S.F. (1987). Altered small bowel motility in irritable bowel syndrome is correlated with symptoms. *Gastroenterology* 92, 1885–1893.
- Khosla, A., Adeyefa, O., and Nasir, S. (2013). Successful treatment of radiation-induced proctitis pain by blockade of the ganglion impar in an elderly patient with prostate cancer: a case report. *Pain Med. Malden Mass* 14, 662–666.
- Kim, Y.S., and Kwon, S.J. (2000). High thoracic midline dorsal column myelotomy for severe visceral pain due to advanced stomach cancer. *Neurosurgery* 46, 85–90; discussion 90–92.
- Kim, Y., Kim, H., Cho, H., Bae, Y., Suh, K., and Jung, J. (2007). Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 20, 867–876.
- Kinner, B., Zaleskas, J.M., and Spector, M. (2002). Regulation of Smooth Muscle Actin Expression and Contraction in Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Exp. Cell Res.* 278, 72–83.
- Klass, M., Gavrikov, V., Drury, D., Stewart, B., Hunter, S., Denson, D.D., Hord, A., and Csete, M. (2007). Intravenous mononuclear marrow cells reverse neuropathic pain from experimental mononeuropathy. *Anesth. Analg.* 104, 944–948.
- Kleij, H.P. van der, and Bienenstock, J. (2005). Significance of Conversation between Mast Cells and Nerves. *Allergy Asthma Clin. Immunol. Off. J. Can. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 1, 65–80.
- Kleinberg, L., Wallner, K., Roy, J., Zelefsky, M., Arterbery, V.E., Fuks, Z., and Harrison, L. (1994). Treatment-related symptoms during the first year following transperineal 125I prostate implantation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 28, 985–990.
- Klooker, T.K., Braak, B., Koopman, K.E., Welting, O., Wouters, M.M., Heide, S. van der, Schemann, M., Bischoff, S.C., Wijngaard, R.M. van den, and Boeckxstaens, G.E. (2010). The mast cell stabiliser ketotifen

decreases visceral hypersensitivity and improves intestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 59, 1213–1221.

Klopp, A.H., Gupta, A., Spaeth, E., Andreeff, M., and Marini, F. (2011). Concise Review: Dissecting a Discrepancy in the Literature: Do Mesenchymal Stem Cells Support or Suppress Tumor Growth? *STEM CELLS* 29, 11–19.

Knowles, C.H., and Aziz, Q. (2009). Basic and clinical aspects of gastrointestinal pain. *Pain* 141, 191–209.

Kopen, G.C., Prockop, D.J., and Phinney, D.G. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10711–10716.

Kountouras, J., and Zavos, C. (2008). Recent advances in the management of radiation colitis. *World J. Gastroenterol. WJG* 14, 7289–7301.

Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Müller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263–274.

Kuiken, S.D., Klooker, T.K., Tytgat, G.N., Lei, A., and Boeckstaens, G.E. (2006). Possible role of nitric oxide in visceral hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 18, 115–122.

Lai, J., Hunter, J.C., and Porreca, F. (2003). The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 291–297.

Langberg, C.W., Sauer, T., Reitan, J.B., and Hauer-Jensen, M. (1992). Tolerance of rat small intestine to localized single dose and fractionated irradiation. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* 31, 781–787.

Larghero, J., Vija, L., Lecourt, S., Michel, L., Verrecchia, F., and Farge, D. (2009). Cellules souches mésenchymateuses et immunomodulation : vers de nouvelles stratégies immunosuppressives pour le traitement des maladies auto-immunes ? *Rev. Médecine Interne* 30, 287–299.

Latremoliere, A., and Woolf, C.J. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* 10, 895–926.

Lazebnik, L.B., Konopliannikov, A.G., Kniazev, O.V., Parfenov, A.I., Tsaregorodtseva, T.M., Ruchkina, I.N., Khomeriki, S.G., Rogozina, V.A., and Konopliannikova, O.A. (2010). [Use of allogeneic mesenchymal stem cells in the treatment of intestinal inflammatory diseases]. *Ter. Arkhiv* 82, 38–43.

Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M.E., Remberger, M., et al. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371, 1579–1586.

Lee, C.H., Kim, J.-H., Lee, H.J., Jeon, K., Lim, H., Choi, H. yeon, Lee, E.-R., Park, S.H., Park, J.-Y., Hong, S., et al. (2011). The generation of iPS cells using non-viral magnetic nanoparticle based transfection. *Biomaterials* 32, 6683–6691.

Levine, J.D., Fields, H.L., and Basbaum, A.I. (1993). Peptides and the primary afferent nociceptor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 13, 2273–2286.

- Li, N., Lu, X., Zhao, X., Xiang, F.-L., Xenocostas, A., Karmazyn, M., and Feng, Q. (2009). Endothelial nitric oxide synthase promotes bone marrow stromal cell migration to the ischemic myocardium via upregulation of stromal cell-derived factor-1alpha. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 961–970.
- Lichtenstein, G.R., Feagan, B.G., Cohen, R.D., Salzberg, B.A., Diamond, R.H., Chen, D.M., Pritchard, M.L., and Sandborn, W.J. (2006). Serious infections and mortality in association with therapies for Crohn's disease: TREAT registry. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 4, 621–630.
- Linard, C., Busson, E., Holler, V., Strup-Perrot, C., Lacave-Lapalun, J.-V., Lhomme, B., Prat, M., Devauchelle, P., Sabourin, J.-C., Simon, J.-M., et al. (2013). Repeated autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell injections improve radiation-induced proctitis in pigs. *Stem Cells Transl. Med.* 2, 916–927.
- Lindsay, R.M., and Harmar, A.J. (1989). Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature* 337, 362–364.
- Llorente, M.D., Burke, M., Gregory, G.R., Bosworth, H.B., Grambow, S.C., Horner, R.D., Golden, A., and Olsen, E.J. (2005). Prostate cancer: a significant risk factor for late-life suicide. *Am. J. Geriatr. Psychiatry Off. J. Am. Assoc. Geriatr. Psychiatry* 13, 195–201.
- Long, X., Olszewski, M., Huang, W., and Kletzel, M. (2005). Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 14, 65–69.
- Lowery, A.E., Starr, T., Dhingra, L.K., Rogak, L., Hamrick-Price, J.R., Farberov, M., Kirsh, K.L., Saltz, L.B., Breitbart, W.S., and Passik, S.D. (2013). Frequency, characteristics, and correlates of pain in a pilot study of colorectal cancer survivors 1-10 years post-treatment. *Pain Med. Malden Mass* 14, 1673–1680.
- Lowman, B.C., Drossman, D.A., Cramer, E.M., and McKee, D.C. (1987). Recollection of childhood events in adults with irritable bowel syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.* 9, 324–330.
- Majumdar, M.K., Keane-Moore, M., Buyaner, D., Hardy, W.B., Moorman, M.A., McIntosh, K.R., and Mosca, J.D. (2003). Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Sci.* 10, 228–241.
- Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E., and Abraham, S.N. (1996). Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* 381, 77–80.
- Mansilla, E., Marín, G.H., Drago, H., Sturla, F., Salas, E., Gardiner, C., Bossi, S., Lamonega, R., Guzmán, A., Nuñez, A., et al. (2006). Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplant. Proc.* 38, 967–969.
- Mantyh, C.R., Gates, T.S., Zimmerman, R.P., Welton, M.L., Passaro, E.P., Vigna, S.R., Maggio, J.E., Kruger, L., and Mantyh, P.W. (1988). Receptor binding sites for substance P, but not substance K or neuromedin K, are expressed in high concentrations by arterioles, venules, and lymph nodules in surgical specimens obtained from patients with ulcerative colitis and Crohn disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 3235–3239.

- Mantyh, C.R., Pappas, T.N., Lapp, J.A., Washington, M.K., Neville, L.M., Ghilardi, J.R., Rogers, S.D., Mantyh, P.W., and Vigna, S.R. (1996). Substance P activation of enteric neurons in response to intraluminal *Clostridium difficile* toxin A in the rat ileum. *Gastroenterology* 111, 1272–1280.
- Marshall, J.K., and Irvine, E.J. (1998). Ketotifen treatment of active colitis in patients with 5-aminosalicylate intolerance. *Can. J. Gastroenterol. J. Can. Gastroenterol.* 12, 273–275.
- Marshall, J.K., Thabane, M., Garg, A.X., Clark, W., Meddings, J., Collins, S.M., and WEL Investigators (2004). Intestinal permeability in patients with irritable bowel syndrome after a waterborne outbreak of acute gastroenteritis in Walkerton, Ontario. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20, 1317–1322.
- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 7634–7638.
- Matsuda, N.M., Miller, S.M., and Evora, P.R.B. (2009). The Chronic Gastrointestinal Manifestations of Chagas Disease. *Clinics* 64, 1219–1224.
- Mauri, M., Lentini, D., Gravati, M., Foudah, D., Biella, G., Costa, B., Toselli, M., Parenti, M., and Coco, S. (2012). Mesenchymal stem cells enhance GABAergic transmission in co-cultured hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 49, 395–405.
- Mayer, E.A., Berman, S., Suyenobu, B., Labus, J., Mandelkern, M.A., Naliboff, B.D., and Chang, L. (2005). Differences in brain responses to visceral pain between patients with irritable bowel syndrome and ulcerative colitis. *Pain* 115, 398–409.
- Mazo, M., Araña, M., Pelacho, B., and Prosper, F. (2012). Mesenchymal Stem Cells and Cardiovascular Disease: A Bench to Bedside Roadmap. *Stem Cells Int.* 2012.
- Melzack, R., and Wall, P.D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150, 971–979.
- Menétrey, D., de Pommery, J., and Besson, J.M. (1984). Electrophysiological characteristics of lumbar spinal cord neurons backfired from lateral reticular nucleus in the rat. *J. Neurophysiol.* 52, 595–611.
- Merrick, G.S., Butler, W.M., Wallner, K.E., Galbreath, R.W., Murray, B., Zeroski, D., and Lief, J.H. (2003). Dysuria after permanent prostate brachytherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 55, 979–985.
- Morteau, O., Hachet, T., Caussette, M., and Bueno, L. (1994). Experimental colitis alters visceromotor response to colorectal distension in awake rats. *Dig. Dis. Sci.* 39, 1239–1248.
- Munir, M.A., Zhang, J., and Ahmad, M. (2004). A modified needle-inside-needle technique for the ganglion impar block. *Can. J. Anaesth. J. Can. Anesth.* 51, 915–917.
- Musolino, P.L., Coronel, M.F., Hökfelt, T., and Villar, M.J. (2007). Bone marrow stromal cells induce changes in pain behavior after sciatic nerve constriction. *Neurosci. Lett.* 418, 97–101.
- Narducci, F., Bassotti, G., Gaburri, M., and Morelli, A. (1987). Twenty four hour manometric recording of colonic motor activity in healthy man. *Gut* 28, 17–25.
- Nauta, H.J., Hewitt, E., Westlund, K.N., and Willis, W.D., Jr (1997). Surgical interruption of a midline dorsal column visceral pain pathway. Case report and review of the literature. *J. Neurosurg.* 86, 538–542.

- Nauta, A.J., Westerhuis, G., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E.G.A., Willemze, R., and Fibbe, W.E. (2006). Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 108, 2114–2120.
- Nauta, H.J., Soukup, V.M., Fabian, R.H., Lin, J.T., Grady, J.J., Williams, C.G., Campbell, G.A., Westlund, K.N., and Willis, W.D., Jr (2000). Punctate midline myelotomy for the relief of visceral cancer pain. *J. Neurosurg.* 92, 125–130.
- Ness, T.J., and Gebhart, G.F. (1988). Colorectal distension as a noxious visceral stimulus: physiologic and pharmacologic characterization of pseudoaffective reflexes in the rat. *Brain Res.* 450, 153–169.
- Ness, T.J., and Gebhart, G.F. (1990). Visceral pain: a review of experimental studies. *Pain* 41, 167–234.
- Neunlist, M., Aubert, P., Bonnaud, S., Van Landeghem, L., Coron, E., Wedel, T., Naveilhan, P., Ruhl, A., Lardeux, B., Savidge, T., et al. (2007). Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF- β 1-dependent pathway. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 292, G231–G241.
- Nicol, G.D., Lopshire, J.C., and Pafford, C.M. (1997). Tumor necrosis factor enhances the capsaicin sensitivity of rat sensory neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 975–982.
- O’Sullivan, M., Clayton, N., Breslin, N.P., Harman, I., Bountra, C., McLaren, A., and O’Morain, C.A. (2000). Increased mast cells in the irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 12, 449–457.
- Ogino, I., Okamoto, N., Ono, Y., Kitamura, T., and Nakayama, H. (2003). Pelvic insufficiency fractures in postmenopausal woman with advanced cervical cancer treated by radiotherapy. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 68, 61–67.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science* 322, 949–953.
- Olsen, N.K., Pfeiffer, P., Johannsen, L., Schröder, H., and Rose, C. (1993). Radiation-induced brachial plexopathy: neurological follow-up in 161 recurrence-free breast cancer patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 26, 43–49.
- Otterson, M., Sk, S., and Je, M. (1988). Effects of fractionated doses of ionizing radiation on small intestinal motor activity. *Gastroenterology* 95, 1249–1257.
- Otterson, M.F., Sarna, S.K., Leming, S.C., Moulder, J.E., and Fink, J.G. (1992). Effects of fractionated doses of ionizing radiation on colonic motor activity. *Am. J. Physiol.* 263, G518–526.
- Palecek, J., and Willis, W.D. (2003). The dorsal column pathway facilitates visceromotor responses to colorectal distention after colon inflammation in rats. *Pain* 104, 501–507.
- Pang, X., Boucher, W., Triadafilopoulos, G., Sant, G.R., and Theoharides, T.C. (1996). Mast cell and substance p-positive nerve involvement in a patient with both irritable bowel syndrome and interstitial cystitis. *Urology* 47, 436–438.
- Park, J.H., Rhee, P.-L., Kim, H.S., Lee, J.H., Kim, Y.-H., Kim, J.J., and Rhee, J.C. (2006). Mucosal mast cell counts correlate with visceral hypersensitivity in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 21, 71–78.

