
UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE ET TECHNIQUES MÉDICALES

**Etude *in vitro* et *in vivo* de la régulation de la
mort radioinduite des cellules endothéliales
par la Sphingosine-1-Phosphate**

**THÈSE
DE
DOCTORAT**

*Ecole Doctorale : CHIMIE-BIOLOGIE
Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire*

Présentée et soutenue publiquement par

Stéphanie BONNAUD

Le 22 Janvier 2007

Composition du jury

Présidente du jury :	Dr. Laure SABATIER	Chef de Service, CEA, Fontenay-aux-Roses
Rapporteurs :	Pr. Eric LARTIGAU Pr. Thierry LEVADE	PU/PH, Centre Oscar Lambret, Lille PU/PH, INSERM, Toulouse
Examineur :	Dr. Michel CHEREL	MCU, Faculté de Médecine, Nantes
Co-encadrant :	Dr. François PARIS	CR, INSERM, Nantes
Directeur de thèse :	Dr. Jacques BARBET	DR, INSERM, Nantes

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

TABLE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION 1

I IMPORTANCE DE LA RADIOTHERAPIE PARMIS LES TRAITEMENTS ANTI-CANCEREUX 2

I.1. Les thérapies anti-cancéreuses 2

I.1.1. Les différents traitements..... 2

I.1.2. La radiothérapie : historique et applications 4

I.2. Mécanismes moléculaires et cellulaires induits par les radiations..... 7

I.2.1. Cibles moléculaires des radiations..... 7

I.2.1.1. L'ADN..... 7

I.2.1.2. La membrane cellulaire 10

I.2.2. Les effecteurs cellulaires des radiations 11

I.2.2.1. Les protéines senseurs des dommages de l'ADN..... 12

I.2.2.2. Les protéines de réparation de l'ADN..... 13

I.2.2.3. Les protéines du cycle cellulaire..... 15

I.2.2.4. Voies de signalisation dépendantes de la membrane..... 16

I.2.2.5. Voies de signalisation dépendantes de la mitochondrie et des caspases effectrices 17

I.2.3. Les effets de voisinage ou effet bystander des radiations..... 19

I.3. Les différents types de mort radioinduite 20

I.3.1. Classification des types de mort cellulaire..... 20

I.3.2. La mort prémitotique 22

I.3.3. La mort postmitotique 22

II IMPLICATION DES CELLULES ENDOTHELIALES DANS LA REPOSE DU TISSU SAIN ET TUMORAL APRES IRRADIATION..... 25

II.1. L'angiogenèse 25

II.1.1. Définitions 25

II.1.2. L'angiogenèse tumorale	26
II.2. Thérapies anti-angiogéniques	29
II.2.1. Définition et exemples.....	29
<i>II.2.1.1. Les agents ciblant les facteurs angiogéniques.....</i>	<i>30</i>
<i>II.2.1.2. Les agents ciblant les enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire</i>	<i>31</i>
<i>II.2.1.3. Inhibition de la formation des néovaisseaux tumoraux.....</i>	<i>32</i>
II.2.2. Limites des thérapies anti-angiogéniques.....	33
II.3. Effets de l'irradiation sur les cellules endothéliales	35
II.3.1. Effets cellulaires de l'irradiation sur les cellules endothéliales.....	35
<i>II.3.1.1. Activation des cellules endothéliales</i>	<i>35</i>
<i>II.3.1.2. Mort des cellules endothéliales.....</i>	<i>36</i>
II.3.2. Effets tissulaires de l'irradiation des cellules endothéliales	37
<i>II.3.2.1. Généralités.....</i>	<i>37</i>
<i>II.3.2.2. Implication des cellules endothéliales irradiées au niveau du tissu sain :</i> <i>exemple du Syndrome Gastro-Intestinal (SGI)</i>	<i>38</i>
<i>II.3.2.3. Implication des cellules endothéliales dans la réponse tumorale</i>	<i>41</i>
III IMPLICATION DE LA GENERATION DU CERAMIDE DANS L'APOPTOSE	
RADIOINDUITE DES CELLULES ENDOTHELIALES.....	43
III.1. Présentation de la voie des sphingolipides.....	43
III.1.1. Le céramide : composant de la voie des sphingolipides	43
III.1.2. Génération du céramide par les sphingomyélinases	44
III.2. Les effets biologiques du céramide.....	47
III.3. Effets de l'irradiation sur la génération du céramide.....	49
III.4. Importance du céramide dans la mort radioinduite des cellules endothéliales	52
IV LA SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE (S1P), UN METABOLITE DU CERAMIDE	56
IV.1. Présentation de la S1P	56
IV.1.1. Synthèse et dégradation	56
IV.1.2. Secrétion de la S1P	58
IV.1.3. Signalisation induite par la S1P	60
<i>IV.1.3.1. Signalisation intracellulaire de la S1P.....</i>	<i>61</i>
<i>IV.1.3.2. Signalisation extracellulaire par les récepteurs S1Ps.....</i>	<i>61</i>
IV.2. Les fonctions de la S1P	63
IV.2.1. Activation de la prolifération	63

