

## Syndrome gastro-intestinal radio-induit : à qui la faute ?

Agnès François, Fabien Milliat

Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire,  
31, avenue de la Division Leclerc,  
92260 Fontenay-aux-Roses, France.  
[agnes.francois@irsn.fr](mailto:agnes.francois@irsn.fr)



> Les travaux récemment publiés dans *Science* par David G. Kirsch *et al.* [1] abordent un des sujets brûlants et toujours controversés à la base des études de radiopathologie : qui est responsable du syndrome gastro-intestinal (SGI) et donc de l'initiation des dommages subis par les tissus digestifs lorsqu'ils sont exposés aux rayonnements ionisants ? Les radiobiologistes ont cru répondre à cette question dès la fin des années 1960 avec le concept de la cellule cible. Ce concept considère la cellule souche épithéliale comme responsable, par sa survie ou sa mort, de la survie ou de la mort du tissu irradié [2]. Cependant, le développement des outils génétiques et moléculaires ainsi que le perfectionnement des méthodes d'analyse ont permis, il y a moins de 10 ans, de remettre en cause ce concept, ou au moins de forcer la recherche à se pencher à nouveau sur cette question déterminante [3].

### Inculpation du suspect numéro 1 : la cellule épithéliale

La production continue de cellules par les cellules souches et les progéniteurs à vie longue localisés à la base des cryptes intestinales assure le renouvellement constant de l'épithélium. Les cellules filles migrent et se différencient le long de l'axe crypte/villosité puis sont éliminées au sommet des villosités. Dans le tissu adulte, la production cellulaire s'équilibre parfaitement avec la perte naturelle des cellules en fin de vie [12]. Les rayonnements bouleversent cet équilibre en créant des dommages à l'ADN suffisamment sévères pour entraîner la

mort des cellules. Ainsi, la sévérité des dommages au tissu digestif est, selon le concept de la cellule cible, directement liée à la quantité de cellules souches perdues, et surtout au nombre de cellules survivantes qui auront pour rôle de régénérer le tissu irradié [13]. Pour des doses suffisamment fortes, la stérilisation quasi complète du compartiment souche intestinal entraîne la mort de l'individu par SGI (voir *Encadré*). Plusieurs stratégies visant à stimuler la capacité de production cellulaire ou à protéger le compartiment épithélial souche de l'intestin peuvent être efficaces mais ne protègent jamais totalement contre le SGI suggérant que la cellule épithéliale n'est pas la seule impliquée.

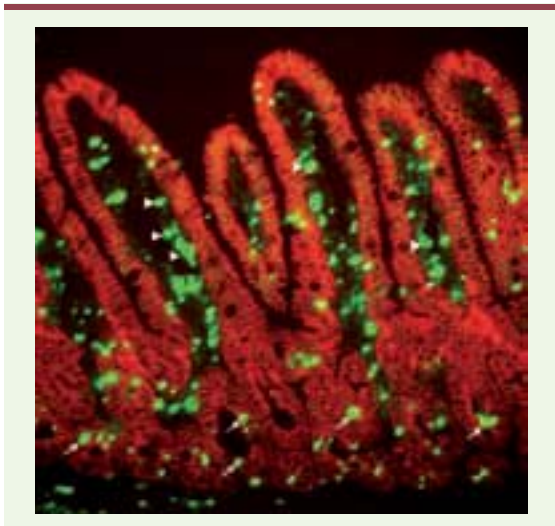
### Réouverture du procès en 2001 : mise en examen de la cellule endothéliale

L'équipe de Richard Kolesnik a jeté un pavé dans la mare en 2001 [3]. Ces travaux, publiés dans *Science*, mettent en évidence que l'endothélium des microvaisseaux de la muqueuse intestinale est la cible des rayonnements, et que les perturbations observées au niveau des cellules souches épithéliales sont la conséquence de l'atteinte des cellules endothéliales (CE) microvasculaires. L'apoptose radio-induite des CE est dépendante de la formation de céramides générés par la sphingomyélinase acide (*acid sphingomyelinase, ASMase*). La mort des CE est totalement inhibée chez les souris *asmase*<sup>-/-</sup>, ce qui permet de démontrer qu'en l'absence d'apoptose endothéliale, les animaux sont protégés du SGI. Selon cette équipe il existe, cer-

tes, des dommages radio-induits de manière directe dans les cellules souches intestinales mais leurs conséquences, lésions fonctionnelles ou arrêt mitotique, dépendraient des dommages aux CE. Un élégant travail publié dans *Proc Natl Acad Sci USA* en 2004 confirme l'importance de la mort des CE dans l'initiation du SGI. L'administration d'un variant stable de l'angiopoïétine-1, facteur de survie des CE, protège les souris du SGI [4]. Bien évidemment les choses ne sont pas si simples. Alors que certains travaux remettent même en cause la réalité de la mort radio-induite de l'endothélium [5], d'autres études démontrent que lorsque les cellules épithéliales - mais pas les cellules endothéliales - sont protégées de la mort, on arrive également à protéger les animaux du SGI [6, 7].