- Park, W.S., Heo, S.C., Jeon, E.S., Hong, D.H., Son, Y.K., Ko, J.-H., Kim, H.K., Lee, S.Y., Kim, J.H., and Han, J. (2013). Functional expression of smooth muscle-specific ion channels in TGF- β (1)-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 305, C377–391.
- Peiffert, D., Simon, J.-M., and Eschwege, F. (2007). [Epinal radiotherapy accident: passed, present, future]. *Cancer Radiothérapie J. Société Fr. Radiothérapie Oncol.* 11, 309–312.
- Perdue, M.H., Masson, S., Wershil, B.K., and Galli, S.J. (1991). Role of mast cells in ion transport abnormalities associated with intestinal anaphylaxis. Correction of the diminished secretory response in genetically mast cell-deficient W/W^v mice by bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.* 87, 687–693.
- Peschanski, M., and Besson, J.M. (1984). A spino-reticulo-thalamic pathway in the rat: an anatomical study with reference to pain transmission. *Neuroscience* 12, 165–178.
- Petersen-Felix, S., and Curatolo, M. (2002). Neuroplasticity--an important factor in acute and chronic pain. *Swiss Med. Wkly.* 132, 273–278.
- Pettersson, N., Olsson, C., Tucker, S.L., Alsadius, D., Wilderäng, U., Johansson, K.-A., and Steineck, G. (2013). Urethral pain among prostate cancer survivors 1 to 14 years after radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 85, e29–37.
- Pezet, S., Onténiente, B., Grannec, G., and Calvino, B. (1999). Chronic pain is associated with increased TrkA immunoreactivity in spinoreticular neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 5482–5492.
- Phipps, E., Braitman, L.E., Stites, S., and Leighton, J.C. (2008). Quality of life and symptom attribution in long-term colon cancer survivors. *J. Eval. Clin. Pract.* 14, 254–258.
- Picard, C., Wysocki, J., Linard, C., Garcia-Villar, R., Bueno, L., Griffiths, N.M., and Fioramonti, J. (2001a). Absence of protective role of afferent nerves in early intestinal mucosal alterations induced by abdominal irradiation in rats. *Int. J. Radiat. Biol.* 77, 349–356.
- Picard, C., Wysocki, J., Fioramonti, J., and Griffiths, N.M. (2001b). Intestinal and colonic motor alterations associated with irradiation-induced diarrhoea in rats. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 13, 19–26.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147.
- Pothoulakis, C., Castagliuolo, I., Leeman, S.E., Wang, C.-C., Li, H., Hoffman, B.J., and Mezey, E. (1998). Substance P receptor expression in intestinal epithelium in Clostridium difficile toxin A enteritis in rats. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 275, G68–G75.
- Potten, C.S., Booth, C., and Pritchard, D.M. (1997). The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int. J. Exp. Pathol.* 78, 219–243.
- Prins, A. (2011). The brain-gut interaction: the conversation and the implications. *South Afr. J. Clin. Nutr.* 24, S8–S14.
- Prior, A., Maxton, D.G., and Whorwell, P.J. (1990). Anorectal manometry in irritable bowel syndrome: differences between diarrhoea and constipation predominant subjects. *Gut* 31, 458–462.

- Purcell, W.M., and Atterwill, C.K. (1995). Mast cells in neuroimmune function: neurotoxicological and neuropharmacological perspectives. *Neurochem. Res.* 20, 521–532.
- Qiu, X., Villalta, J., Ferretti, L., Fandel, T.M., Albersen, M., Lin, G., Dai, Y., Lue, T.F., and Lin, C.-S. (2012). Effects of Intravenous Injection of Adipose-Derived Stem Cells in a Rat Model of Radiation Therapy-Induced Erectile Dysfunction. *J. Sex. Med.* 9, 1834–1841.
- Queneau, P., Navez, M.L., Peyron, R., Laurent, B. (2003). La douleur en gastroentérologie. Introduction à la physiopathologie de la douleur. Applications aux douleurs viscérales. *Gastroenterol Clin Biol* 27 (suppl), 1S59-1S67.
- Quevedo, H.C., Hatzistergos, K.E., Oskouei, B.N., Feigenbaum, G.S., Rodriguez, J.E., Valdes, D., Pattany, P.M., Zambrano, J.P., Hu, Q., McNiece, I., et al. (2009). Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. pnas*.0903201106.
- Raithel, M., Winterkamp, S., Pacurar, A., Ulrich, P., Hochberger, J., and Hahn, E.G. (2001). Release of mast cell tryptase from human colorectal mucosa in inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 36, 174–179.
- Ramalingam, S., Daughtridge, G.W., Johnston, M.J., Gracz, A.D., and Magness, S.T. (2012). Distinct levels of Sox9 expression mark colon epithelial stem cells that form colonoids in culture. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 302, G10–20.
- Rasmusson, I., Ringdén, O., Sundberg, B., and Le Blanc, K. (2003). Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 76, 1208–1213.
- Raybould, H.E., Gschossman, J.M., Ennes, H., Lembo, T., and Mayer, E.A. (1999). Involvement of stretch-sensitive calcium flux in mechanical transduction in visceral afferents. *J. Auton. Nerv. Syst.* 75, 1–6.
- Reinders, C.I., Herulf, M., Ljung, T., Hollenberg, J., Weitzberg, E., Lundberg, J.O., and Hellström, P.M. (2005). Rectal mucosal nitric oxide in differentiation of inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 3, 777–783.
- Reinisch, W., Miehsler, W., Dejaco, C., Harrer, M., Waldhoer, T., Lichtenberger, C., and Vogelsang, H. (2003). An open-label trial of the selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, rofecoxib, in inflammatory bowel disease-associated peripheral arthritis and arthralgia. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 17, 1371–1380.
- Reinshagen, M., Patel, A., Sottili, M., Nast, C., Davis, W., Mueller, K., and Eysselein, V. (1994). Protective function of extrinsic sensory neurons in acute rabbit experimental colitis. *Gastroenterology* 106, 1208–1214.
- Reinshagen, M., Patel, A., Sottili, M., French, S., Sternini, C., and Eysselein, V.E. (1996). Action of sensory neurons in an experimental at colitis model of injury and repair. *Am. J. Physiol.* 270, G79–86.
- Reinshagen, M., Flämig, G., Ernst, S., Geerling, I., Wong, H., Walsh, J.H., Eysselein, V.E., and Adler, G. (1998). Calcitonin Gene-Related Peptide Mediates the Protective Effect of Sensory Nerves in a Model of Colonic Injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286, 657–661.

- Rigaud, J., Delavierre, D., Sibert, L., and Labat, J.-J. (2010). Les infiltrations du système nerveux sympathique dans la prise en charge thérapeutiques des douleurs pelvipérinéales chroniques. *Prog. En Urol.* 20, 1124–1131.
- Rijnierse, A., Nijkamp, F.P., and Kraneveld, A.D. (2007). Mast cells and nerves tickle in the tummy: implications for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Pharmacol. Ther.* 116, 207–235.
- Ringdén, O., Uzunel, M., Sundberg, B., Lönnies, L., Nava, S., Gustafsson, J., Henningsohn, L., and Le Blanc, K. (2007). Tissue repair using allogeneic mesenchymal stem cells for hemorrhagic cystitis, pneumomediastinum and perforated colon. *Leukemia* 21, 2271–2276.
- Ringe, J., Strassburg, S., Neumann, K., Endres, M., Notter, M., Burmester, G.-R., Kaps, C., and Sittinger, M. (2007). Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J. Cell. Biochem.* 101, 135–146.
- Ritchie, J. (1973). Pain from distension of the pelvic colon by inflating a balloon in the irritable colon syndrome. *Gut* 14, 125–132.
- Robert, M.E., Singh, S.K., Ikuma, M., Jain, D., Ardito, T., and Binder, H.J. (2001). Morphology of isolated colonic crypts. *Cells Tissues Organs* 168, 246–251.
- Rocheftort, G.Y., Delorme, B., Lopez, A., Hérault, O., Bonnet, P., Charbord, P., Eder, V., and Domenech, J. (2006). Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells Dayt. Ohio* 24, 2202–2208.
- Ropenga, A., Combes, O., Chapel, A., and Griffiths, N.M. (2004). Persistence of altered 5-hydroxytryptamine turnover following hemibody X-irradiation in the rat distal colon. *Int. J. Radiat. Biol.* 80, 399–411.
- Rosztóczy, A., Fioramonti, J., Jármay, K., Barreau, F., Wittmann, T., and Buéno, L. (2003). Influence of sex and experimental protocol on the effect of maternal deprivation on rectal sensitivity to distension in the adult rat. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 15, 679–686.
- Rubio, C.A., and Jalnas, M. (1996). Dose-time-dependent histological changes following irradiation of the small intestine of rats. *Dig. Dis. Sci.* 41, 392–401.
- Salem, H.K., and Thiernemann, C. (2010). Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells Dayt. Ohio* 28, 585–596.
- Sarna, S.K. (2007). Enteric descending and afferent neural signaling stimulated by giant migrating contractions: essential contributing factors to visceral pain. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 292, G572–G581.
- Sartor, R.B. (2008). Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 134, 577–594.
- Schachinger, L., Michailov, M., Daaku, S.O., Prechter, I., Klöter, H., and Schippel, C. (1982). Effect of ionizing irradiation on the physiological activity of cyclic adenosinemonophosphate on smooth muscle preparations. *Radiat. Environ. Biophys.* 20, 245–254.
- Schultzberg, M., Hökfelt, T., Nilsson, G., Terenius, L., Rehfeld, J.F., Brown, M., Elde, R., Goldstein, M., and Said, S. (1980). Distribution of peptide- and catecholamine-containing neurons in the gastro-intestinal tract of rat

and guinea-pig: immunohistochemical studies with antisera to substance P, vasoactive intestinal polypeptide, enkephalins, somatostatin, gastrin/cholecystokinin, neurotensin and dopamine beta-hydroxylase. *Neuroscience* 5, 689–744.

Sedgwick, D.M., Ferguson, A., Newlands, G.F.J., Huntley, J., and Miller, H.R.P. (1990). Early events in irradiation-mediated depletion of rat gut mucosal mast cells. In *Advances in Mucosal Immunology*, T.T.M. MRCPath, S.J.C.B. MRCPath, P.W. Bland, C.R. Stokes, R.V.H.M. MRCP, and A.M.M.M. ChB, eds. (Springer Netherlands), pp. 426–429.

Sémont, A., François, S., Mouiseddine, M., François, A., Saché, A., Frick, J., Thierry, D., and Chapel, A. (2006b). Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury. *Adv. Exp. Med. Biol.* 585, 19–30.

Sémont, A., Mouiseddine, M., François, A., Demarquay, C., Mathieu, N., Chapel, A., Saché, A., Thierry, D., Laloi, P., and Gourmelon, P. (2010). Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis. *Cell Death Differ.* 17, 952–961.

Sémont, A., Demarquay, C., Bessout, R., Durand, C., Benderitter, M., and Mathieu, N. (2013). Mesenchymal stem cell therapy stimulates endogenous host progenitor cells to improve colonic epithelial regeneration. *PloS One* 8, e70170.

Serna, H., Porras, M., and Vergara, P. (2006). Mast cell stabilizer ketotifen [4-(1-methyl-4-piperidylidene)-4h-benzo[4,5]cyclohepta[1,2-b]thiophen-10(9H)-one fumarate] prevents mucosal mast cell hyperplasia and intestinal dysmotility in experimental *Trichinella spiralis* inflammation in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 1104–1111.

Sethi, A.K., and Sarna, S.K. (1995). Contractile mechanisms of canine colonic propulsion. *Am. J. Physiol.* 268, G530–538.

Shah, V., Lyford, G., Gores, G., and Farrugia, G. (2004). Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 126, 903–913.

Shamshiri, H., Paragomi, P., Paydar, M.J., Moezi, L., Bahadori, M., Behfar, B., Ardalan, F.A., and Dehpour, A.R. (2009). Antinociceptive effect of chronic lithium on visceral hypersensitivity in a rat model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: The role of nitric oxide pathway. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 24, 672–680.

Shanahan, F., Denburg, J.A., Fox, J., Bienenstock, J., and Befus, D. (1985). Mast cell heterogeneity: effects of neuroenteric peptides on histamine release. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 135, 1331–1337.

Sikandar, S., and Dickenson, A.H. (2012). Visceral Pain - the Ins and Outs, the Ups and Downs. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care* 6, 17–26.

Simoneau, A., Herring-Gillam, F.E., Vachon, P.H., Perreault, N., Basora, N., Bouatrouss, Y., Pageot, L.P., Zhou, J., and Beaulieu, J.F. (1998). Identification, distribution, and tissular origin of the alpha5(IV) and alpha6(IV) collagen chains in the developing human intestine. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 212, 437–447.

- Siniscalco, D., Giordano, C., Galderisi, U., Luongo, L., Alessio, N., Di Bernardo, G., de Novellis, V., Rossi, F., and Maione, S. (2010). Intra-brain microinjection of human mesenchymal stem cells decreases allodynia in neuropathic mice. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 67, 655–669.
- Siniscalco, D., Giordano, C., Galderisi, U., Luongo, L., de Novellis, V., Rossi, F., and Maione, S. (2011). Long-lasting effects of human mesenchymal stem cell systemic administration on pain-like behaviors, cellular, and biomolecular modifications in neuropathic mice. *Front. Integr. Neurosci.* 5, 79.
- Small, W., Jr, and Kachnic, L. (2005). Postradiotherapy pelvic fractures: cause for concern or opportunity for future research? *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 294, 2635–2637.
- Smith, A. (2006). A glossary for stem-cell biology. *Nature* 441, 1060–1060.
- Smith, E.M., and Calhoun, M.L. (1968). The microscopic anatomy of the white rat: a photographic atlas (Iowa State University Press).
- Spiller, R.C., Jenkins, D., Thornley, J.P., Hebden, J.M., Wright, T., Skinner, M., and Neal, K.R. (2000). Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 47, 804–811.
- Stam, R., Ekkelenkamp, K., Frankhuijzen, A.C., Bruijnzeel, A.W., Akkermans, L.M.A., and Wiegant, V.M. (2002). Long-lasting changes in central nervous system responsivity to colonic distention after stress in rats. *Gastroenterology* 123, 1216–1225.
- Stanzel, R.D.P., Lourenssen, S., and Blennerhassett, M.G. (2008). Inflammation causes expression of NGF in epithelial cells of the rat colon. *Exp. Neurol.* 211, 203–213.
- Stead, R.H., Tomioka, M., Quinonez, G., Simon, G.T., Felten, S.Y., and Bienenstock, J. (1987). Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 2975–2979.
- Stead, R.H., Dixon, M.F., Bramwell, N.H., Riddell, R.H., and Bienenstock, J. (1989). Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. *Gastroenterology* 97, 575–585.
- Steinhoff, M., Vergnolle, N., Young, S.H., Tognetto, M., Amadesi, S., Ennes, H.S., Trevisani, M., Hollenberg, M.D., Wallace, J.L., Caughey, G.H., et al. (2000). Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat. Med.* 6, 151–158.
- Stoll, B.A., and Andrews, J.T. (1966). Radiation-induced Peripheral Neuropathy. *Br. Med. J.* 1, 834–837.
- Stone, H.B., Coleman, C.N., Anscher, M.S., and McBride, W.H. (2003). Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol.* 4, 529–536.
- Strobach, R.S., Ross, A.H., Markin, R.S., Zetterman, R.K., and Linder, J. (1990). Neural patterns in inflammatory bowel disease: an immunohistochemical survey. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 3, 488–493.
- Strober, W., Fuss, I., and Mannon, P. (2007). The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* 117, 514–521.
- Stuschke, M., and Thames, H.D. (1997). Hyperfractionated radiotherapy of human tumors: overview of the randomized clinical trials. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 37, 259–267.