IV.2.2. Régulation de la motilité cellulaire	64
IV.2.3. Action sur la différenciation	64
IV.2.4. Action sur la régulation des systèmes biologiques	65
IV.2.5. Action sur le système cardiovasculaire.....	66
IV.3. Implication du rhéostat S1P/céramide dans l'inhibition de l'apoptose.....	68
PRESENTATION DU PROJET	71
RESULTATS.....	74
I MISE EN PLACE D'UN MODELE D'ETUDE DE LA RADIOSENSIBILITE DES CELLULES ENDOTHELIALES.....	75
I.1. Choix de la lignée cellulaire	75
I.2. Effets de l'irradiation sur les HMEC-1	76
I.2.1. Les radiations induisent la mort des HMEC-1 de façon dose-dépendante	76
I.2.2. Les radiations induisent la mort des HMEC-1 de façon temps-dépendante.....	79
I.2.3. Apoptose radioinduite et régulation du cycle cellulaire	82
I.3. La composition du milieu de culture influe sur la radiosensibilité des HMEC-1.....	86
I.4. Conclusion	88
II LA S1P PROTEGE LES HMEC-1 DE L'APOPTOSE PREMITOTIQUE, MAIS PAS DE LA MORT MITOTIQUE RADIOINDUITES	90
II.1. La phase d'apoptose radioinduite précoce est dépendante de la génération du céramide	90
II.1.1. L'inhibition de la voie du céramide par la désipramine bloque l'apoptose précoce	90
II.1.2. La S1P bloque l'apoptose précoce des HMEC-1	92
II.1.3. L'inhibition de l'apoptose précoce radioinduite médiée par le céramide est spécifique de la S1P.....	95
II.2. La phase de mort radioinduite tardive est indépendante de la génération du céramide	96
II.2.1. L'inhibition de la voie du céramide ne lève pas la mort tardive radioinduite	96
II.2.2. La S1P ne protège pas les HMEC-1 de la mort tardive.....	98
II.3. La mort tardive radioinduite des HMEC-1 est une mort mitotique	100
II.3.1. La S1P ne protège pas les HMEC-1 des dommages de l'ADN.....	100
II.3.2. La S1P ne protège pas les HMEC-1 des dommages chromosomiques	102
II.3.3. La S1P ne module pas l'arrêt du cycle cellulaire impliqué dans la mort mitotique ...	106

II.4. La combinaison des traitements S1P et nocodazole protège les HMEC-1 en inhibant respectivement la voie apoptotique membranaire et la voie de mort mitotique radioinduites	109
II.5. Conclusion.....	111
III ETUDE DE LA RADIOSENSIBILITE DES CELLULES ENDOTHELIALES <i>IN VIVO</i> SUR UN MODELE DE SYNDROME GASTRO-INTESTINAL.....	113
III.1. La S1P retarde la mort des souris induite par le SGI.....	113
III.2. La protection des cellules endothéliales de la mort radioinduite <i>in vivo</i> est spécifique de la S1P	116
III.3. Le traitement à la S1P et la greffe de moelle osseuse protègent les souris de la mort radioinduite.....	117
III.4. Conclusion	118
IV MODALITE DE L'ACTION PHARMACOLOGIQUE DE LA S1P LORS DE LA RADIOPROTECTION DES CELLULES ENDOTHELIALES.....	119
IV.1. Etudes <i>in vitro</i>	119
IV.1.1. Les HMEC-1 expriment les S1Ps	119
IV.1.2. La Toxine Pertussique lève la radio-protection médiée par la S1P	120
IV.2. Etudes <i>in vivo</i>.....	122
IV.3 Conclusion	123
DISCUSSION	124
I IMPORTANCE DU MODELE D'ETUDE DE LA RADIOSENSIBILITE DES CELLULES ENDOTHELIALES.....	125
II IMPORTANCE DE LA MISE EN EVIDENCE DE DIFFERENTS TYPES DE MORT RADIOINDUITE DES CELLULES ENDOTHELIALES : IMPLICATION DE LA S1P.....	131
III RELATION ENTRE LA VOIE RADIOINDUITE DU CERAMIDE ET CELLE DES DOMMAGES DE L'ADN	135
IV PLACE DE LA S1P DANS LE MAINTIEN DE L'INTEGRITE MICROVASCULAIRE DU TISSU SAIN ET TUMORAL	139
V CONCLUSION.....	145
VI PERSPECTIVES	147