### Mettons les choses au point : qui meurt, et quand ?

L'irradiation du tissu digestif entraîne une première vague de mort cellulaire précoce, observée 4 heures après irradiation, qui touche à la fois l'endothélium, via la voie des céramides, et l'épithélium, via p53 (*Figure 1*). Les gènes transactivés par p53 permettent l'arrêt du cycle cellulaire et le déclenchement du processus apoptotique (via *Bax* par exemple) ou le choix d'une voie de survie en engageant les mécanismes de réparation de l'ADN (via *p21<sup>WAF-1/CIP1</sup>*) [8]. Une seconde vague de mort, la mort mitotique, survient 24 à 40 heures après irradiation et touche les premières cellules filles issues de la reprise des mitoses des cellules épithéliales lésées et mal



**Figure 1. Mort cellulaire radio-induite dans l'intestin grêle de souris.** Photo prise 4 heures après une irradiation à 19 Gy : co-marquage immunofluorescent de la structure de l'épithélium (E-cadhérine, composant de la membrane des cellules épithéliales, en rouge) et des cellules apoptotiques (marquage TUNEL, pour *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling*, en vert). On remarque de l'apoptose au niveau des cryptes (flèches) et au niveau du réseau microvasculaire des villosités (pointes de flèches). Observation x 200 (© Photo Rym Abderrahmani, avec permission).

réparées [9]. Ainsi, chez les souris génétiquement déficientes en p53, la prolifération continue des cellules épithéliales les expose rapidement à la mort mitotique, et les souris sont plus sensibles au SGI [8]. On sait depuis plusieurs années que la sévérité des pertes cellulaires conditionne la capacité de l'épithélium à se régénérer et dépend autant de la mort mitotique que du taux d'apoptose précoce. Ceci justifie le fait de suivre systématiquement le nombre de cryptes survivantes, 3,5 jours après irradiation, comme marqueur de la capacité de régénération de l'épithélium.

### Que nous apportent les travaux de D. Kirsch et al. ?

Pour identifier le compartiment cellulaire cible (endothélium et/ou épithélium) et déterminer le type de mort impliqué dans le SGI, Kirsch et al. ont utilisé des modèles de souris KO (*knocked out*, invalidées pour l'expression d'un gène) combinés à des modèles de souris transgéniques obtenues par la technologie Cre-loxP qui permet l'inactivation d'un gène spécifiquement dans un tissu. Ce type de transgénèse basé sur la recombinaison homologue permet d'inactiver *in vivo* un gène cible dans un compartiment cellulaire donné. Ainsi, par le croisement de souris exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur *villine* (spécifique de l'épithélium) ou du pro-

moteur *Tie2* (récepteur de l'angiopoïétine, exprimé sélectivement par les cellules hématopoïétiques et endothéliales) avec des souris floxées<sup>1</sup> pour *Bax* ou *p53*, les auteurs ont

étudié les conséquences sur le SGI de nombreuses combinaisons d'inactivation de gènes impliqués dans la mort cellulaire, spécifiquement dans un tissu ou globalement dans l'organisme entier. En premier lieu, Kirsch et al. montrent que les souris invalidées dans tous leurs tissus pour *Bak* ou *Bax*<sup>2</sup> ne sont pas protégées du SGI, ce qui contredit les travaux de Rotolo et al. [10]. Mais il y a une possible explication à cette discordance. À des doses d'irradiation entraînant le SGI, le syndrome hématopoïétique (*voir Encadré*) joue un rôle important dans la mort des animaux puisqu'une pancytopenie induite par l'irradiation peut favoriser la mort par SGI [11]. La seule façon de s'affranchir du syndrome hématopoïétique est d'effectuer une greffe de moelle osseuse. Dans les travaux de Rotolo, tous les animaux sont greffés, et l'amélioration de la survie observée chez les souris *Bax*<sup>-/-</sup> et *Bak*<sup>-/-</sup> peut donc être de manière certaine attribuée à une protection vis-à-vis du SGI. Rotolo et al. ont également observé une hypersensibilité des animaux *Bax*<sup>-/-</sup> au syndrome hématopoïétique. Dans les travaux de Kirsch, une éventuelle protection contre le SGI peut donc être masquée par les lésions

sévères au système hématopoïétique. Démontrer que des animaux sont protégés ou non du SGI exige d'être sûr des causes de la mort dans le modèle d'irradiation utilisé (syndrome hématopoïétique ou SGI). Dans les travaux de Kirsch et al., en l'absence de suivi des paramètres sanguins et d'autopsies systématiques, rien ne prouve que les animaux meurent d'un SGI pur et que les cellules n'ont pas été protégées de la mort par l'invalidation de *Bak* ou *Bax*.