- Su, X., and Gebhart, G.F. (1998). Mechanosensitive Pelvic Nerve Afferent Fibers Innervating the Colon of the Rat are Polymodal in Character. *J. Neurophysiol.* 80, 2632–2644.
- Suckow, S.K., and Caudle, R.M. (2008). Identification and immunohistochemical characterization of colospinal afferent neurons in the rat. *Neuroscience* 153, 803–813.
- Suckow, S.K., and Caudle, R.M. (2009). NMDA receptor subunit expression and PAR2 receptor activation in colospinal afferent neurons (CANs) during inflammation induced visceral hypersensitivity. *Mol. Pain* 5, 54.
- Suckow, S.K., Anderson, E.M., and Caudle, R.M. (2012). Lesioning of TRPV1 expressing primary afferent neurons prevents PAR-2 induced motility, but not mechanical hypersensitivity in the rat colon. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 24, e125–135.
- Sun, L., Wang, D., Liang, J., Zhang, H., Feng, X., Wang, H., Hua, B., Liu, B., Ye, S., Hu, X., et al. (2010). Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 62, 2467–2475.
- Supiot, S., Créhange, G., Latorzeff, I., Pommier, P., Paumier, A., Rio, E., Delaroche, G., Guérif, S., Catton, C., Martin, J., et al. (2013). [Hypofractionated radiotherapy in prostate cancer]. *Cancer Radiothérapie J. Société Fr. Radiothérapie Oncol.* 17, 349–354.
- Swenson, O. (2002). Hirschsprung's Disease: A Review. *Pediatrics* 109, 914–918.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Tamarat, R., Lataillade, J.J., Bey, E., Gourmelon, P., and Benderitter, M. (2012). Stem cell therapy: from bench to bedside. *Radiat. Prot. Dosimetry* 151, 633–639.
- Tarte, K., Gaillard, J., Lataillade, J.-J., Fouillard, L., Becker, M., Mossafa, H., Tchirkov, A., Rouard, H., Henry, C., Spingard, M., et al. (2010). Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood* 115, 1549–1553.
- Theis, V.S., Sripadam, R., Ramani, V., and Lal, S. (2010). Chronic radiation enteritis. *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol. G. B.* 22, 70–83.
- Thompson, W.G., Longstreth, G.F., Drossman, D.A., Heaton, K.W., Irvine, E.J., and Müller-Lissner, S.A. (1999). Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut* 45, II43–II47.
- Thomsen, L., Robinson, T.L., Lee, J.C., Faraway, L.A., Hughes, M.J., Andrews, D.W., and Huizinga, J.D. (1998). Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current. *Nat. Med.* 4, 848–851.
- Tjong, Y.-W., Ip, S.-P., Lao, L., Wu, J., Fong, H.H.S., Sung, J.J.Y., Berman, B., and Che, C.-T. (2011). Role of neuronal nitric oxide synthase in colonic distension-induced hyperalgesia in distal colon of neonatal maternal separated male rats. *Neurogastroenterol. Motil.* 23, 666–e278.
- Tokcaer-Keskin, Z., Akar, A.R., Ayaloglu-Butun, F., Terzioglu-Kara, E., Durdu, S., Ozyurda, U., Ugur, M., and Akcali, K.C. (2009). Timing of induction of cardiomyocyte differentiation for in vitro cultured mesenchymal stem cells: a perspective for emergencies. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 87, 143–150.

- Toma, C., Pittenger, M.F., Cahill, K.S., Byrne, B.J., and Kessler, P.D. (2002). Human Mesenchymal Stem Cells Differentiate to a Cardiomyocyte Phenotype in the Adult Murine Heart. *Circulation* 105, 93–98.
- Trott, K.-R., and Herrmann, T. (1991). Radiation Effects on Abdominal Organs. In *Radiopathology of Organs and Tissues*, P. (ed.) D.E. Scherer, P.D.C. Streffer, and P.D.K.-R. Trott, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 313–346.
- Trzaska, K.A., and Rameshwar, P. (2011). Dopaminergic neuronal differentiation protocol for human mesenchymal stem cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 698, 295–303.
- Tse, W.T., Pendleton, J.D., Beyer, W.M., Egalka, M.C., and Guinan, E.C. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 75, 389–397.
- Tsuruoka, M., Maeda, M., and Inoue, T. (2005). Stimulation of the nucleus locus coeruleus/subcoeruleus suppresses visceromotor responses to colorectal distention in the rat. *Neurosci. Lett.* 381, 97–101.
- Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 726–736.
- Urban, M.O., and Gebhart, G.F. (1998). Chapter 27 The glutamate synapse: A target in the pharmacological management of hyperalgesic pain states. In *Progress in Brain Research*, I.A.L. and L.G. O.P. Ottersen, ed. (Elsevier), pp. 407–420.
- Van der Kleij, H.P.M., Ma, D., Redegeld, F.A.M., Kraneveld, A.D., Nijkamp, F.P., and Bienenstock, J. (2003). Functional expression of neurokinin 1 receptors on mast cells induced by IL-4 and stem cell factor. *J. Immunol. Baltim. Md* 171, 2074–2079.
- Van Diest, S.A., Stanisor, O.I., Boeckxstaens, G.E., de Jonge, W.J., and van den Wijngaard, R.M. (2012). Relevance of mast cell-nerve interactions in intestinal nociception. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 74–84.
- Vantyghem, M.-C., Kerr-Conte, J., Arnalsteen, L., Sergeant, G., Defrance, F., Gmyr, V., Declerck, N., Raverdy, V., Vandewalle, B., Pigny, P., et al. (2009). Primary Graft Function, Metabolic Control, and Graft Survival After Islet Transplantation. *Diabetes Care* 32, 1473–1478.
- Vergnolle, N. (2000). Review article: proteinase-activated receptors - novel signals for gastrointestinal pathophysiology. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14, 257–266.
- Vergnolle, N., Wallace, J.L., Bunnett, N.W., and Hollenberg, M.D. (2001). Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 146–152.
- Verma-Gandhu, M., Bercik, P., Motomura, Y., Verdu, E.F., Khan, W.I., Blennerhassett, P.A., Wang, L., El-Sharkawy, R.T., and Collins, S.M. (2006). CD4⁺ T-cell modulation of visceral nociception in mice. *Gastroenterology* 130, 1721–1728.
- Verma-Gandhu, M., Verdu, E.F., Bercik, P., Blennerhassett, P.A., Al-Mutawaly, N., Ghia, J.-E., and Collins, S.M. (2007). Visceral pain perception is determined by the duration of colitis and associated neuropeptide expression in the mouse. *Gut* 56, 358–364.

- Von Bonin, M., Stölzel, F., Goedecke, A., Richter, K., Wuschek, N., Hölig, K., Platzbecker, U., Illmer, T., Schaich, M., Schetelig, J., et al. (2009). Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant.* 43, 245–251.
- Voswinkel, J., Francois, S., Simon, J.-M., Benderitter, M., Gorin, N.-C., Mohty, M., Fouillard, L., and Chapel, A. (2013). Use of Mesenchymal Stem Cells (MSC) in Chronic Inflammatory Fistulizing and Fibrotic Diseases: a Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 45, 180–192.
- Wang, J., Zheng, H., Hollenberg, M.D., Wijesuriya, S.J., Ou, X., and Hauer-Jensen, M. (2003). Up-regulation and activation of proteinase-activated receptor 2 in early and delayed radiation injury in the rat intestine: influence of biological activators of proteinase-activated receptor 2. *Radiat. Res.* 160, 524–535.
- Wang, J., Qiu, X., Kulkarni, A., and Hauer-Jensen, M. (2006a). Calcitonin Gene-Related Peptide and Substance P Regulate the Intestinal Radiation Response. *Clin. Cancer Res.* 12, 4112–4118.
- Wang, J., Zheng, H., Kulkarni, A., Ou, X., and Hauer-Jensen, M. (2006b). Regulation of early and delayed radiation responses in rat small intestine by capsaicin-sensitive nerves. *Int. J. Radiat. Oncol.* 64, 1528–1536.
- Wang, J., Boerma, M., Kulkarni, A., Hollenberg, M.D., and Hauer-Jensen, M. (2010). Activation of protease activated receptor 2 by exogenous agonist exacerbates early radiation injury in rat intestine. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 77, 1206–1212.
- Wang, L.-H., Fang, X.-C., and Pan, G.-Z. (2004). Bacillary dysentery as a causative factor of irritable bowel syndrome and its pathogenesis. *Gut* 53, 1096–1101.
- Wang, T., Xu, Z., Jiang, W., and Ma, A. (2006c). Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell. *Int. J. Cardiol.* 109, 74–81.
- Wang, Y., Deng, Y., and Zhou, G.-Q. (2008). SDF-1alpha/CXCR4-mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model. *Brain Res.* 1195, 104–112.
- Wang, Y.Z., Palmer, J.M., and Cooke, H.J. (1991). Neuroimmune regulation of colonic secretion in guinea pigs. *Am. J. Physiol.* 260, G307–314.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7, 618–630.
- Warters, R.L., and Hofer, K.G. (1977). Radionuclide toxicity in cultured mammalian cells. Elucidation of the primary site for radiation-induced division delay. *Radiat. Res.* 69, 348–358.
- Weinstock, J.V. (2004). The role of substance P, hemokinin and their receptor in governing mucosal inflammation and granulomatous responses. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 9, 1936–1943.
- Welsh, M.J., Smith, P.L., Fromm, M., and Frizzell, R.A. (1982). Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. *Science* 218, 1219–1221.
- Wershil, B.K., Castagliuolo, I., and Pothoulakis, C. (1998). Direct evidence of mast cell involvement in Clostridium difficile toxin A-induced enteritis in mice. *Gastroenterology* 114, 956–964.
- Westling, P., Svensson, H., and Hele, P. (1972). Cervical plexus lesions following post-operative radiation therapy of mammary carcinoma. *Acta Radiol. Ther. Phys. Biol.* 11, 209–216.

- Weston, A.P., Biddle, W.L., Bhatia, P.S., and Miner, P.B., Jr (1993). Terminal ileal mucosal mast cells in irritable bowel syndrome. *Dig. Dis. Sci.* 38, 1590–1595.
- Whitehead, W.E., Holtkotter, B., Enck, P., Hoelzl, R., Holmes, K.D., Anthony, J., Shabsin, H.S., and Schuster, M.M. (1990). Tolerance for rectosigmoid distention in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 98, 1187–1192.
- Winston, J., Shenoy, M., Medley, D., Naniwadekar, A., and Pasricha, P.J. (2007). The vanilloid receptor initiates and maintains colonic hypersensitivity induced by neonatal colon irritation in rats. *Gastroenterology* 132, 615–627.
- Wood, J.D. (2004). Enteric neuroimmunophysiology and pathophysiology. *Gastroenterology* 127, 635–657.
- Wood, J.D. (2006). Histamine, mast cells, and the enteric nervous system in the irritable bowel syndrome, enteritis, and food allergies. *Gut* 55, 445–447.
- Wood, J.D. (2007). Neuropathophysiology of functional gastrointestinal disorders. *World J. Gastroenterol.* WJG 13, 1313–1332.
- Wynn, R.F., Hart, C.A., Corradi-Perini, C., O'Neill, L., Evans, C.A., Wraith, J.E., Fairbairn, L.J., and Bellantuono, I. (2004). A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* 104, 2643–2645.
- Xu, G.Y., Huang, L.Y., and Zhao, Z.Q. (2000). Activation of silent mechanoreceptive cat C and Adelta sensory neurons and their substance P expression following peripheral inflammation. *J. Physiol.* 528 Pt 2, 339–348.
- Yamanaka, S. (2007). Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 1, 39–49.
- Yang, X., Sheng, L., Guan, Y., Qian, W., and Hou, X. (2009). Synaptic plasticity: the new explanation of visceral hypersensitivity in rats with *Trichinella spiralis* infection? *Dig. Dis. Sci.* 54, 937–946.
- Zhang, Z. (2013). Multilineage differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. *Exp. Ther. Med.*
- Zhang, H., Olden, C. van, Sweeney, D., and Martin-Rendon, E. (2014). Blood vessel repair and regeneration in the ischaemic heart. *Open Heart* 1, e000016.
- Zheng, H., Wang, J., and Hauer-Jensen, M. (2000). Role of Mast Cells in Early and Delayed Radiation Injury in Rat Intestine. *Radiat. Res.* 153, 533–539.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., et al. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4, 381–384.
- Zvaifler, N.J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C.J., Moss, J., Burger, J.A., and Maini, R.N. (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2, 477–488.

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1: Les différents types de radiothérapie

Annexe 2: Avancées technologiques permettant d'optimiser les traitements par radiothérapie externe.

Annexe 3: Publication acceptée

Annexe 1 : Les différents types de radiothérapie

Type de radiothérapie	Appareillage / Source / Type de rayonnement	Caractéristiques
Radiothérapie externe (ou transcutanée)	Accélérateur linéaire de particule → émission de rayons X ou électrons (Appareil de cobalthérapie → émission de rayons γ)	Technique la plus utilisée Source utilisée à distance du volume à irradier Dépôt d'énergie en profondeur (pour les e- : à quelques cm) Domages aux tissus sains <i>Exemple : cancers abdomino-pelviens (prostate)</i>
Curiethérapie ou brachythérapie	Source radioactive scellée (Iridium192 ou Césium137) → émission de rayons γ Source positionnée sur la tumeur directement (interstitielle), dans une cavité proche de la tumeur (endocavitaire) ou sur la surface de la peau	La plus ancienne application thérapeutique de la radioactivité Très haute dose délivrée à la tumeur et bonne préservation des tissus environnants (↘ rapide de la dose selon l'inverse du carré de la distance à la source radioactive) <i>Exemple : cancers gynécologiques (col de l'utérus, endomètre), cancer localisé de la prostate à risque faible ou intermédiaire, tête et cou</i>
Radiothérapie métabolique ou radiothérapie interne vectorisée	Source radioactive injectable (voie orale ou intraveineuse) non scellée → émission de rayons γ	Capacité de certaine tumeur à capter un élément. Permet l'irradiation de cellules tumorales disséminées. Toxicité des tissus sains qui vont métaboliser ce vecteur <i>Exemple : cancer de la thyroïde (iode131)</i>
Radio-immunothérapie	Source radioactive injectable (voie orale ou intraveineuse) non scellée utilisant un isotope radioactif peu pénétrant mais avec un rayonnement puissant → émission de rayons γ	Anticorps monoclonal dirigé contre une structure spécifique d'une cellule tumorale couplé à un isotope radioactif Irradiation tumorale qui n'endommage pas les tissus sains En développement <i>Exemple : hémopathies malignes</i>

Annexe 2 : Avancées technologiques permettant d'optimiser les traitements par radiothérapie externe.

Radiothérapie conformationnelle	L'utilisation d'une source multifaisceaux (de 4 à 6) permet de faire converger des faisceaux d'irradiation d'intensité modérée pour avoir une dose maximale au niveau de la zone tumorale et de minimiser les doses aux tissus sains.
Radiothérapie conformationnelle tridimensionnelle (3D-CRT : 3 Dimensions- Conformal Radiation Therapy)	Elle permet, par l'utilisation de la reconstruction en 3 dimensions d'avoir une reconstitution du volume tumoral et du tissu sain. Ceci permet une meilleure administration de dose au volume souhaité.
Radiothérapie par modulation d'intensité (IMRT : Intensity Modulated Radiation Therapy)	Elle permet une modulation de l'intensité des faisceaux d'irradiation au cours du traitement. Ainsi en fonction de l'évolution tumorale (forme, taille, volume) l'intensité des faisceaux peut être adaptée.
Tomographie ou radiothérapie hélicoïdale	Technique d'imagerie qui permet de vérifier le positionnement du patient et l'évolution du volume tumoral.