MATERIELS ET METHODES	151
I CULTURES CELLULAIRES ET TRAITEMENTS	152
I.1. Les HMEC-1	152
I.1.1. Milieu de culture	152
I.1.2. Irradiations et traitements	152
I.2. Les cellules 293 FT	153
I.3. Les souches bactériennes	153
Description	153
II DETECTION DE L'APOPTOSE	154
II.1. Test de comptage cellulaire	154
II.2. Détection du marqueur apoptotique Apo2.7	154
II.3. Marquage TUNEL	154
III ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE	156
III.1. Incorporation de ³H-Thymidine	156
III.2. Marquage à l'IP	156
IV ANALYSE DES DOMMAGES DE L'ADN	157
IV.1. Détection de la phosphorylation de l'histone H2AX (γH2AX)	157
IV.2. Analyses cytogénétiques	157
IV.3. Détection des micronoyaux	158
V ETUDES <i>IN VIVO</i>	159
V.1. Animaux et traitements	159
V.2. Transplantation de moëlle osseuse	159
V.3. Préparation des tissus	159
V.4. Marquage hématoxyline/éosine	160
V.5. Marquage TUNEL	160
V.6. Survie des souris et évaluation des causes de la mort	160
VI ETUDE DE L'EXPRESSION DES RECEPTEURS S1PS	161
VI.1. Expression protéique	161
VI.1.1. Préparation des extraits protéiques totaux	161
VI.1.2. Dosage protéique.....	161

VI.1.3. Western Blot	161
VI.2. Expression moléculaire.....	163
VI.2.1. Extraction des ARN totaux	163
VI.2.2. Reverse Transcription	163
VI.2.3. Réaction de PCR	164
VI.3. Invalidation des récepteurs S1Ps par siARN	164
VI.3.1. Préparation du plasmide pSUPER-siARN.....	164
<i>VI.3.1.1. Construction des siARN.....</i>	<i>164</i>
<i>VI.3.1.2. Insertion des duplex siARN dans le plasmide pSUPER.....</i>	<i>166</i>
<i>VI.3.1.3. Vérification du plasmide pSUPER-siARN.....</i>	<i>167</i>
VI.3.2. Préparation des plasmides lentiviraux pFG12-siARN, pLP1, pLP2 et pLP/VSV-G.	167
VI.3.3. Production des particules virales.....	168
<i>VI.3.3.1. Transfection au phosphate de calcium et productions virales</i>	<i>168</i>
<i>VI.3.3.2. Titration des particules virales.....</i>	<i>168</i>
<i>VI.3.3.3 Détermination de la MOI des HMEC-1</i>	<i>168</i>
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	170
ANNEXES.....	197

LISTE DES ABREVIATIONS

+/+ : homozygote
+/- : hétérozygote
-/- : nullizygote
 γ H2AX : H2AX phosphorylé

A

Ac : Anticorps
ADN : Acide Désoxyribonucléique
Ang : Angiopoïétine
ARNm : ARN messenger
aSMase : sphingomyélinase acide
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
ATR: Ataxia Telangiectasia Related protein

B

BAEC : Bovine Aortic Endothelial Cells
bFGF : basic Fibroblast Growth Factor
bSMase : sphingomyélinase basique

C

Ca²⁺ : calcium
CAD : Caspase-Activated Dnase
CAPK : Ceramide-Activated Protein Kinase
CAPP : Ceramide-Activated Protein Phosphatase
Caspase : cystéine/aspartate protéase
CDK : Cycline Dependant Kinase
ADNc : ADN complémentaire
CHO : Chinese Hamster Ovary
CS : Céramide Synthase

D

DAG : Diacylglycérol
dhS1P : dihydro-Sphingosine-1-Phosphate
DNA-PK : DNA Protein Kinase
DNA-PKcs : DNA Protein Kinase catalytic subunit
DSBs : Double Strand Breaks

E

EDG : Endothelial Differentiation Gene
EGF : Epithelial Growth Factor
EGFR : Epithelial Growth Factor Receptor
eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase
ERK : Extracellular Receptor-activated Kinase

F

FB1 : Fumonisine B1

FPG : Fluorochrome Plus GIEMSA

G

G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GFP : Green Fluorescent Protein
GPL : Glycérophospholipide
Gy : Gray

H

HDL : High Density Lipoprotein
HMEC-1 : Human Microvascular Endothelial Cell line 1
HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells

I

IAP : Inhibitors of Apoptosis Protein
ICAD : Inhibitor of Caspase-Activated Dnase
ICAM-1 : Inter Cellular Adhesion Molecule-1
IFN : Interféron
IGF : Insulin-like Growth Factor
IL : Interleukine
Ins(1,4,5)P₃ : inositol 1,4,5-triphosphate
IP : Iodure de Propidium

J

JNK : Jun N-terminal Kinase
JNK/SAPK: Stress-Activated Protein Kinase

L

LDL : Low Density Lipoprotein

M

MA : Milieu Appauvri
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MC : Milieu Complet
M-CSF : Monocyte-Colony Stimulating Factor
Mg²⁺ : Magnésium
MMP : Matrix Metallo Proteinase
MMPI : Matrix Metallo Proteinase Inhibitor
Mn²⁺ : Manganèse
Mo : Monoclonal
MOI : Multiplicity Of Infection

N

NF-κB: Nuclear Factor κB
NGF : Nerve Growth Factor
NHEJ : Non-Homologous End Joining
NO : Nitric Oxyde
nSMase : sphingomyélinase neutre

P

PARP : Poly(ADP-Ribose) Polymérase

PBS : Phosphate Buffer Saline
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDGF : Platelet Derived Growth Factor
PDGFR : Platelet Derived Growth Factor Receptor
PDP : Proline Directed Protein
PECAM-1 : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PI : phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PI3K : Phosphoinositol-3 Kinase
PKC : Protein Kinase C
PLA₂ : Phospholipase A₂
PLC : phospholipase C

R

RCPGs : Récepteurs Couplés aux Protéines G
RIT : Radio-Immunothérapie
ROS : Reactive Oxygen Species
RT : Reverse Transcription

S

S1P : Sphingosine-1-Phosphate
SGI : Syndrome Gastro-Intestinal
siARN : small interfering ARN
SM : Sphingomyéline
SMPD : Sphingomyéline Phosphodiesterase
SNC : Système Nerveux Central
SphK : Sphingosine Kinase
Spl : Sphingosine-1-Phosphate lyase
SPP : Sphingosine-1-Phosphate Phosphatase
SSBs : Single Strand Breaks
sSMase : sphingomyélinase sécrétée
SV40 : Simian Virus 40
SVF : Sérum de Veau Fœtal

T

TGF : Tumor Growth Factor
TKI : Tyrosine Kinase Inhibitor
TNF : Tumor Necrosis Factor
TP : Toxine Pertussique
TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labelling
TXA₂ : Thromboxane A₂

V

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Z

Zn²⁺ : Zinc

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

- Figure 1 :** Action directe et indirecte des radiations sur la molécule d'ADN.
- Figure 2 :** Schéma des différents types de lésions radioinduites de l'ADN.
- Figure 3 :** Peroxydation lipidique de la membrane plasmique après irradiation.
- Figure 4 :** Cascade de signalisation induite par les dommages radioinduits de l'ADN.
- Figure 5 :** Structure d'un nucléosome.
- Figure 6 :** Schéma de la radiosensibilité des cellules CHO en fonction de leur position dans le cycle cellulaire.
- Figure 7 :** Schéma des points d'action des différents complexes cyclines-CDK et régulation radioinduite du cycle cellulaire.
- Figure 8 :** Schéma représentatif de l'activation des caspases par la mitochondrie.
- Figure 9 :** Schéma des aberrations chromosomiques radioinduites.
- Figure 10 :** Signalisation et conséquences cellulaires induites par les radiations.
- Figure 11 :** Principales étapes impliquées dans l'activation des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse.
- Figure 12 :** Place centrale des cellules endothéliales dans l'organisation tissulaire.
- Figure 13 :** Schéma d'une unité villosité-crypte intestinale.
- Figure 14 :** Métabolisme des sphingolipides.
- Figure 15 :** Schéma de la signalisation induite par le céramide.
- Figure 16 :** Coupes histologiques mettant en évidence l'apoptose des cellules endothéliales par marquage TUNEL.
- Figure 17 :** Métabolisme de la S1P dans les cellules de mammifères.
- Figure 18 :** Activation des voies de signalisation spécifiques de chacun des récepteurs S1Ps couplés à des protéines G.
- Figure 19 :** Actions intracellulaires et extracellulaires de la S1P.
- Figure 20 :** Le modèle du rhéostat S1P/céramide.
- Figure 21 :** Morphologie des cellules HMEC-1 et des cellules microvasculaires de derme non transformées.
- Figure 22 :** Photographie des cellules HMEC-1 24 h après une irradiation à 15 Gy.
- Figure 23 :** Pourcentage de cellules flottantes HMEC-1 après une exposition à 0, 5, 10, 15, 20 et 30 Gy.
- Figure 24 :** Pourcentage de cellules adhérentes HMEC-1 après une exposition à 0, 5, 10, 15, 20 et 30 Gy.
- Figure 25 :** Pourcentage de cellules flottantes HMEC-1 à 0, 6, 12, 18, 24, 48 et 72 h après une irradiation à 15 Gy.
- Figure 26 :** Pourcentage de cellules adhérentes HMEC-1 à 0, 6, 12, 18, 24, 48 et 72 h après une irradiation à 15 Gy.
- Figure 27 :** Marquage Apo2.7 des cellules HMEC-1 24 h après une irradiation à 15 Gy.
- Figure 28 :** Marquage Apo2.7 des cellules HMEC-1 0, 6, 18 et 24 h après une irradiation à 15 Gy.
- Figure 29 :** Schéma de la répartition de l'ADN cellulaire en fonction du cycle après marquage IP.
- Figure 30 :** Régulation du cycle cellulaire des HMEC-1 en fonction du temps après irradiation.
-