Dans une autre série de travaux, cette équipe a utilisé des souris *Bak*<sup>-/-</sup> qui ont en plus été invalidées ou non pour *Bax* dans les cellules soit endothéliales (*cre-tie2*) soit épithéliales (*cre-villine*). L'invalidation de *Bax* réduit l'apoptose des CE et des cellules épithéliales sans protéger les souris du SGI, ce qui permet aux auteurs de conclure que le SGI ne dépend pas de l'apoptose précoce de ces deux compartiments. Mais ce modèle de « fond génétique *Bak*<sup>-/-</sup> » n'est peut-être pas approprié, car on sait que ces souris ont un taux d'apoptose endothéliale très réduit et sont protégées du SGI [3, 7, 10]. Il est donc difficile de déceler une éventuelle protection supplémentaire vis-à-vis du SGI que conférerait l'invalidation de *Bax* dans les CE ou les cellules épithéliales. Malheureusement, ces études ne comportent pas l'analyse de souris contrôles sauvages exprimant à la fois *Bak* et *Bax*, ni de souris invalidées pour *Bax* ou *Bak* seulement dans les compartiments cibles, ce qui aurait pu donner des réponses plus probantes.

Enfin, le rôle de p53 dans la mort par SGI a également été exploré. Lorsque *p53* est invalidé spécifiquement dans les cellules épithéliales, le SGI est plus sévère,

<sup>1</sup> Une souris est dite floxée pour un gène d'intérêt lorsque ce gène possède des séquences LoxP dans son génome. L'inactivation du gène d'intérêt est obtenue par l'action de la recombinaise Cre qui excise tout fragment d'ADN floxé.

<sup>2</sup> *Bax* et *Bak* sont des protéines pro-apoptotiques.



### Les différents syndromes radiologiques chez l'homme

Le syndrome aigu d'irradiation résulte de l'exposition du corps entier à de fortes doses d'irradiation et entraîne des conséquences sur plusieurs tissus/organes :

- le syndrome hématopoïétique (survenant pour une dose d'irradiation de 1 à 7 Gy), apparaît après une période de latence de 1 à 3 semaines, résulte de dommages aux cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Il se caractérise par une aplasie médullaire dont l'intensité est fonction de la dose d'irradiation reçue et qui touche la globalité des lignées sanguines : érythroïde, myéloïdes et mégacaryocytaire. La granulocytopenie augmente les risques d'infection et la thrombocytopenie les risques de saignements. Les symptômes sont : anorexie, nausées et vomissements. Le traitement repose sur une stimulation de la réparation médullaire par les cellules souches hématopoïétiques par l'administration de cytokines et de facteurs de croissance ;

- le syndrome gastro-intestinal (irradiation > 7 Gy) survient après une période de latence de 1 à 4 jours et se caractérise par des dénudations de la muqueuse digestive et par la rupture des barrières intestinales et vasculaires. Les conséquences cliniques sont : une anorexie, des nausées, des vomissements, des diarrhées aiguës, des saignements et des infections souvent aggravées par le statut immunodéprimé du patient. La prise en charge thérapeutique repose sur des traitements symptomatiques comme les antiémétiques, antidiarrhéiques et antibiotiques. La gamme de dose d'irradiation entraînant un syndrome gastro-intestinal léthal s'étend de 10 à 50 Gy et, sans prise en charge thérapeutique, le décès survient dans les 5 à 12 jours suivant l'irradiation ;

- le syndrome cérébro-vasculaire ou *acute incapacitation syndrome*, qui se déclenche pratiquement sans période de latence, est caractéristique des irradiations à des doses de 50 Gy et plus, et se traduit principalement par un œdème cérébral, une augmentation de la pression intracrânienne et des atteintes vasculaires majeures. Les symptômes sont : violents vomissements, confusion, ataxie, diarrhées, convulsions et coma. À l'heure actuelle, nous sommes très démunis puisqu'aucune stratégie thérapeutique n'est efficace pour ces doses élevées d'irradiation.