Annexe 3 : Publication acceptée

Mesenchymal Stem Cell Therapy Stimulates Endogenous Host Progenitor Cells to Improve Colonic Epithelial Regeneration

Alexandra Sémont, Christelle Demarquay, Raphaële Bessout, Christelle Durand, Marc Benderitter, Noëlle Mathieu*

Laboratory of Radiopathology and Experimental Therapeutics, Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety, Fontenay-aux-Roses, France

Abstract

Patients who undergo pelvic radiotherapy may develop severe and chronic complications resulting from gastrointestinal alterations. The lack of curative treatment highlights the importance of novel and effective therapeutic strategies. We thus tested the therapeutic benefit of mesenchymal stem cells (MSC) treatment and proposed molecular mechanisms of action. MSC efficacy was tested in an experimental model of radiation-induced severe colonic ulceration histologically similar to that observed in patients. In this model, MSC from bone marrow were administered intravenously, immediately or three weeks (established lesions) after irradiation. MSC therapy reduces radiation-induced colonic ulceration and increases animal survival. MSC treatment induces therapeutic efficacy whatever the time of cell infusion. Infused-MSC engraft in the colon but also increase endogenous MSC mobilization in blood that have lasting benefits over time. *In vitro* analysis demonstrates that the MSC effect is mediated by paracrine mechanisms through the non-canonical WNT (Wingless integration site) pathway. In irradiated rat colons, MSC treatment increases the expression of the non-canonical WNT4 ligand by epithelial cells. The epithelial regenerative process is improved after MSC injection by stimulation of colonic epithelial cells positive for SOX9 (SRY-box containing gene 9) progenitor/stem cell markers. This study demonstrates that MSC treatment induces stimulation of endogenous host progenitor cells to improve the regenerative process and constitutes an initial approach to arguing in favor of the use of MSC to limit/reduce colorectal damage induced by radiation.

Citation: Sémont A, Demarquay C, Bessout R, Durand C, Benderitter M, et al. (2013) Mesenchymal Stem Cell Therapy Stimulates Endogenous Host Progenitor Cells to Improve Colonic Epithelial Regeneration. PLOS ONE 8(7): e70170. doi:10.1371/journal.pone.0070170

Editor: Pamela Rameshwar, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, United States of America

Received: March 21, 2013; **Accepted:** June 14, 2013; **Published:** July 29, 2013

Copyright: © 2013 Sémont et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from Ile de France regional council. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: noelle.mathieu@ipn.fr

Introduction

Pelvic radiotherapy is an established part of treatment of both primary and recurrent pelvic malignancies, including colorectal, urologic, and gynecologic cancers. The efficacy of radiotherapy requires an optimal compromise between tumor control and toxicity to healthy, non-neoplastic tissues. As a result of pelvic radiotherapy, non-neoplastic tissue present in the irradiation field near the tumor can be damaged, leading to acute and/or chronic symptoms, the condition labeled as "pelvic-radiation disease" by Andreyev et al. [1]. Advances in the quality of radiation treatment have improved tumor control, increasing the number of cancer survivors suffering from treatment-related adverse effects. Gastrointestinal symptoms induced by chronic toxicity of irradiation have the greatest effect on patient quality of life. It is estimated that 90% of patients subjected to pelvic radiotherapy develop acute side effects (nausea, alteration of diarrhea and constipation, vomiting and abdominal pain) with permanent changes to their bowel habits. After 20 years, 20% of patients develop severe late side effects (diarrhea, rectal bleeding, tenesmus and occlusion) associated with high morbidity and mortality [2].

After irradiation, the death of proliferating stem cells, micro-vascular apoptosis and local ischemia can disrupt epithelium

renewal. Moreover, in the gut, impairment of the epithelial barrier may result in increased penetration and absorption of toxic and immunogenic factors, leading to an uncontrolled immune response and a homeostatic imbalance in the epithelium. Disturbances to the repair process can lead to loss of tissue (ulceration) or pathological healing (fibrosis, fistula). Thus, rapid resealing of the epithelial surface barrier following injury is essential for preserving normal homeostasis. The intestinal epithelium is maintained by an intricate cell-replacement process in which terminally differentiated epithelial cells are continuously and rapidly replaced by the replication and differentiation of clonogenic epithelial cells located within the crypts. The recent identification of intestinal stem cell (ISC) markers such as *Lgr5* (leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5), *Sat9*, *Tert* (telomerase reverse transcriptase) and *Bmi1*, has made it possible to distinguish two functionally distinct ISC populations during homeostasis and the injury repair process. *Lgr5*⁺, *Sat9*⁺ mark the rapidly dividing cells and identify a population of cells able to form *in vitro* organoids [3–5]. In support of Potten's initial hypothesis, the ISC field has recently showed evidence of the presence in the intestine of *Sat9*⁺, *Bmi1*⁺ and *Tert*⁺ slow-cycling cells playing an important role in the regenerative process [6–9].

To minimize radiation damage to the intestine, several pharmaceutical strategies have been considered, based on the protection/suppression of the destructive process (TGF- β factor 3, Glucagon-like peptide-2) or stimulation of the regenerative process (Interleukin 11, Keratinocyte Growth Factor and R-SPONDIN). However, their efficacy is limited and further research is needed to investigate their safety and efficacy in patients. To date there are no effective Food and Drug Administration-approved therapeutic agents for significantly improving intestinal radiation-induced lesions [10]. Stem cell-based approaches using MSC have proved promising for the development of future therapeutic approaches. In mouse models of inflammatory bowel disease, MSC injection reduces the severity of colitis, prevents recurrence of the disease and reduces animal mortality [11]. In clinical trials, intravenously-injected MSC induce therapeutic benefits in patients with graft-versus-host disease suffering from gastrointestinal disorders such as peritonitis [12]. A phase II Crohn's disease study also yielded promising efficacy in the treatment of rectovaginal and perianal fistulas [13]. Moreover, clinical grade expanded-MSC were strictly verified [14] and long-term follow-up of patients undergoing MSC administration affirms the safety profile of the treatment with no evidence of neoplastic structures [15].

In spite of the improvement of radiotherapy techniques that aim to target prostate, bladder or uterine tumors, the colorectum is located in the irradiation field as well. Therefore, the colorectum may be injured and damaged during pelvic radiotherapy protocols leading to organ dysfunction and colonic complications. In this study, we analyzed the therapeutic potential of MSC treatment on rat colonic epithelium in a context of radiation-induced ulceration. Previous work in our laboratory in rats showed no changes in colonic histology after fractionated colorectal radiotherapy [16], 26 weeks after the last dose of irradiation. Therefore, in this study, in order to obtain severe and irreversible damage a single high dose of irradiation (27 Gy) centered on the rat's distal colon was applied. This experimental model generates severe radiation-induced epithelial alterations histologically similar to those seen in patients treated with radiotherapy and who develop colorectal complications. Our results report proof of principle of MSC's ability to reduce radiation-induced colonic epithelium ulceration. In this context, we also analyzed, *in vitro* and *in vivo*, the involvement of molecular signaling pathways on epithelial cell regulation after MSC treatment.

Materials and Methods

Animals, Irradiation, MSC Injection Protocol and Sample Collection

All experiments were performed in compliance with French laws and guidelines for animal experiments (Act no.92-333 of 2 October 2009) and approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation "CEEA number 81" (Protocol numbers: P07-15 and P07-16). The 300 g wild-type male Sprague-Dawley (SD) rats were purchased from Charles River Laboratories (France). Animals were housed in double decker cages, three to a cage, with full access to food and water and light and dark cycles. All efforts are made to minimize suffering and all experiments are performed on anesthetized animals (TEM, anesthesia, Limoges, France) by isoflurane inhalation (AErrane, Baxter SA, Lessines, Belgium). Animals were anesthetized and a single 27 Gy dose was delivered by a ^{60}Co source through a 2×3 cm window centered on the colorectal region. This configuration of irradiation also induces the irradiation of other organs located close to the colon as bladder, prostate or seminal vesicles. This single dose irradiation methodology, though it is not a model for human radiotherapy

(fractionated irradiation), provides a good colonic ulcerative match for patients subjected to pelvic radiotherapy and who develop gastrointestinal complications. Right after irradiation (preventive protocol) or three weeks after irradiation then every two weeks (curative and iterative protocol), 5 million MSC were injected in the tail vein of the anesthetized rat. Animal behavior was monitored daily and suffering animals were euthanized. Euthanasia is performed by excess of anesthetic product. Colonoscopy analyses were done at 18 weeks on anesthetized rats with pediatric bronchoscope (Pentax, France).

MSC Isolation, Characterization and Culture

MSC bone marrow was obtained by flushing femurs of seven-week-old rats ethically euthanized as previously described in the literature [17]. After ten days, the monolayer of adherent cells (P0) was seeded at $5,000$ cells per cm^2 (passage P1). At each passage the phenotype of amplified MSC was verified by flow cytometry using FACSort (BD Biosciences). Cells were incubated for 20 min at 4°C with phycoerythrin-conjugated mouse monoclonal antibodies against rat antigens. The percentage of CD90 $^+$ (clone OX-7; BD Biosciences) and CD73 $^+$ (clone 5F/89; BD Biosciences) cells was analyzed and the absence of hematopoietic cells was verified with CD34 (clone IC0115, Santa Cruz) and CD45 (clone OX-1; Becton Dickinson, France) markers. On average, MSC expressed 94.8% CD90 (± 3.3), 81.25% CD73 (± 8.12), 2.13% CD34 (± 0.79) and 6.4% CD45 (± 1.15). Identical isotype antibodies served as controls. The potential of adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation was also evaluated as described by Rochefort et al [17]. The abilities to form colony-forming unit fibroblasts (CFU-F) were also analyzed. Bone marrow total cells or peripheral blood mononuclear cells (after ficoll) were plated in triplicate at densities of 5×10^6 cells per 25 cm^2 or 15×10^6 cells per 25 cm^2 , respectively. CFU-Fs were stained with violet crystal and counted after 10 days. For MSC conditioned medium preparation, MSC were seeded at 2×10^6 cells in a 75 cm^2 flask and cultured overnight in media without FCS. Then the supernatant was collected and frozen and the cells were counted.

Tissue Samples

For rat samples, on the day of euthanasia, cardiac puncture was performed under isoflurane anesthesia. Collected blood was transferred in EDTA sample collection tubes and centrifuged (2500 rpm, 20 min) to separate white blood cells from red cells and plasma for ELISA and CFU-F analysis. Colonic mucosa was separated from muscularis propria by gentle dissection. Half of the sampling was frozen in liquid nitrogen for RNA preparation and the remaining tissues was used to prepare mucosa protein extracts by tissue disruption in PBS with protease inhibitors (complete Mini, Roche) and stored at -80°C until use. For histological analysis, the colorectum was fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin. Human tissues were obtained according to institutional ethical guidelines (Gustave Roussy Institute) and French Medical Research Council guidelines. Tissue samples were obtained from tiny pieces of colon removed surgically from patients treated for rectal adenocarcinoma with preoperative radiotherapy (a total of 45 Gy, delivered in fractions of 1.8 or 2 Gy). Patients were notified that resections would be sent to pathologists for analysis but no ethics committee was consulted for operating waste. Nevertheless, with the laws (articles L1245-2, L1211-3, L1211-4, L1211-5, L1211-6 and L1211-7 of the Public Health Code) the surgical residues were subjected to the principles and rules in relation to the donation and procurement of human tissues. Surgery resection was done 5 to 7 weeks post radiotherapy.

Slides were stained with hematoxylin-eosin-saffron. Tissues samples were numbered and anonymously analyzed.

Histology, lesion Analyses and Immunohistochemistry (IHC)

Paraffin embedded colons were cut into circular sections of 5 μ m and stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES). The severity of colorectal damage was assessed using the radiation injury score modified from Langberg et al. A variable of the injury score was mucosal damage (ulceration, epithelial atypia and regeneration capacities), colitis *cystica profunda*, vascular sclerosis, fibrosis, muscular dystrophy and serosal thickening. Graduation of the injury was 0 = null; 1 = slight; 2 = moderate and 3 = severe. For immunohistochemistry, sections were deparaffinized and hydrated. For GFP (Green Fluorescent Protein) IHC, tissue sections were treated with 0.1% triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS 1x (Gibco-BRL) at room temperature (RT) for 10 min. Then endogenous peroxidases were inhibited by incubation with 3% H₂O₂ in methanol at RT for 10 min. After saturation (X0909, DakoCytomation) rabbit anti-GFP diluted to 1/200 (Anaspec; 29779) was applied to the section for 1h at 37°C. The tissue sections were incubated with Envision kit anti-rabbit HRP (K4002; DakoCytomation) for 30 min at RT. For β -catenin and SOX9 immunostaining, tissue sections were placed in an antigen retrieval solution (0.01M citrate buffer, pH=6 (DakoCytomation) for 3x5 min at 350W) and quenched for endogenous peroxidases as described above. After saturation (X0909, DakoCytomation) rabbit anti β -catenin at 200 μ g/ml (ab2965; Abcam) or anti-SOX9 at 200 μ g/ml (Sc-20095; Santa-Cruz) was applied to the section for 2h at RT. The tissue sections were incubated with Envision kit anti-rabbit HRP (K4002; DakoCytomation) for 30 min at RT. For PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) and WNT4 IHC, tissue sections were treated with 0.1% triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS 1x (Gibco-BRL) at RT for 10 min. Then endogenous peroxidases were inhibited by incubation with 3% H₂O₂ in methanol at RT for 10 min and placed in an antigen retrieval solution (0.01M citrate buffer, pH=6 (DakoCytomation) for 3x5 min at 350W. After saturation (X0909, DakoCytomation) mouse anti-PCNA used at 525 μ g/ml (clone PC10; DakoCytomation) or rabbit anti-WNT4 used at 1 mg/ml (LifeSpan Biosciences LS-C112550) was applied to the section for 1h at 37°C. The tissue sections were incubated with kit LSAB2 (K0609; DakoCytomation) or Envision kit anti-rabbit HRP (K4002; DakoCytomation). Staining was developed with Histogreen substrate (E109; Abcys). Sections were counterstained with Fast nuclear red (H-3403; Vector), dehydrated and mounted. Isotype control antibodies are used as negative controls. Immunohistochemistry analyses were performed on n=8 animals.

Intestinal Cell Culture Inhibition Conditions and Immunofluorescence

IEC18 were obtained from ATCC (ref ATCC-CRL-1589, Manassas, VA) and cultured in DMEM, high glucose (Invitrogen) supplemented with 5% FCS, 1% Penicillin Streptomycin and 1% Glutamine (Gibco-BRL; Invitrogen). Cells were seeded at 60,000 cells/well in 6-well plates, starved for 24 h without FCS, irradiated or not at 15Gy with a ¹³⁷Cs source (1.1 Gy/min). Right after irradiation, MSC conditioned medium resulting from 3 to 5 different bone marrow expansions or medium alone was applied to the cells. IEC18 were treated or not with different inhibitors: the PI3-kinase (Phosphoinositide 3-kinase) inhibitor (LY-294002), used at final concentration of 10 μ g/ml, was obtained from Promega (Madison, USA), recombinant DKK1 (Dickkopf Homolog-1) was

obtained from R&D systems (UK) and used at 0.4 μ g/ml, MEK1 (MAP Kinase kinase) inhibitor (PD98059) was obtained from Invitrogen and used at 25 μ g/ml and JAK1 (Janus Kinase-2) (33 μ M) and Casein kinase I inhibitors (33 μ M) were obtained from Calbiochem (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), CAM-KII (calmodulin-dependent protein kinase II) used at 4 μ M (KN-93) and PKC (Protein Kinase C) used at 1.5 μ M (RO 31-8220) from Sigma-Aldrich. After 48 hours, supernatants were collected for protein analysis and IEC18 were trypsinized, numbered and frozen for PCR. Each condition was realized in triplicate. For immunofluorescence, IEC18 were seeded on slides and cultured until 70% of confluence. After washing in PBS1x, cells were fixed in methanol then permeabilized in Triton X100 and saturated in 5% goat serum for 20 min at RT. Slides were incubated with rabbit anti β -catenin antibody diluted to 1/1000 (ab2365; Abcam) then goat anti-rabbit Alexa 568 (A-11036, Invitrogen) diluted to 1/200. Then slides were incubated with DAPI and Vectashield Hard Set (H-1500, Vector), kept 15 min at 4°C to polymerize and visualized under microscope (Leica, France).