-
- Figure 31 :** Mortalité des HMEC-1 6 h après une irradiation à 15 Gy en fonction de la composition du milieu.
- Figure 32 :** Mortalité des HMEC-1 24 h après une irradiation à 15 Gy en fonction de la composition du milieu.
- Figure 33 :** Mortalité des HMEC-1 24 h après traitement par la désipramine ou la FB1 suivi d'une irradiation à 15 Gy.
- Figure 34 :** Marquage Apo2.7 des cellules HMEC-1 24 h après traitement par la désipramine ou la FB1 suivi d'une irradiation à 15 Gy.
- Figure 35 :** Mortalité des HMEC-1 6 h et 24 h après traitement par la S1P suivi d'une irradiation à 15 Gy.
- Figure 36 :** Marquage Apo2.7 des HMEC-1 24 h après traitement par la S1P suivi d'une irradiation à 15 Gy.
- Figure 37 :** Marquage TUNEL des HMEC-1 24 h après traitement par la S1P suivi d'une irradiation à 15 Gy.
- Figure 38 :** Mortalité des HMEC-1 24 h après traitement par la dhS1P ou le LPA suivi d'une irradiation à 15 Gy.
- Figure 39 :** Mortalité des HMEC-1 72 h après traitement par la désipramine ou la FB1 suivi d'une irradiation à 15 Gy.
- Figure 40 :** Marquage Apo2.7 des HMEC-1 72 h après traitement par la désipramine suivi d'une irradiation à 15 Gy.
- Figure 41 :** Marquage Apo2.7 des HMEC-1 72 h après traitement par la FB1 suivi d'une irradiation à 15 Gy.
- Figure 42 :** Mortalité des HMEC-1 72 h après traitement par la S1P suivi d'une irradiation à 15 Gy.
- Figure 43 :** Marquage Apo2.7 des HMEC-1 72 h après traitement par la S1P suivi d'une irradiation à 15 Gy.
- Figure 44 :** Phosphorylation de l'histone H2AX des HMEC-1 après irradiation.
- Figure 45 :** Marquage γ H2AX des HMEC-1 de 0 h à 24 h après traitement par la S1P suivi d'une irradiation à 15 Gy.
- Figure 46 :** Photographie de métaphases des HMEC-1 après traitement avec la S1P et irradiation à 15 Gy.
- Figure 47 :** Nombre de cassures chromosomiques par métaphase des HMEC-1 24 h après irradiation de 2 à 5 Gy.
- Figure 48 :** Observation des micronoyaux par marquage IP après traitement par la S1P suivi d'une irradiation à 15 Gy.
- Figure 49 :** Quantification des micronoyaux par marquage IP après traitement par la S1P suivi d'une irradiation à 15 Gy.
- Figure 50 :** Incorporation de ³H-thymidine après traitement par la S1P suivi d'une irradiation à 15 Gy.
- Figure 51 :** Indices mitotiques des HMEC-1 après traitement par la S1P suivi d'une irradiation de 2 à 15 Gy.
- Figure 52 :** Répartition dans les différentes phases du cycle cellulaire après traitement par la S1P suivi d'une irradiation à 15 Gy.
- Figure 53 :** Régulation du cycle cellulaire après traitement par la S1P, irradiation à 15 Gy et traitement au nocodazole.
- Figure 54 :** Mortalité des HMEC-1 après traitement par la S1P, irradiation à 15 Gy et traitement au nocodazole.
- Figure 55 :** Quantification des micronoyaux par marquage IP après traitement par la S1P, irradiation à 15 Gy et traitement au nocodazole.
- Figure 56 :** Courbes de survie des souris après injection de S1P et irradiation à 15 Gy.
-