En plus de ces trois syndromes radiologiques cliniquement bien définis, il existe également chez les irradiés accidentels des atteintes marquées de la muqueuse orale, de la peau et des poumons. Les pneumonies et déficiences respiratoires sévères ont été une des causes de décès de nombreuses victimes d'accidents d'irradiation. Enfin, les atteintes cutanées sévères, qu'elles soient très étendues ou profondes, peuvent être responsables du développement d'une défaillance multiple des organes.

rejoignant des observations antérieures faites sur des souris KO pour *p53* [8]. Lorsque les deux gènes *Bax* et *p53* sont invalidés, les souris restent sensibles au SGI. Ces données confirment que la mort mitotique des cellules épithéliales, qui est indépendante de *p53*, joue un rôle clé dans le développement du SGI [9]. L'apoptose radio-induite des CE est indépendante de *p53*, ce que confirme l'absence de modification de la survie des souris dont le gène *p53* est invalidé dans les CE. Enfin, les souris surexprimant *p53*, ce qui a pour conséquence un arrêt du cycle cellulaire, sont protégées du SGI, confirmant l'importance de la quiescence cellulaire pour permettre la réparation des dommages à l'ADN radio-induits.

### Conclusions

Ce travail confirme par une approche méthodologique puissante certains concepts déjà décrits dans la littérature mais, malheureusement, n'apporte pas beaucoup d'eau au moulin de la controverse. L'absence de caractérisation précise du modèle d'irradiation et de ses conséquences spécifiques dans les systèmes hématopoïétique et digestif n'apporte malheureusement pas d'éléments de réponse probants. L'interprétation des résultats quant à une protection ou une sensibilisation envers le SGI doit résulter d'une évaluation multiparamétrique, associant (1) des courbes de survie analysées par la méthode de Kaplan-Meier ; (2) l'identification

des causes de la mort par un examen d'autopsie ; (3) le suivi des paramètres sanguins ; (4) la quantification des cryptes survivantes à 3,5 jours. Enfin, les courbes de survie doivent être établies pour chaque souche de souris utilisée, avec une indication précise du moment et des causes de la mort.

L'identification du (ou des) compartiments cibles, des mécanismes de mort associés et des acteurs moléculaires clés impliqués dans le SGI devrait permettre dans le futur de mettre en place des stratégies thérapeutiques efficaces et ciblées. L'approche méthodologique de Kirch *et al.* ouvre de nouvelles perspectives, et l'utilisation de souris exprimant la recombinase Cre sous le contrôle de promoteurs spécifiques de tissus ou de cellules, voire inductibles, devrait permettre de résoudre la controverse dans les années à venir. ♦

### Radiation-induced gastrointestinal syndrome: who is the culprit?

### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient toute l'équipe du Laboratoire de radiopathologie et thérapie expérimentale (LRTE) de l'Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN), Marie-Hélène Gaugler (LRTE) et François Paris de l'Inserm UMR U892, ainsi que Jean-Marc Bertho du Laboratoire de radiotoxicologie (IRSN) pour leur discussion fructueuse, et Rym Abderrahmani (LRTE) qui nous a gentiment permis d'utiliser l'une des photos issues de ses travaux de thèse.

### CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

### RÉFÉRENCES

1. Kirsch DG, Santiago PM, di Tomaso E, *et al.* *p53* controls radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice independent of apoptosis. *Science* 2010 ; 327 : 593-6.
2. Withers, HR, Elkind MM. Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1970 ; 17 : 261-7.
3. Paris F, Fuks Z, Kang A, *et al.* Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 2001 ; 293 : 293-7.