Protein Measurement, ELISA and Western Blot

Protein measurement was done using a BCA assay kit (Sigma, QuantiPro BCA assay kit ref QPBCA-1kt). Quantitative determination of EGF (Epithelial Growth Factor), SDF-1 (Stroma derived factor-1alpha) (R&D System), HGF (Fibroblast Growth Factor), KGF, IGF2, IGF1 (Insulin Growth Factor 1 and 2), IL11 and β FGF (UnLifeScience Inc, China) in plasma, supernatant or mucosae extracts were performed using ELISA, according to the manufacturer's recommendations. ELISA were performed on n=6 animals per group. Analysis of C-JUN phosphorylation was done using western blot. Eight micrograms of proteins from IEC 18 cell lysate (from 3 different IEC18 cultures loaded in triplicate) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis before transfer onto nitrocellulose membrane. Membranes were blotted with rabbit anti PHOSPHO-C-JUN (sc-16312-R; Santa Cruz) and anti C-JUN (sc-45; Santa Cruz) the primary antibodies diluted to 1/2000ème. Then the secondary antibody HRP conjugated (Amersham, France) directed against rabbit antigens were applied to the membrane diluted to 1/2000ème. Blots were developed using the enhanced chemiluminescence method (Millipore, France). Blot quantification was done with a BIORAD scanner (GS-800 calibrated densitometer) and Quantity One 4.5.2 software.

RNA Isolation, Reverse Transcription and Real-time PCR

Tissue and cell total RNA was prepared with RNeasy mini kit (Qiagen, France) and cDNA were obtained with the High Capacity Reverse Transcriptase cDNA kit (Applied Biosystems). Real-time quantitative PCR was performed using Taqman gene expression assays (Applied Biosystems). The samples (n=6 for each group) were loaded in duplicate and fold changes were calculated using $\Delta\Delta C_t$ normalizing to *gapdh*.

Statistical Analysis

Results are expressed as mean $\pm$ SEM (standard error of the mean). Results were compared between groups by a t-test or a one-way ANOVA followed by a Tukey test using Sigmatstat software (Systat Software Incorporation, GmbH, Erkrath, Germany). A value of $p \leq 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

Histopathologic analysis of colonic epithelia on human resections and rat tissues exposed to radiation.

Histologic examination of normal human mucosa revealed numerous organized crypts lining dense muscularis mucosa (Figure 1A,a). In the irradiated field, characteristic damage is observed, which can be separated into dystrophic and fibronectrotic zones. In dystrophic areas, mucosal lesions consist of atypical crypts and edema (Figure 1A,b). In fibronectrotic areas, crypts are almost completely absent and mucosa is replaced by intense inflammatory cell infiltrate (Figure 1A,c). Non-healing mucosal ulcers are usually associated with fibrosis, which affects the mucosa and sub-mucosa with dense extracellular matrix deposition (Figure 1A,d). In our experimental model of rats subjected to colorectal irradiation, histopathological lesions observed in the irradiated field were similar to those seen clinically. We observed apoptotic crypts and sub-mucosal edema one week after irradiation. At two weeks, we observed dystrophic zones or fibronectrotic zones. Substantial sub-mucosal edema was also visible (Figure 1B,b). Eight and 21 weeks after irradiation, fibronectrotic areas in mucosa and sub-mucosa were also observed (Figure 1B,c - 1B,d). While atypical crypts usually described as highly dividing cells could still be seen in the lamina propria and the sub-mucosa, there was a worsening of the lesion leading to transmural fibrosis associated with vascular sclerosis and dystrophy of the muscularis propria (Figure 1B,d).

MSC Engraft in Colonic Mucosa and Improve Endogenous MSC Mobilization into Blood

MSC were prepared from the bone marrow of green fluorescent protein (GFP)-transgenic SD rats, then verified for GFP expression and injected intravenously in immunocompetent SD rats immediately after colorectal irradiation. We analyzed MSC engraftment on colonic sections taken every 1500 μ m throughout the distal colon. Experiments revealed the presence of GFP cells in the sub-mucosa and in the mesentery, near the vessels, until one week after MSC injection (Figure 2A). However, GFP-MSC injected could not be detected after two weeks. We then tested the ability of MSC therapy to induce endogenous MSC mobilization in the blood. It has been previously described that endogenous MSC can be mobilized from storage organs into blood in response to tissue damage [17]. These MSC-mobilized cells could participate in tissue regeneration [18]. To quantify MSC frequency in peripheral blood, we used their ability to form colony forming unit-fibroblasts (CFU-F) in culture. The morphology of blood-derived CFU-F was similar to those obtained from bone marrow. Quantitative analysis showed a 2.5-fold ($p=0.011$) increase in the number of blood-derived CFU-F, three days after MSC treatment, in comparison to the irradiated group (Figure 2B). As CFU-F were GFP-negative, we can exclude the presence of injected cells in blood three days after the treatment. At the same time, we quantified the level of chemoattractant molecule SDF-1 α in plasma by ELISA. We detected 695.6 ± 57.9 pg/ml in the irradiated group and 1161.2 ± 91.1 pg/ml in irradiated and MSC treated group, i.e. a 1.7-fold ($p<0.05$) increase induced after MSC treatment. These results suggest that mobilization of endogenous MSC into the bloodstream induced by MSC-based therapy could be at least stimulated by the secretion of paracrine factor such as SDF-1 α .

MSC Therapy Decreases Radiation-induced Colonic Ulcers

Quantification of the therapeutic potential of MSC infusion on epithelial injury induced by ionizing radiation was analyzed on

histological sections using HES coloration. All analyses were performed in the irradiated field. 5×10^6 MSC were injected right after irradiation and results demonstrated statistically significant improvements in the epithelial injury score at one and two weeks of 16.05% ($p=0.022$) and 25.48% ($p=0.024$), respectively (Figure 3A). This therapeutic benefit is cell dose-dependent; the injection of lower number of MSC (1×10^6 and 0.1×10^6) displayed no significant benefit on the radiation-induced epithelial injury score and injection of higher number of MSC (10×10^6) did not further increase the benefit (data not shown). Within the ulcerated area, we observed a characteristic benefit of MSC therapy at two weeks with improvement of the compensatory re-epithelization process that originates in atypical crypts with actively dividing epithelial cells (Figure 3B). Newly-formed crypts are important for the epithelial regeneration process in the intestine and can be achieved through crypt branching (Figure 3C,a). While the underlying mechanisms of crypt branching are unknown, it has been suggested that crypt size is important in initiating this phenomenon. We used morphometric analysis to evaluate crypt depth and counted the number of crypt branching per transversal section located near the ulcerated zone. At two weeks, we observed increased crypt size in irradiated rats (363.07 ± 5.7 μ m) compared to controls (266.4 ± 2.9 μ m), which was even greater in the irradiated, MSC-treated group (475.91 ± 8.9 μ m). This crypt size increase is associated with a higher number of crypt branching which is substantially higher ($p<0.001$) in irradiated animals infused with MSC compared to irradiated animals not treated with MSC (Figure 3C,b). The number of crypts per transversal section was also higher ($p<0.001$) in the irradiated, MSC-treated group compared to the irradiated group (data not shown). After irradiation, we also observed at the margin of the ulcerated areas edematous areas where crypt structure was preserved. We reported functional parameter modifications in this zone, which are not observed after MSC treatment. Immunostaining experiments using anti β -catenin antibodies reveal a decrease in adherent junction protein expression after irradiation, while this level of expression is similar to the control after MSC treatment (Figure 3D). Furthermore, a radiation-induced reduction of goblet cell content (i.e. acid mucus stained in goblet cells with alcian blue) was not reported after MSC treatment (Figure 3E). Altogether, these results demonstrate that infused MSC reduce radiation-induced ulcers by improving the regenerative process not only in ulcerated areas but also in the ulcer margins.

MSC-secreted Molecules Increase the Number of Crypt Epithelial Cells: Involvement of the non-canonical WNT Pathways

To analyze paracrine mechanisms of MSC action and signaling pathway involvement in the re-epithelization process, we performed *in vitro* experiments using irradiated, non-transformed rat crypt epithelial cells (IEC-18) cultured or not with MSC-supernatant (SN-MSC). In our culture conditions, rat MSC express β FGF, HGF, KGF, IL11, *R-spondin*, *unt2*, 4, 5 and 11 molecules, factors described as facilitating intestinal mucosal repair. We also observed that SN-MSC increases the expression of β FGF, KGF, IL11 and *unt2* by IEC-18 (data not shown). After irradiation we observed a decrease of the number of IEC-18 ($2.9 \times 10^4 \pm 0.9$ for IEC-18 and $1.0 \times 10^4 \pm 0.1$ for irradiated IEC-18). We reported a 31.55% increase ($p<0.001$) in the number of irradiated IEC-18 in the presence of SN-MSC (Figure 4A). Blocking PI3-K, MEK or JAK signaling pathways decreases the number of irradiated IEC18 but does not significantly modify the MSC-induced benefit (Figure 4B). Although the three inhibitors were added at the same time to the culture medium, SN-MSC increases

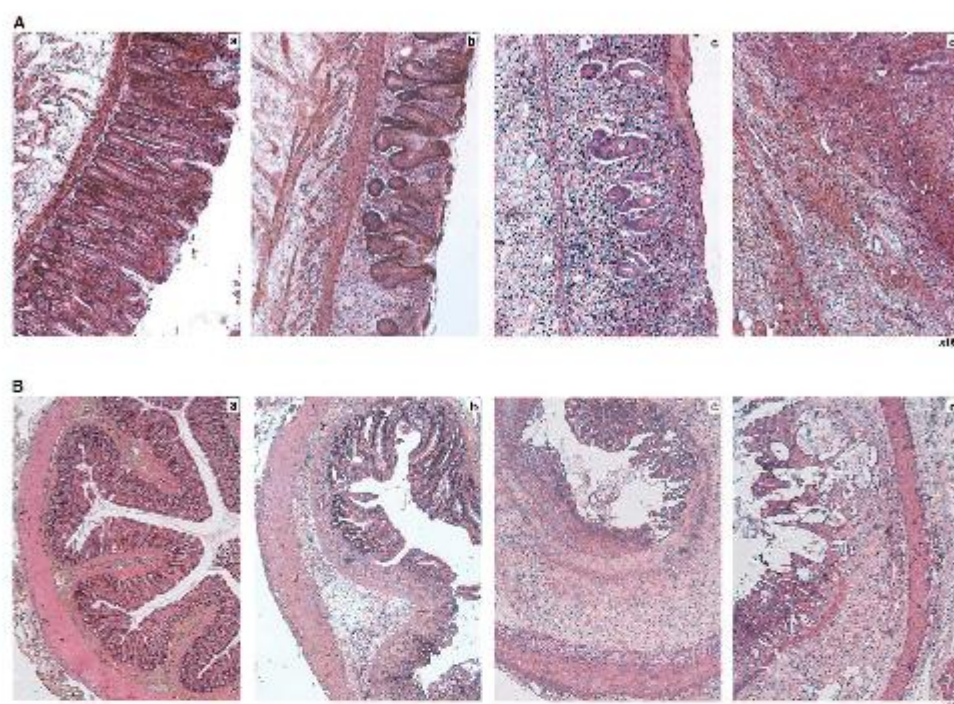


Figure 1. Characterization of radiation-induced colonic epithelium damage (A) Representative pictures of human colorectal lesions induced by preoperative radiotherapy (total of 45 Gy delivered in 2 Gy fractions) after 6 weeks in patients treated for adenocarcinoma. Colorectal tissues outside (a) or inside (b, c, d) of the irradiated zones. (B) Representative pictures of colorectal lesions induced in rats with 27Gy (single dose) of irradiation. (a) Control, (b) irradiation at 2, (c) 8 and (d) 21 weeks. Tissues are stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES). Pictures were taken on tissues located inside the irradiated field. Original magnification, x166. Colorectal irradiation leads to characteristic lesions that can be separated into dystrophic (A b and B b,c,d) and fibrotic zones (A c,d and B c,d).
doi:10.1371/journal.pone.0070170.g001

the number of irradiated IEC-18 (data not shown), demonstrating the non-redundant role of PI3-K, MEK and JAK pathways. Nevertheless, blocking WNT signaling pathways with CK1i cancelled out the benefit of SN-MSC (Figure 4B). The use of DKK1, which specifically blocks the canonical WNT pathway, did not affect the benefit of SN-MSC (Figure 4C). The canonical WNT pathway is dependent on the stabilization of β -catenin and its translocation to the nucleus. We validated the absence of this pathway involvement in analyzing β -catenin localization by means of immunofluorescence on irradiated IEC-18. As GSK3 inhibitor induces stabilization of intra-cellular β -catenin in irradiated IEC-18, incubation with SN-MSC maintains β -catenin localized to the cell membrane in irradiated IEC-18 (Figure 4D). Non-canonical WNT pathways are the planar cell polarity (PCP) pathway and the calcium-dependent pathway (WNT/ Ca^{2+}). Using specific inhibitors of these pathways, we demonstrated significant loss of the benefit provided by SN-MSC (Fig. 4C). Downstream signaling of non-canonical pathways induces cJUN phosphorylation. Western blotting analysis revealed an increase ($p < 0.05$) of cJUN phosphorylation in irradiated IEC-18 after SN-MSC incubation (Figure 4E). These *in vitro* results demonstrate that

MSC, via paracrine mechanisms, increase the number of crypt epithelial cells through the non-canonical WNT pathways.