-
- Figure 57 :** Coupes histologiques de l'intestin grêle et de la moelle osseuse de souris après injection de S1P et irradiation à 15 Gy.
- Figure 58 :** Marquage TUNEL de coupes histologiques de l'intestin de souris après injection de S1P et irradiation à 15 Gy.
- Figure 59 :** Courbes de survie des souris après injection de dhS1P ou de LPA et irradiation à 15 Gy.
- Figure 60 :** Courbes de survie des souris après injection de S1P, irradiation à 15 Gy et greffe de moelle osseuse.
- Figure 61 :** Photographie des souris après injection de S1P, irradiation à 15 Gy et greffe de moelle osseuse.
- Figure 62 :** Gel d'électrophorèse des produits de PCR des récepteurs S1P₁, S1P₂ et S1P₃.
- Figure 63 :** Autoradiographie des Western Blot des récepteurs S1P₁, S1P₂ et S1P₃.
- Figure 64 :** Mortalité des HMEC-1 24 h après traitement par la TP, et/ou la S1P suivi d'une irradiation à 15 Gy.
- Figure 65 :** Marquage TUNEL des HMEC-1 24 h après traitement par la TP, et/ou la S1P suivi d'une irradiation à 15 Gy.
- Figure 66 :** Courbes de survie des souris après injection de TP et/ou de S1P et irradiation à 15 Gy.
- Figure 67 :** Mortalité des HAEC 24 et 72 h après traitement par la S1P suivi d'une irradiation à 15 Gy.
- Figure 68 :** Schéma des évènements moléculaires qui induisent l'apoptose prémitotique et la mort postmitotique.
- Figure 69 :** Schéma de l'interaction entre les récepteurs S1Ps et les récepteurs aux facteurs de croissance et pro-angiogéniques.
- Figure 70 :** Schéma du fonctionnement de l'interférence ARN.
- Figure 71 :** Intensité de fluorescence des HMEC-1 après infection par les lentivirus.
- Figure 72 :** Schéma de la structure optimale d'efficacité des siARN.
- Figure 73 :** Schéma de la structure tige-boucle d'un siARN.
- Figure 74 :** Schéma des séquences nucléotidiques codant pour les cassettes d'expression des siARN.

Liste des tableaux

- Tableau 1 :** Types et nombre de lésions radioinduites.
- Tableau 2 :** Angiogenèse au cours du développement normal ou pathologique.
- Tableau 3 :** Inhibiteurs de la voie VEGF/VEGFR en essais cliniques.
- Tableau 4 :** Concentrations de S1P ou de sphingosine dans différents organismes, organes ou types cellulaires.
- Tableau 5 :** Tableau des facteurs d'augmentation du nombre de cellules flottantes en MC et en MA après irradiation à 0, 5, 10, 15, 20 et 30 Gy.
- Tableau 6 :** Pourcentages des fractions de cellules mortes A₀ des HMEC-1 en MC et en MA en fonction du temps et de l'irradiation.
- Tableau 7 :** Comparatif des taux de protection médiée par la S1P en fonction des tests utilisés.
- Tableau 8 :** Moyennes de fluorescence du marquage avec l'Ac anti- γ H2AX des HMEC-1 de 0 à 24 h après traitement par la S1P suivi d'une irradiation à 15 Gy.
- Tableau 9 :** Tableau des types de cassures chromosomiques observées après irradiation.
- Tableau 10 :** Souches bactériennes utilisées pour les préparations plasmidiques.
- Tableau 11 :** Ac primaires utilisés en Western Blot.
-

Tableau 12 : Ac secondaires utilisés en Western Blot.

Tableau 13 : Séquences des amorces utilisées en PCR.

Tableau 14 : Séquences sens et antisens des siARN.

Tableau 15 : Liste des plasmides utilisés pour le clonage des siARN et la production des particules virales.

INTRODUCTION

I IMPORTANCE DE LA RADIOTHERAPIE PARMIS LES TRAITEMENTS ANTI-CANCEREUX

I.1. Les thérapies anti-cancéreuses

I.1.1. Les différents traitements

Les différents types de traitements du cancer actuellement pratiqués en routine sont classés en deux catégories : les traitements locaux (soit la chirurgie, la radiothérapie), et les traitements systémiques (la chimiothérapie). Afin de choisir le meilleur traitement, plusieurs facteurs sont pris en compte comme le type de cancer, l'organe atteint, le stade de l'évolution de l'ensemble des facteurs pronostiques (le stade clinique, les éléments biologiques sanguins, marqueurs tumoraux, anatomo-pathologiques) et enfin les caractéristiques propres du malade (comme l'âge ou le sexe). En ce qui concerne les tumeurs solides localisées, comme par exemple le cancer du sein, l'ablation chirurgicale est le traitement le plus efficace, si la progression métastatique n'a pas encore eu lieu. En effet, la chirurgie n'a pas d'effets toxiques sur les tissus sains comme les chimiothérapies ou radiothérapies. Dans le cas inverse, en présence d'envahissement de la tumeur, la chirurgie est alors suivie de traitements complémentaires afin d'éliminer les cellules métastatiques.