4. Cho CH, Kammerer RA, Lee HJ, et al. Designed angiopoietin-1 variant, COMP-Ang1, protects against radiation-induced endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101 : 5553-8.
5. Schuller BW, Binns PJ, Riley KJ, et al. Selective irradiation of the vascular endothelium has no effect on the survival of murine intestinal crypt stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103 : 3787-92.
6. Bhanja P, Saha S, Kabarriti R, et al. Protective role of R-spondin1, an intestinal stem cell growth factor, against radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice. *PLoS One* 2009; 4 : e8014.
7. Qiu W, Carson-Walter EB, Liu H, et al. PUMA regulates intestinal progenitor cell radiosensitivity and gastrointestinal syndrome. *Cell Stem Cell* 2008; 2 : 576-83.
8. Komarova EA, Kondratov RV, Wang K, et al. Dual effect of p53 on radiation sensitivity *in vivo*: p53 promotes hematopoietic injury, but protects from gastro-intestinal syndrome in mice. *Oncogene* 2004; 23 : 3265-71.
9. Merritt AJ, Allen TD, Potten CS, Hickman JA. Apoptosis in small intestinal epithelial from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after gamma-irradiation. *Oncogene* 1997; 14 : 2759-66.
10. Rotolo JA, Maj JG, Feldman R, et al. Bax and Bak do not exhibit functional redundancy in mediating radiation-induced endothelial apoptosis in the intestinal mucosa. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 70 : 804-15.
11. Terry NH, Travis EL. The influence of bone marrow depletion on intestinal radiation damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 17 : 569-73.
12. Joubert D, Hollande F, Jay P, Legraverend C. Les cellules souches intestinales : 30 ans d'une histoire exemplaire. *Med Sci (Paris)* 2009; 25 : 441-4.
13. François A, Milliat F, Jullien N, et al. Radiothérapie : quelles orientations thérapeutiques contre les séquelles digestives ? *Med Sci (Paris)* 2009; 25 : 267-72.

## NOUVELLE

### Le séquençage de l'exome au secours des maladies génétiques

Audrey Criqui, Sylvain Baulande

PartnerChip-CEA, Bâtiment G2,  
2, rue Gaston Crémieux,  
91000 Évry, France.  
[sylvain.baulande@cea.fr](mailto:sylvain.baulande@cea.fr)

> Avec plus de 6 000 pathologies répertoriées, les maladies génétiques constituent un grand problème de santé publique affectant plus de 6 % de la population mondiale dont 25 millions d'Européens. La prise en charge de ces maladies demeure compliquée en raison de la difficulté tant du diagnostic que du développement de thérapies pour ces pathologies qui regroupent peu de malades. Actuellement, le diagnostic génétique est principalement fondé sur la recherche d'anomalies cytogénétiques, la mise en œuvre d'analyses de liaison génétique ou encore le re-séquençage de gènes candidats. Malheureusement, l'identification des gènes en cause s'avère très difficile en raison de la diversité des mutations à mettre en évidence parmi les 3 milliards de bases qui composent le génome humain. Ainsi, beaucoup trop de patients restent sans diagnostic moléculaire bien que ce soit nécessaire à la prise en charge des familles, à la mise en place d'un diagnostic prénatal et que cela constitue une étape indispensable à l'élaboration de stratégies thérapeutiques. L'émergence des technologies de séquençage de nouvelle génération (dites NGS

pour *next generation sequencing*) [1] ouvre de nouvelles perspectives pour le diagnostic des maladies génétiques. Jusqu'à présent, en raison du coût important du séquençage conventionnel, seuls quelques privilégiés comme le prix Nobel James Watson [2] codécouvreur de l'ADN avec Francis Crick, ou encore Craig Venter [3], pionnier du séquençage du génome humain, ont vu leur génome entièrement séquencé. Ces nouvelles technologies, qui permettent une lecture massivement parallèle de plusieurs Gb par semaine, ont permis de réduire considérablement ces coûts et vont donc faciliter le séquençage complet de génomes à haut débit. Cette technologie a donc logiquement été retenue dans le cadre du *1 000 genomes project* qui prévoit le séquençage du génome de 1 000 individus afin d'établir une nouvelle base de données plus complète des polymorphismes du génome humain [4, 5]. Malgré l'avancée significative apportée par le NGS, ces techniques restent encore trop onéreuses pour envisager le séquençage à grande échelle du génome entier d'individus atteints d'une même maladie génétique. De plus, les millions de polymorphismes

ainsi révélés rendent la démarche de recherche de mutations particulièrement délicate et nécessitant donc une méthodologie adaptée. Récemment, un consortium américain baptisé *Exome Project* a été créé afin de développer une approche centrée sur le séquençage exclusif de l'« exome » correspondant à l'ensemble des parties codantes du génome. Bien qu'il n'en représente qu'environ 1 % (soit près de 28 Mb selon la base CCDS [*consensus coding DNA sequence project*] du NCBI [*National center for biotechnology information*]), l'exome contient à lui seul 85 % des mutations mises en cause dans les maladies génétiques [6]. Une équipe de l'université de Washington impliquée dans ce consortium a donc isolé les 180 000 régions génomiques correspondantes par une technique de capture sur puce à ADN. Ces régions ont ensuite été amplifiées puis séquencées à l'aide d'une plateforme Solexa d'Illumina [7]. Dans un premier temps, ces chercheurs ont étudié l'exome de huit personnes originaires de 3 populations différentes (4 Africains Yoruba, 2 Asiatiques et 2 Caucasiens) dont la séquence avait