After Colorectal Irradiation, MSC Therapy Induces the Proliferation of Crypt Epithelial Cells and Increases WNT4 Expression by Epithelial Cells

Epithelial proliferation was assessed by counting PCNA-positive cells per total cells of the crypt on sections of the colon adjacent to the ulcer. Two weeks after irradiation, the number of proliferating cells decreased compared to the control group. At this time, the increased proliferation observed in the irradiated and MSC-treated group compared to the irradiated group is 32.1% (Figure 5A and B). We also demonstrated through gene expression analysis in irradiated colonic mucosa that MSC treatment increases *sox9* and *set* ISC markers (Figure 5C). Immunohistochemistry analyses using the SOX9 marker (Figure 5D) enabled us to distinguish low-expressing cells (described as transit-amplifying progenitor cell zone) and high-expressing cells (described as cells with stemness characteristics). As already demonstrated in the colon [5] we found a majority of proliferating cells that also express SOX9 at the bottom of the crypt. One and two weeks after

MSC Therapy Stimulates Host Tissue Regeneration

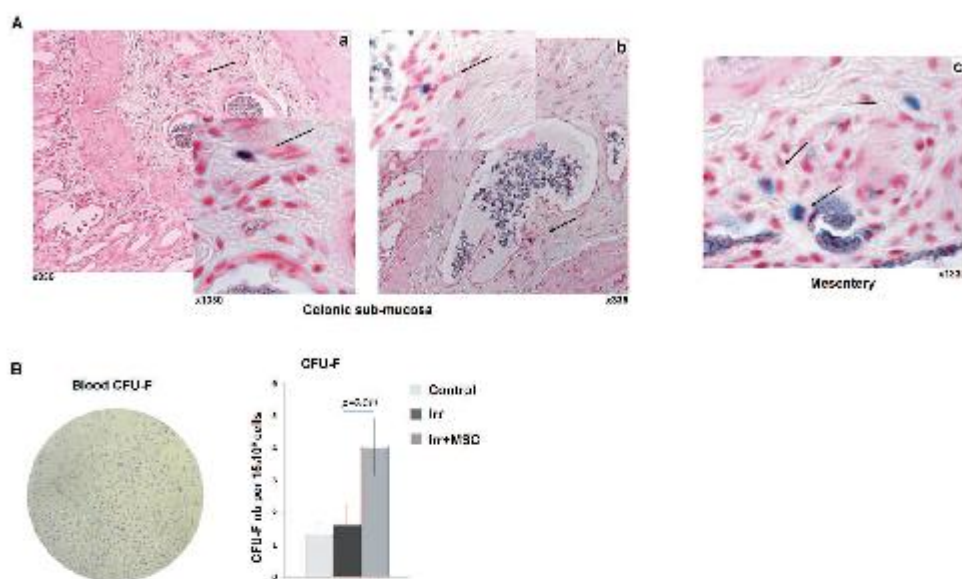


Figure 2. MSC engraft in colonic mucosa and improve endogenous MSC mobilization into blood. (A) Intravenous injected MSC engraft in the colon. Detection of GFP-MSC (black arrow) in irradiated (a, b) colonic sub-mucosa or (c) mesentery, 1 week after injection using GFP-specific antibodies. Original magnification, x335 and x1330. (B) Mobilization of endogenous MSC in blood induced by MSC treatment. Representative picture of MSC morphology in blood CFU-F and quantification of CFU-F number per 15×10^6 plated cells. MSC treatment increases the number of blood-derived CFU-F ($n = 11$ for each group). Results are expressed as mean $\pm$ SEM and compared between groups by one-way ANOVA followed by a Tukey test. doi:10.1371/journal.pone.0070170.g002

irradiation, we observed a decrease in SOX9+ cell numbers. The reduction is moderate for SOX9-low cells and drastic for SOX9-high cells. MSC treatment in irradiated rats increases the number of SOX9-low cells compared to values obtained in irradiated animals (x1.44 at one week ($p < 0.001$) and x1.48 at two weeks ($p < 0.001$)). MSC treatment also limits radiation-induced reduction of the number of SOX9-high cells and the major effect ($p < 0.001$) is detected at two weeks (x4.5 in irradiated and MSC treated rats *versus* irradiated rats). To evaluate molecules involved in crypt-cell proliferation, we performed *in vivo* analysis of growth factor secretion (EGF, bFGF, IGF1/2, KGF and IL11), *r-spondin* and *wnt* gene expression (*wnt2*, 3, 4, 5, 6 and 11) on colonic mucosa (Figure 6 A, B). Except for *wnt4* gene expression, results do not show differences between irradiated and irradiated MSC-treated animals, in accordance with our *in vitro* findings. Quantification of *wnt4* expression using RT-PCR demonstrated an increase in its expression after irradiation by 2-fold, and an even higher increase by 4-fold ($p = 0.003$) after irradiation and MSC treatment (Figure 6B). This result was confirmed at the protein level by WNT4 immunostaining on colonic slides (Figure 6C). We observed that the number of epithelial cells expressing WNT4 increased after irradiation and increased even more after MSC treatment (Figure 6C). Our results demonstrate MSC's *in vivo* ability to maintain regenerative properties by stimulation of proliferating colonic epithelial cells. This effect might be potentiated by epithelial cell autocrine secretion of the non-canonical WNT4 factor.

Analysis of the Therapeutic Efficacy of MSC on Established Radiation-Induced Damage

Three weeks after irradiation (as already described for two weeks) glandular recovering (atypical crypt regeneration) alternates with profound ulcerated areas. Iterative injections of MSC starting at this time increase ($p = 0.005$) animal survival (Figure 7A). Colonic lesions were also studied by endoscopy. Representative pictures are presented in Figure 7B. We observed profound ulcerated areas with white necrotic tissues in irradiated rats. Hemorrhages and petechial vessels were also observed in numerous irradiated animals. In MSC-treated rats, deep necrotic areas were less extensive and hemorrhages were less pronounced but petechial vessels were still observed. Scoring of lesions on HES slides demonstrated significant muscular and vascular improvement at eight and twenty-one weeks, respectively. The localized irradiation delivered to the colon induces a significant score of fibrosis and serosa thickening at eight and twenty-one weeks. This method of scoring did not enable us to highlight statistical improvement of these parameters by MSC treatment. However, we observed mucosal improvement at both times following MSC treatment (Figure 7C, D). Mucosal scoring includes epithelial atypia, re-epithelization ability. All of these criteria were significantly improved in the MSC-treated group compared to the non-treated group. As previously studied in a preventive protocol, we counted PCNA-positive cells per total cells of the crypt, on sections located at the margin of the ulcer. We demonstrated that iterative injections of MSC on established radiation-induced lesions restore

MSC Therapy Stimulates Host Tissue Regeneration

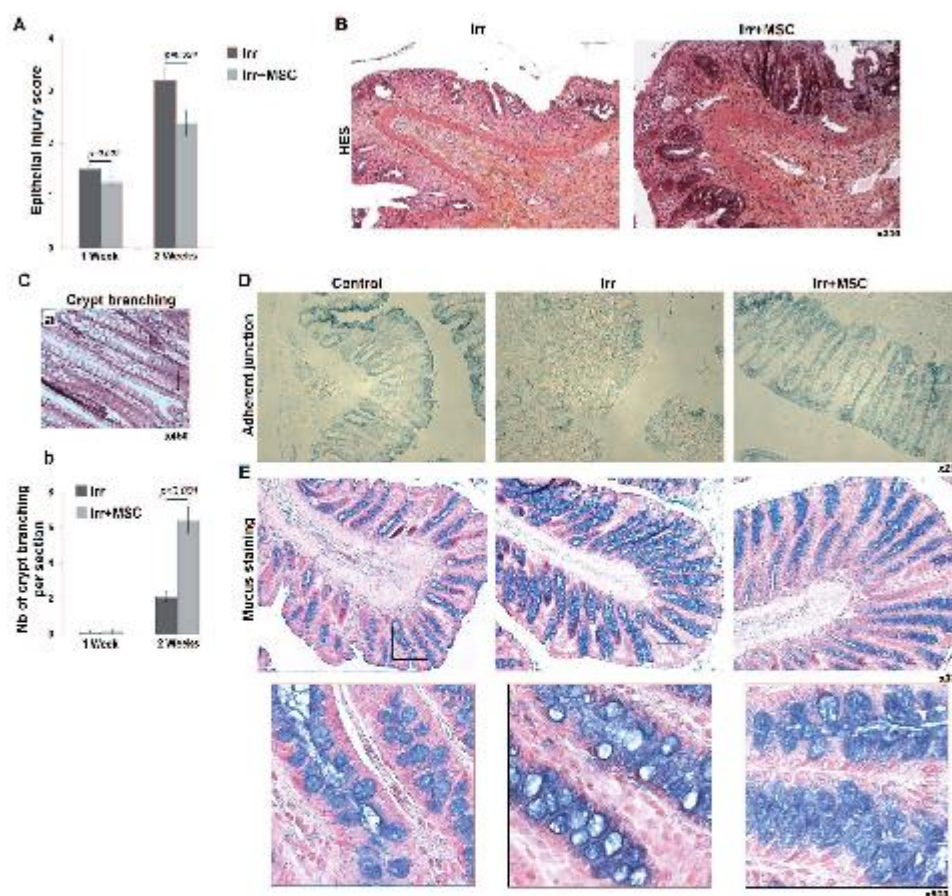


Figure 3. MSC treatment reduces colonic epithelial lesions. (A) Epithelial injury score. (B) Representative histological pictures of atypical crypts 2 weeks after irradiation and irradiation combined with MSC treatment in the ulcerated zone. Original magnification, $\times 330$. (C) MSC therapy increases the number of crypt branching per circular section 2 weeks after irradiation. In A and C results are expressed as mean $\pm$ SEM and compared between groups by t-test. (D) Representative pictures of adherent junction staining by immunohistochemistry using anti- β -catenin antibodies (blue staining without counterstaining, original magnification, $\times 250$) and (E) mucus staining by alcian blue coloration 2 weeks after irradiation in the healthy margins of the colon. Original magnification, $\times 330$ and $\times 900$. Functional parameter modifications of the colonic epithelium induced by irradiation were not observed after MSC treatment. All analyses were performed on tissues located inside the irradiated field. In all experiments $n = 8$ for each group.

doi:10.1371/journal.pone.0070170.g003

the ability of crypt epithelial cells to proliferate, which is impaired eight weeks after irradiation (Figure 8A). This result is correlated with an increase of SOX9-high expressing epithelial cells in MSC-treated animals compare to irradiated animals (Figure 8B). We also evaluated WNT4 molecule expression in colic mucosa at the margin of the ulcer by immunohistochemistry (Figure 8C). The number of WNT4 expressing epithelial cells per crypt was counted and results show that WNT4 molecule expression is boosted in irradiated animals treated by MSC. These results cannot demonstrate reversion of fibronectin induced by radiation.

Nevertheless, MSC treatment induces a therapeutic benefit on the colonic epithelium by reducing established ulceration through the stimulation of the regenerative process from ulcer margins.

Discussion

The present findings demonstrate that a single dose of colorectal irradiation induces colonic epithelial alterations. In this irradiation methodology, other organs located close to the colon, like the bladder, the prostate or seminal vesicles may be in the irradiated

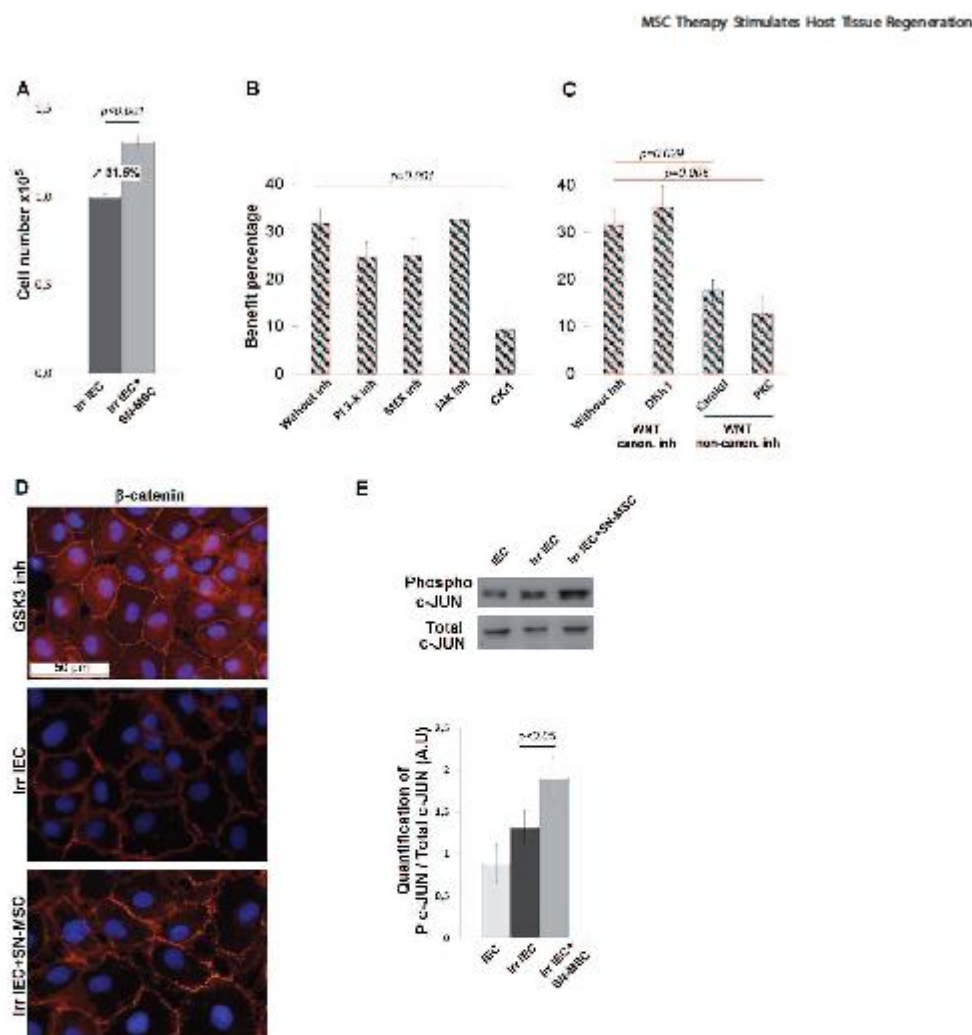


Figure 4. In vitro analysis of paracrine mechanisms of MSC action. (A) MSC supernatant increases the number of IEC-18 after irradiation. Data are the mean of 9 independent experiments performed in triplicate. (B) Inhibition of AKT (Ly294002), MEK (PD-98059), JAK1 and WNT (CK1) signaling pathways using specific blocking agents. (C) Inhibition of the canonical (DKK1) and non-canonical (KN-93 and B031-8220) WNT pathways. Results are expressed as percentage of MSC benefit (irradiated/irradiated with SN-MSC $\times 100$). In A, B and C results are expressed as mean $\pm$ SEM and compared between groups by t-test. (D) Representative immunofluorescence experiment to visualize β -catenin nuclear translocation in irradiated IEC-18. (E) Representative western blot using antibodies against phosphorylated c-JUN or total c-JUN. The ratio of phosphorylated c-JUN/total c-JUN analyzed on irradiated IEC18 is increased after SN-MSC incubation. Results are expressed as mean $\pm$ SEM of 4 independent experiments and compared between groups by one-way ANOVA followed by a Tukey test.

doi:10.1371/journal.pone.0070170.g004

field. Irradiation of these organs might induce time-dependent tissue damage such as what has already been described for the bladder [19–21]. Physiological cross-talk between different visceral organs is necessary to function in a coordinated manner [22]. The pathology of one visceral organ increases the inflammatory process in other organs and the development of cross-organ sensitization

in the pelvis leading to functioning alterations [23]. Direct radiation effects on various organs associated with cross-organ sensitization might be at the origin of a worsening of colonic pathology. In our model, radiation toxicity leads to severe chronic mucosal ulceration and fibrosis. In previous studies performed using the same model, we showed that, in addition to colonic