La radiothérapie externe est le deuxième traitement conventionnel le plus utilisé après la chirurgie. En France environ 50 % de tous les malades cancéreux recevront une irradiation au cours de l'évolution de leur maladie (www.futura.sciences.com). La radiothérapie est un traitement qui utilise les rayonnements ionisants (rayons X ou γ) (voir chapitre Introduction I.1.2).

Le troisième traitement couramment utilisé est la chimiothérapie. La chimiothérapie désigne les traitements médicamenteux qui détruisent les cellules cancéreuses par des mécanismes non spécifiques dans le sens où ils ciblent toutes les cellules en prolifération, soit les cellules saines et tumorales en bloquant leur capacité de multiplication. Certaines chimiothérapies peuvent être administrées par voie orale, d'autres par voie intraveineuse ou encore sous-cutanée. Elles sont toxiques, puisqu'elles détruisent, en plus des cellules tumorales, les cellules saines en prolifération, comme celles de la peau, de la muqueuse ou de la moelle osseuse. La chimiothérapie ne désigne donc pas un médicament, mais un principe

de traitement qui regroupe un large éventail de médicaments. On distingue différents traitements à spectre large selon leurs mécanismes d'action :

- les anti-métabolites, qui sont des inhibiteurs compétitifs de la synthèse de l'ADN et du cycle cellulaire, comme le méthoxate
- les alkylants, qui modifient les bases de l'ADN, comme le melphalan
- les poisons du fuseau mitotique bloquant le cycle cellulaire, comme le paclitaxel ou le vinorelbine
- les inhibiteurs des topo-isomérase I et II qui empêchent les réparations de l'ADN, comme l'irinotécan, l'étoposide ou le téniposide
- et enfin les agents intercalants de l'ADN, comme l'idarubicine ou la doxorubicine.

En plus de ces chimiothérapies à large spectre d'action, on trouve des thérapies plus ciblées qui sont dirigées contre une voie de signalisation cellulaire spécifique, comme par exemple l'utilisation des analogues de la rapamycine. Ces inhibiteurs bloquent la voie intracellulaire Akt, qui induit une signalisation pro-survie, et semblent prometteurs dans les sarcomes des tissus mous [Easton and Houghton, 2006]. D'autres thérapies sont dirigées contre les récepteurs à tyrosine kinase qui régulent des fonctions telles que la prolifération, la migration ou la différenciation. L'activation ou la surexpression de ces récepteurs a été mise en évidence dans de nombreux cancers. On peut citer l'Herceptin dirigée contre l'oncogène Her2/Neu, ou encore le Gleevec, utilisé dans le cas des leucémies myéloïdes chroniques, et plus récemment dans le traitement de tumeurs stromales gastro-intestinales [Becker *et al.*, 2006].

Ces molécules sont administrées seules ou en combinaison avec d'autres molécules qui ciblent des mécanismes cellulaires différents. De façon générale, la chimiothérapie est administrée en concomitance avec la chirurgie ou la radiothérapie.

Afin d'augmenter l'efficacité des traitements des cancers, des essais ont eu lieu sur l'effet combinatoire de différents traitements. Ainsi on peut citer les associations entre la chirurgie et la radiothérapie externe, ou bien entre la chirurgie et la chimiothérapie, qui sont déjà des protocoles standards. De plus, la radiothérapie est souvent associée à la chimiothérapie dont certaines molécules ont été montrées comme ayant des propriétés radiosensibilisantes, et potentialisent donc les effets toxiques de la radiothérapie. On peut citer par exemple le paclitaxel [Milas *et al.*, 1994] ou encore la gemcitabine [Shewach *et al.*, 1994]. Des études cliniques randomisées ont démontré l'efficacité supérieure de la chimio-

radiothérapie par rapport à la radiothérapie seule sur des cancers du poumon inopérables de grade III en utilisant le paclitaxel [Huber *et al.*, 2006]. La médiane de survie est de 14,1 mois pour les patients avec une radiothérapie seule. Dans les protocoles associés radiothérapie-chiomiothérapie, la médiane de survie est de 18,7 mois.