MSC Therapy Stimulates Host Tissue Regeneration

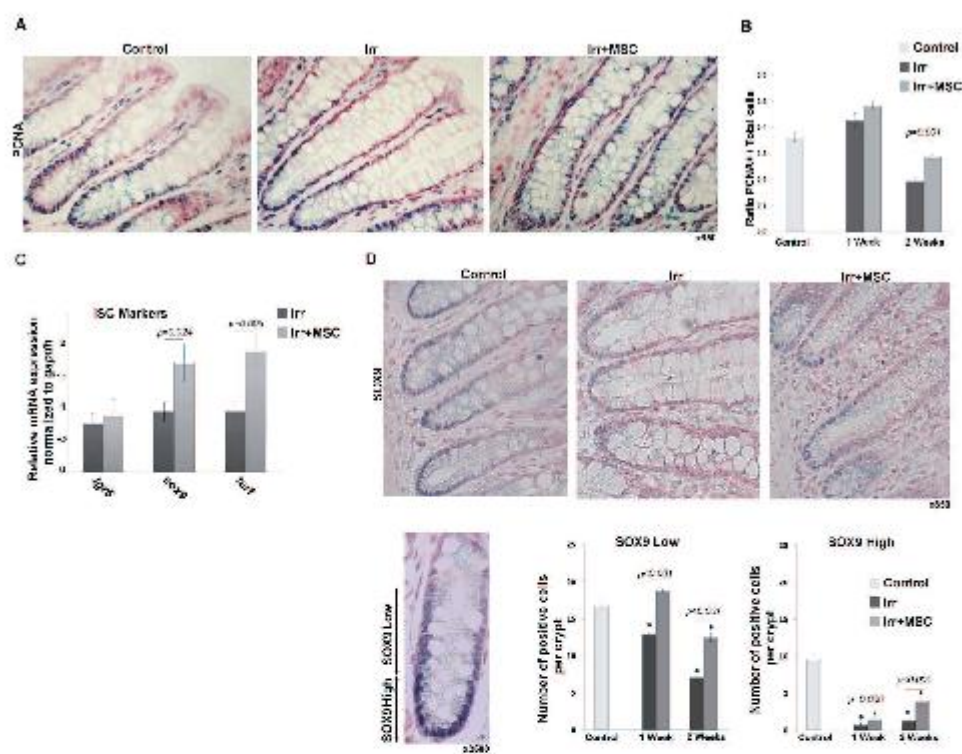


Figure 5. MSC treatment stimulates epithelial proliferation and increases the number of Sox9-high positive progenitor/stem cells. (A) *In vivo* analyses of epithelial proliferation. Representative pictures of PCNA immunostaining (blue staining) 2 weeks after irradiation. Original magnification, x650. (B) Quantification of PCNA-positive cells per total number of crypt cells. Data were compared between groups by one-way ANOVA followed by a Tukey test. (C) Relative mRNA expression of ISC markers in colonic mucosa of irradiated and irradiated MSC-treated rats. Results were normalized to gapdh housekeeping gene and standardized to control level (control expression = 1). Comparison between groups was evaluated by t-test. (D) Representative pictures of SOX9 immunostaining (blue staining) 2 weeks after irradiation. Original magnification, x850. Variation of SOX9 expression levels in rat colonic crypt and quantification of SOX9-low and SOX9-high-expressing cells by crypt. All analyses were performed on tissues located inside the irradiated field. Results were compared between groups by one-way ANOVA followed by a Tukey test. * $p < 0.001$ versus control groups. In B no statistically differences were observed between 1 week and 2 weeks control groups, thus control groups were pooled. In A, B and D experiments $n = 8$ for each group. In C experiments $n = 6$ for each group. doi:10.1371/journal.pone.0070170.g005

epithelial fibrosis, irradiation also induces inflammatory processes and vascular damage [24,25]. These lesions seem to be similar to those observed in patients subjected to pre-operative radiotherapy. Using this model we demonstrated the therapeutic benefit of MSC on radiation-induced severe epithelial colonic ulceration. The therapeutic efficacy of MSC was observed at all stages of lesion development (i.e. in established or non-established lesions) at the time of cell treatment. This could be explained by the capacity of MSC to stimulate the regenerative process, which is initiated after irradiation but at a low level and with little efficacy. In all experimental protocols used in this study, we provided evidence that MSC therapy maintains the proliferative ability of epithelial cells positive for the SOX9 progenitor/stem cells marker, which are located in the ulcer margins. MSC treatment therefore improves colonic epithelium renewal. Our study postulates that

MSC could act through paracrine mechanisms in which WNT4 might play a role in the stimulation of the regenerative process. This study constitutes a first approach to being able to argue in favor of the use of MSC in order to reduce irreversible, radiation-induced colonic ulceration.

MSC-mediated secretion of a broad range of bioactive molecules induces more significant biological effects than their ability to differentiate [26]. As already demonstrated by Lee et al, [27], in our model we also observed a high number of injected MSC trapped in the lung initially and until three days after their injection (data not shown). Lung-trapped MSC have been reported to improve myocardial infarction through the abscopal effect [27]. Such a mechanism could also be responsible for the initial benefit induced by MSC on colonic epithelial regeneration. In addition to the presence of MSC in the lung, we also observed

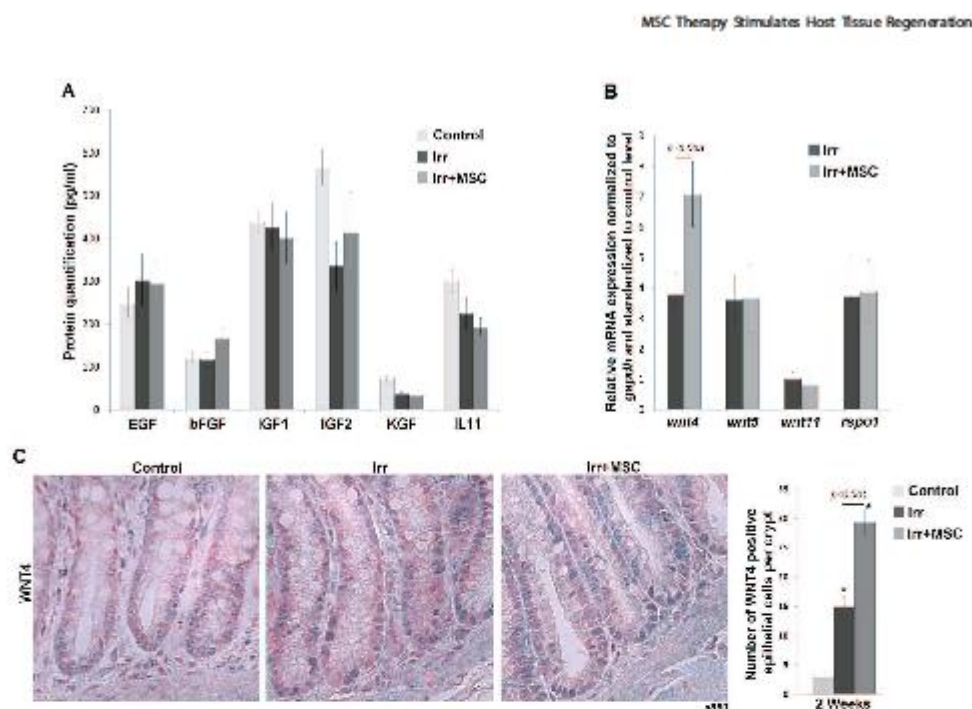


Figure 6. *In vivo* expression of molecular factors involved in the proliferation of epithelial cells 2 weeks after irradiation. Total proteins and RNA were extracted from irradiated colonic mucosa of different groups and analyzed by (A) ELISA or (B) RT-PCR, respectively. Relative mRNA expression of *wnt*-related genes were normalized to *gapdh* housekeeping gene and standardized to control level (control expression = 1). Expression of *wnt*-1, 2 and 3 was not detected in any of the 3 groups. *Wnt4* expression increased by 2-fold after irradiation and 4-fold after irradiation and MSC treatment. Results were compared using t-test. (C) Representative pictures of WNT4 immunostaining (blue staining, original magnification, x850) and quantification of the number of WNT4 expressing epithelial cells per crypt 2 weeks after irradiation. WNT4 immunostaining in epithelial cells increased after irradiation and increased even more after MSC treatment. Results were compared between groups by one-way ANOVA followed by a Tukey test. * $p < 0.001$ versus control groups. In A, B, and C experiments $n = 6$ for each group. doi:10.1371/journal.pone.0070170.g006

transient engraftment of these cells in irradiated mucosa. Accumulation of evidence shows that MSC are also able to migrate into irradiated tissues after intravenous delivery [28]. It has been hypothesized that MSC will engraft in tissue through the same mechanism as leukocytes. Many of the molecules involved in the tethering, rolling, adhesion and transmigration of leukocytes from the bloodstream into the tissue are known to be expressed on MSC [29]. However, colorectal irradiation leads to a local inflammatory environment that is unfavorable to the survival of MSC. Thus, the secretion of regenerative factors by MSC engrafted in the colon was probably followed by their rapid removal. This could explain the common difficulty in highlighting MSC engraftment in damaged tissues. We also observed that MSC therapy increases plasmatic SDF-1 α and demonstrated an increase of endogenous circulating MSC. SDF-1 α plays an important role in the mobilization of MSC by down-regulating adhesion molecules that hold them in their niche [30]. Our study thus supports the idea that MSC therapy using secreted factors could enhance the pool of endogenous MSC by mobilizing them from organ storage. This endogenous MSC mobilization could indirectly ensure the continuation of tissue regeneration even if injected cells are partially lost. Mobilization of endogenous MSC

to promote tissue repair has already been reported after tissue damage [17,18] but never after MSC therapy, as was demonstrated in this study.

The intestinal epithelium undergoes rapid, continuous homeostatic renewal. Upon injury, the integrity of the intestinal mucosal surface is rapidly re-established because of the epithelium's powerful regenerative capability. The ability of the host to respond to intestinal injury requires a highly orchestrated response involving migration, proliferation and differentiation of the epithelial cells from the ISCs. Our study demonstrates that radiation-induced reduction of colonic epithelial cells with progenitor or stemness characteristics (SOX9+) is limited by MSC therapy. MSC treatment of irradiated animals transiently maintains a basal number of SOX9-low cells (at one week) and also increases the SOX9-high cells, which are substantially reduced after irradiation. These effects are associated with an increase in the number of proliferating cells in the colon crypt. Recent studies have demonstrated that following *lgr5*-cell depletion (that are also SOX9-high) as a result of genetic mutation or irradiation, the number of slow-cycling cells (SOX9-low) increases, giving rise to *lgr5*-expressing cells [6–9]. Moreover, during the regenerative process following irradiation, SOX9-low slow-cycling

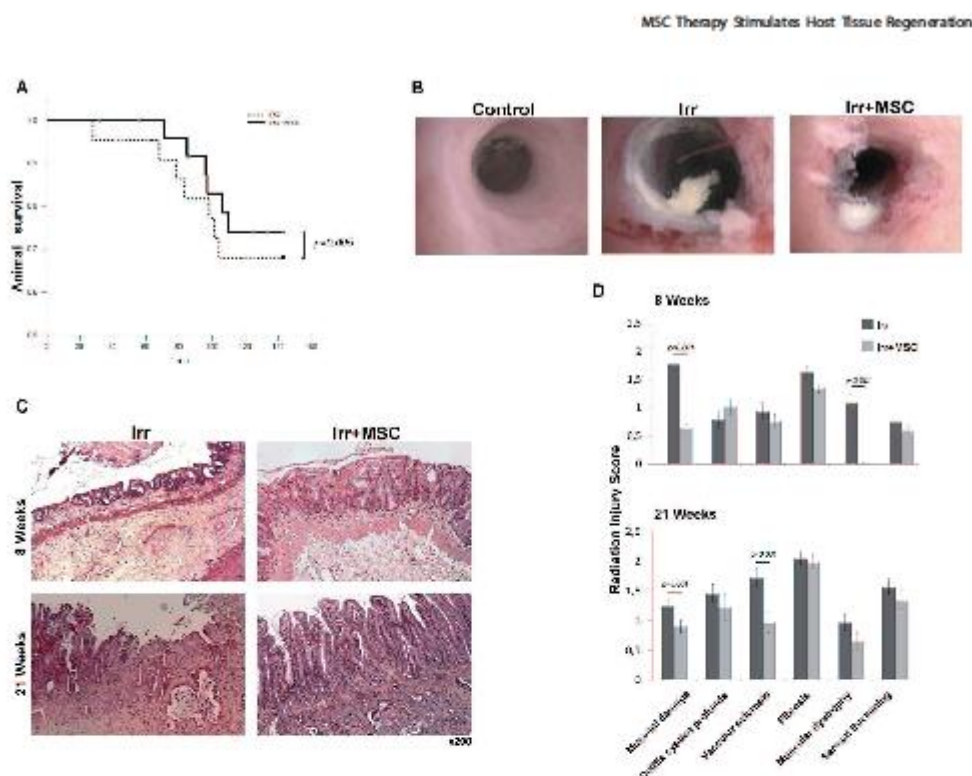


Figure 7. Therapeutic benefit of iterative injections of MSC on established colon damage induced by ionizing radiation (first injection performed 3 weeks after irradiation, then every 2 weeks). (A) Comparison of animal survival between irradiated ($n = 25$) and irradiated, MSC-treated group ($n = 20$); p value determined by log RANK test. (B) Representative endoscopy pictures 18 weeks after irradiation ($n = 5$ for each group). Profound ulcerative area with white necrotic tissue is observed in irradiated animals. In MSC-treated rats deep necrotic areas are less extensive. (C) Representative epithelial damage visualized by HES coloration 8 and 21 weeks after irradiation. Analyses were performed on tissues located inside the irradiated field. (D) Original magnification, $\times 200$ (D) Radiation injury score 8 and 21 weeks after irradiation ($n = 6$ for each group). Data were compared by t -test.

doi:10.1371/journal.pone.0070170.g007

cells acquire an *in vivo* proliferative potential and exhibit the ability to form organoids *in vitro*, whereas the same non-irradiated subset failed [9]. Altogether, results from various studies suggest that crypt regeneration involves the activation of a subset of low-proliferating cells that can adopt or dedifferentiate into a "stem cell-like" state [31] with a high proliferation capacity. Our results are in accordance with this concept and seem to demonstrate that after radiation injury, MSC therapy might improve this process.

As previously described for bone marrow hematopoietic stem cells [32], MSC might be an essential component of the intestinal epithelial stem cell niche, providing an optimal microenvironment for stem cell function. Mesenchymal-epithelial paracrine interactions involved in ISC maintenance and activation depend on a large array of signaling molecules. The WNT glycoprotein family is expressed specifically in the mesenchymal and epithelial compartments in the adult intestine [33] and the WNT pathways have emerged as a key regulator of maintaining epithelial homeostasis [34]. Our data support the assumption that MSC efficacy on the regenerative process of colonic epithelium after its irradiation may involve WNT signaling pathway activation

through mesenchymal-epithelial paracrine interactions. The WNT glycoprotein family is a highly conserved ligand that acts through the canonical (WNT1, 2 and 3) or non-canonical (WNT4, 5a, 6 and 11) signaling pathways. Our *in vivo* experiments show that the inhibition of the canonical WNT pathway by DKK1 does not modify the increase of epithelial cells number induced by SN-MSC. Moreover, we observed that SN-MSC does not induce β -catenin nuclear translocation in colonic epithelial cells, usually observed after canonical WNT pathway activation. We can thus exclude the involvement of the canonical WNT pathway in MSC's ability to induce epithelial proliferation in a context of radiation-induced alteration. Involvement of the WNT canonical pathway in epithelial proliferation along the gastrointestinal tract is controversial [35,36]. Such discrepancies could be explained by the differential responsiveness of segments of the digestive tract to canonical WNT agonists/antagonists or to the relative abundance of WNT agonists in the colon [33]. This observation is in accordance to our results. Except for *r-spondin*, we cannot demonstrate the expression of the *anti-canonical* gene in rat colonic mucosa. We clearly show *in vivo* an involvement of non-

MSC Therapy Stimulates Host Tissue Regeneration

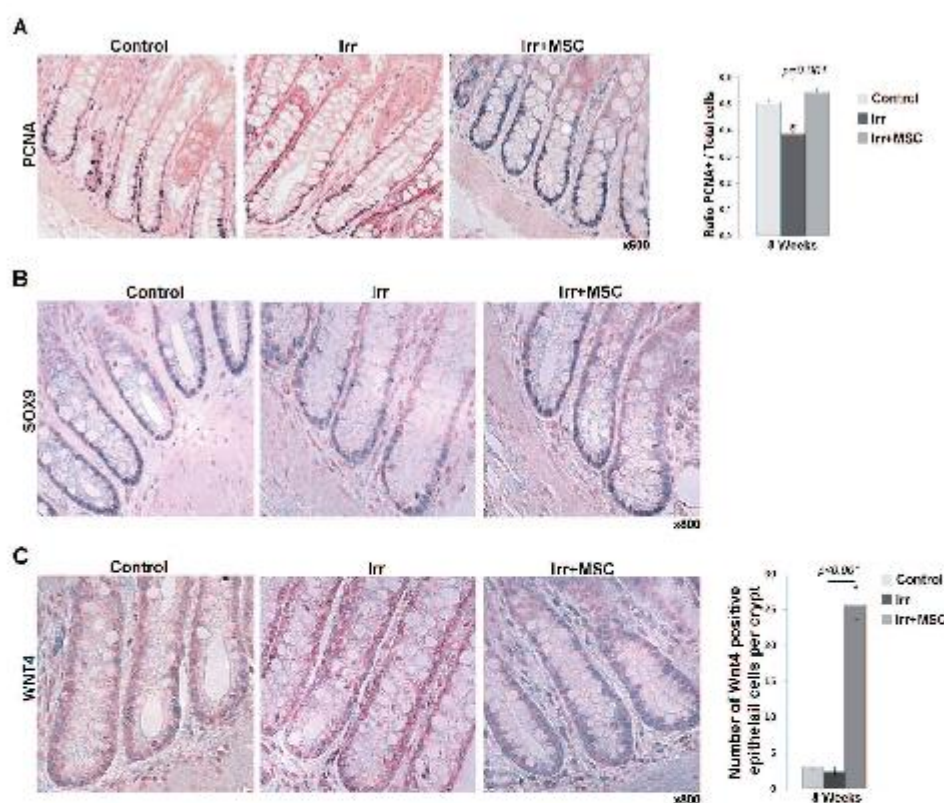


Figure 8. Iterative injection of MSC on established radiation-induced colic ulcer increases the ability of epithelial cells to proliferate. This effect is associated with an increase in SOX9 positive cells and a boosted WNT4 molecule expression by epithelial cells. (A) Representative pictures of PCNA immunostaining (blue staining) 8 weeks after irradiation and quantification of PCNA-positive cells per total number of crypt cells. Original magnification, x600. Irradiation reduces the proliferative ability of epithelial cells while the proliferative process is maintained at a basal level after MSC treatment. (B) Representative SOX9 immunostaining 8 weeks after irradiation. Irradiation drastically reduces the number of SOX9-high cells that are restored after MSC treatment. (C) Representative pictures of WNT4 immunostaining in colonic mucosa and quantification of the number of WNT4 expressing epithelial cells per crypt. Eight weeks after irradiation, WNT4 expression was not different from controls in all analyzed rats, while WNT4 expression in colonic mucosa of MSC treated rats was higher than in the control group. All analyses were performed on tissues located inside the irradiated field. In all experiments $n=6$ for each group. Results were compared between groups by one-way ANOVA followed by a Tukey test. * $p<0.001$ versus control groups. Original magnification, x800. doi:10.1371/journal.pone.0070170.g008

canonical WNT pathways in SN-MSC ability to increase epithelial cells and our results also suggest an autocrine regulation of the epithelial cells through WNT4 secretion. Our *in vivo* study points in the same direction. We thus demonstrated that after irradiation, MSC treatment stimulates epithelial proliferation and increases the number of SOX9-high positive cells associated with an increase in WNT4 expression by colonic epithelial cells. Altogether, these data support the involvement of the non-canonical WNT4 pathway in the ability of MSC to increase progenitor/stem cell activation and therefore to favor the epithelial regenerative process of the colon after radiation-induced epithelium ulceration. In regenerative medicine, it also been demonstrated in a hindlimb ischemia model that MSC-secreted WNT4, which increases with

hypoxia, plays an essential role in vascular and skeletal muscle fiber regeneration [37]. Another study also demonstrated that MSC genetically engineered to express WNT4, enhance osteogenesis and improve the repair of craniofacial defects [38].

Canonical and non-canonical WNT pathways act via FRIZZLED family receptors and it has been demonstrated that LGR5 (R-SPONDIN receptor) associate with FRIZZLED in β -catenin signaling [39], reinforcing the notion that WNT signaling and stem cell biology are closely related [40]. Moreover, LGR5 can also act through the non-canonical signaling pathways depending on the availability of molecules [41]. In the colon, SOX9-high positive cells are also LGR5 [5]. However, we were not able to set up LGR5 immunostaining in rat colons to confirm this

observation. In our model, R-SPONDIN (ligand of LGR5) is expressed in the colonic mucosa but its expression is not modified after MSC treatment. However, we cannot exclude the synergy of R-SPONDIN and WNT molecules in inducing non-canonical signaling and ISC proliferation [40,41].

Although various drugs have been already been clinically tested to reduce "pelvic radiation disease", no agents have been identified that are able to prevent or reduce intestinal radiation toxicity, which is the most important dose-limiting factor during pelvic radiotherapy [10]. This study provides evidence for the potential of MSC therapy to limit the effects of radiation on the colon through enhancement of the regenerative process. A specific feature of "pelvic radiation disease" is that other organs such as the bladder may also be altered in the long term, leading to intensified side effects [1]. In this case, MSC treatment provides a significant therapeutic advantage since its use in regenerative medicine for the restoration of many organs (bladder, liver, kidney, etc.) has been widely described [12,13].

The therapeutic efficacy induced by MSC might require boosted proliferation of epithelial cells, including some that are in the field of irradiation. The stimulation of these irradiated cells might lead over time to malignancies. Moreover, MSC also might enhance the growth of pre-existing cancer. Studies analyzing MSC's effects on tumorigenesis in different models had mixed and controversial results. Additional studies are underway in our laboratory to study MSC side effects in a rat colorectal adenoma model after tumor reduction by radiation. This complementary work is needed to offer new therapeutic perspectives for the treatment of patients suffering from late-onset damage induced by pelvic radiotherapy.

References

- Andreyev HJ, Wotherpoon A, Denham JW, Hauer-Jensen M (2010) Defining pelvic-radiation disease for the survivorship era. *Lancet Oncol* 11(4): p.310–2.
- Henson C (2010) Chronic radiation proctitis: issues surrounding delayed bowel dysfunction post-pelvic radiotherapy and an update on medical treatment. *Therap Adv Gastroenterol* 3(6): p.359–65.
- Sato T, Wiersma RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, et al. (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459(7244): p.262–5.
- Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Maizumi T, et al. (2012) Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5(+) stem cell. *Nat Med* 18(4): p.618–25.
- Ramalingam S, Daughtridge GW, Johnston MJ, Gracz AD, Magnus ST (2012) Distinct levels of Sox9 expression mark colon epithelial stem cells that form colonoids in culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302(1): p. G10–20.
- Yan KS, Chia LA, Li X, Ootani A, Su J, et al. (2012) The intestinal stem cell marker Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(2): p.466–71.
- Tian H, Biehs B, Warming S, Leong KG, Rangell L, et al. (2011) A naive stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* 478(7368): p.255–9.
- Montgomery RK, Catone DL, Richmond CA, Farilla L, Kranendonk ME, et al. (2011) Mouse telomerase reverse transcriptase (nTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(1): p.179–84.
- Van Landuyt L, Santoro MA, Krebs AE, Mah AT, Dehmer JJ, et al. (2012) Activation of two distinct Sox9-BGFP-expressing intestinal stem cell populations during crypt regeneration after irradiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302(10): p. G111–22.
- Beber M and Hauer-Jensen M (2012) Novel drugs to ameliorate gastrointestinal normal tissue radiation toxicity in clinical practice: what is emerging from the laboratory? *Curr Opin Support Palliat Care* 6(1): p.54–9.
- Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Bacher D, and Delgado M (2009) Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 136(5): p.978–89.
- Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Githenstrom C, Hassan M, et al. (2004) Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363(9419): p.1439–44.
- Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, et al. (2009) Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* 52(1): p.79–86.
- Tarte K, Gaillard J, Latallade JJ, Rualberd L, Becker M, et al. (2010) Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood* 115(8): p. 1549–53.
- Guadalupe H, Herreros D, De-La-Quintana P, Tenbol J, Garcia-Arreaza M, et al. (2012) Long-term follow-up of patients undergoing adipose-derived adult stem cell administration to treat complex perianal fistulas. *Int J Colorectal Dis* 27(3): p.595–600.
- Gorny O, Benderitter M, Linaut C (2008) Acute and persisting T82-like immune response after fractionated colorectal gamma-irradiation. *World Journal of Gastroenterology*.
- Rocheffort GV, Delorme B, Lopez A, Helms O, Bonnet P, et al. (2006) Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells* 24(10): p.2202–2208.
- Maciella E, Marin GH, Drago H, Searla F, Salas E, et al. (2006) Bone marrow cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplant Proc* 38(3): p.967–9.
- Burdello LM, Costa WS, Medeiros JL Jr., Rocha RR, Sampaio FJ, et al. (2013) Protective effects of L-glutamine on the bladder wall of rats submitted to pelvic radiation. *Micron* 47: p.18–23.
- Jast J and Dorr W. (2006) Radiation-induced damage to mouse urothelial barrier. *Radiation Oncol* 1(2): p.250–6.
- Dinchev FO, Okrus DC, Axeler B, Aling T, Ikon S, et al. (2009) The role of amifostine on late normal tissue damage induced by pelvic radiotherapy with concomitant gemcitabine: an in vivo study. *Med Oncol* 26(4): p.402–8.
- Basinski C, Fuller E, Brizendine EJ, Benson JT (2003) Bladder and reflex. *Neurourol Urodyn* 22(7): p.683–6.
- Malykhina AP, Wyndale JJ, Anderson KE, De Wachter S, Demchowski RR (2012) Do the urinary bladder and large bowel intestines, in sickness or in health? ICI-RS 2011. *Neurourol Urodyn* 31(3): p.332–8.
- Julien N, Birmado K, Millet F, Sabourin JC, Benderitter M, et al. (2009) Up-regulation of endothelin type A receptor in human and rat radiation proctitis: preclinical therapeutic approach with endothelin receptor blockade. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 74(2): p.528–38.
- Birmado K, Millet F, Matelly I, Sabourin JC, Benderitter M, et al. (2011) Mast cells are an essential component of human radiation proctitis and contribute to experimental colorectal damage in mice. *Am J Pathol* 178(2): p.640–51.
- Meirelles Lda S, Fontes AM, Sousa DT, Caplan AI (2009) Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 20(5–6): p.419–27.

Conclusions

During radiotherapy protocol, healthy tissue located near the tumor can be affected by ionizing radiation leading to severe tissue damage. In this study, we demonstrated that MSC therapy reduces irreversible radiation-induced colonic ulcers and proposed mechanisms of therapeutic efficacy. MSC engraft in lung and colonic mucosa also mobilize endogenous MSC that could have lasting benefits over time. This new insight of MSC action is of major interest and further investigations are necessary to test the mobilization of other progenitor cells. We also demonstrated that MSC therapy stimulates proliferation and growth factor secretion of colonic epithelial cells positive for SOX9 progenitor/stem cell markers. Therefore, the therapeutic benefit of stem cell therapy using MSC is induced by stimulating endogenous host progenitor cells to improve the regenerative process.

Acknowledgments

The authors are grateful to Pr C. Sabourin for giving them human tissue and Dr A. François and F. Millet for their help concerning human histologic analysis. The authors also thank GSEA of the IRSN for technical assistance with animals.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AS CD RB CD MB NM. Performed the experiments: AS CD RB CD MB NM. Analyzed the data: AS CD RB CD MB NM. Contributed reagents/materials/analysis tools: AS CD RB CD MB NM. Wrote the paper: AS CD RB CD MB NM.

MSC Therapy Stimulates Host Tissue Regeneration

27. Lee RH, Palini AA, Seo MJ, Kota DJ, Vlodavsky J, et al. (2009) Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 5(1): p.54–63.
28. Francois S, Bensidhoum M, Moujalledine M, Maurier C, Allenet B, et al. (2006) Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells* 24(4): p.1020–9.
29. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J (2007) Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25(11): p.2739–49.
30. Liu ZJ, Zhang Y, Velazquez OC (2009) Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 106(6): p.984–91.
31. Zippori D (2004) The nature of stem cells: state rather than entity. *Nat Rev Genet* 5(11): p.873–8.
32. Moon KA and Lemischka IR, (2006) Stem cells and their niches. *Science* 311(5769): p.1890–5.
33. Gengnotte A, Pinto D, Beghel H, Destree O, Kiehn M, et al. (2005) Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* 129(2): p.626–38.
34. Wodarz A, Nume R. (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: p.59–88.
35. Bhanja P, Saha S, Kabaciri R, Liu L, Roy-Chowdhury N, et al. (2009) Protective role of R-spondin1, an intestinal stem cell growth factor, against radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice. *PLoS One* 4(11): p. e8014.
36. Koch S, Nava P, Addis C, Kim W, Denning TL, et al. (2011) The Wnt antagonist Dickkopf regulates intestinal epithelial homeostasis and wound repair. *Gastroenterology* 141(1): p.259–68, 268 e1–8.
37. Leroux I, Descamps B, Tojais NF, Seguy B, Oum P, et al. (2010) Hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells improve vascular and skeletal muscle fiber regeneration after ischemia through a Wnt4-dependent pathway. *Mol Ther* 18(8): p.1545–52.
38. Chang J, Sonoyama W, Wang Z, Jin Q, Zhang C, et al. (2007) Noncanonical Wnt-4 signaling enhances bone regeneration of mesenchymal stem cells in craniofacial defects through activation of p38 MAPK. *J Biol Chem* 282(42): p.30938–48.
39. Carmon KS, Gong X, Lin Q, Thomas A, Liu Q (2011) R-spondin function as ligands of the orphan receptor LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(28): p.11452–7.
40. Schuijers J, Clevers H (2012) Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. *Embo J* 31(12): p.2685–96.
41. Glinka A, Dolde C, Kim N, Huang YL, Kazanskaya O, et al. (2011) LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/beta-catenin and Wnt/PCP signaling. *EMBO Rep* 12(10): p.1055–61.