Actuellement, de nouveaux types de traitements sont en cours d'essais cliniques, comme l'immunothérapie. Elle est généralement associée à des traitements classiques. L'immunothérapie regroupe les traitements stimulant le système immunitaire afin de déclencher une réponse immune contre les cellules tumorales. On peut citer par exemple l'immunothérapie active, qui utilise l'immunisation directe du patient contre un ou plusieurs antigènes tumoraux, ceci afin de déclencher une réponse immunitaire anti-tumorale *in situ*. Une autre alternative appelée immunothérapie passive ou adoptive, consiste à amplifier *in vitro* des cellules immunitaires réactives, ou bien à produire des Ac (Anticorps) spécifiques d'antigènes tumoraux afin de les injecter au patient.

I.1.2. La radiothérapie : historique et applications

La découverte en novembre 1895 des rayons X par Röntgen représente une véritable révolution dans le monde médical. Il réalise en effet les premiers clichés radiographiques. L'idée d'utiliser les rayons X pour traiter les maladies de la peau naît après l'observation que la prise des clichés radiologiques entraîne des rougeurs sur la peau des manipulateurs et des patients. Ce sont les premiers balbutiements de l'utilisation des rayonnements pour le traitement du cancer. En 1896, Despeignes annonce le premier traitement du cancer par les rayons X [Bernier *et al.*, 2004]. En 1897, Bécclère installe le premier appareil de radioscopie dans un hôpital parisien. En 1898, Pierre et Marie Curie découvrent le radium. En 1900, Walkhof et Giesel rapportent leurs observations sur les effets biologiques du radium sur la peau et établissent le parallèle avec l'action des rayons X. En 1901, Pierre Curie et Henri Becquerel publient une note : « L'action physiologique des rayons du radium ». De plus, Danlos, publie ses résultats sur le traitement du lupus par le radium. Des médecins multiplient des essais sur d'autres pathologies. Perthes, met au point la technique de la radiothérapie profonde. Entre 1904 et 1906 Bergonié et Tribondeau montrent que les cellules cancéreuses sont plus sensibles aux rayons X que les cellules saines. Ils apportent ainsi un premier fondement biologique à l'utilisation des rayons X comme radiothérapie [Bernier *et al.*, 2004].

Les premières études expérimentales en radiation et oncologie étaient axées principalement sur le développement technique des moyens de distributions des rayons X ou γ . Ensuite les disciplines telles que la physique, la radiobiologie ou encore l'oncologie ont commencé à interagir dans leurs recherches afin d'améliorer les traitements anti-cancéreux. Pendant les 50 années passées, la spécialité de la radiobiologie a permis la prédiction de voies de signalisation entre la déposition d'énergie dans une cellule tumorale, et la probabilité de la survie cellulaire.

Actuellement, on trouve 4 types de rayonnements ionisants qui ont des propriétés différentes :

- Les particules α : pénétration très faible dans l'air, une simple feuille de papier est suffisante pour arrêter les noyaux d'hélium.
- Les particules β ou électrons: pénétration faible, parcourent quelques mètres dans l'air, une feuille d'aluminium de quelques millimètres peut arrêter les électrons.
- Rayonnements X et γ : pénétration très grande, fonction de l'énergie du rayonnement, plusieurs centaines de mètres dans l'air, une forte épaisseur de béton ou de plomb permet de s'en protéger.
- Les neutrons : pénétration dépendante de leur énergie, une forte épaisseur de béton, d'eau ou de paraffine arrête les neutrons.

Au cours de l'interaction entre les rayons X, γ , α ou β et la matière, des électrons sont libérés de leur orbite et acquièrent une certaine énergie cinétique. L'atome cible perd un électron et devient un ion positif. Les électrons libérés percutent d'autres électrons le long de leur trajet et sont responsables de la formation de nombreux autres ions. La majeure partie des ions formés provient, en réalité, des électrons et non pas des rayons eux-mêmes. Les ions sont responsables d'effets directs ou indirects entraînant des dommages cellulaires souvent irréversibles.

L'irradiation entraîne des événements secondaires importants le long du trajet des rayons, notamment au niveau de la peau ou des tissus sains environnant la tumeur. Il a été montré que le fait de distribuer une simple dose en deux ou plusieurs fractions augmente la survie du patient, et diminue les effets délétères sur les tissus sains [Elkind *et al.*, 1965]. Ainsi, la radiothérapie conventionnelle est délivrée par des fractions de 1,8 à 2 Gy (Gray) par jour [Bernier *et al.*, 2004].

De plus, la radiothérapie externe est optimisée par l'utilisation de lasers et par une meilleure modélisation dosimétrique. On peut citer l'exemple de la radiochirurgie qui est une méthode de traitement par radiothérapie visant à irradier précisément, en une séance, des

petites lésions intracrâniennes. Elle constitue le plus souvent une alternative au traitement chirurgical en évitant au patient l'ouverture de la boîte crânienne. Les techniques de radiochirurgie utilisent toutes un cadre de stéréotaxie permettant très précisément de positionner le patient et de repérer les lésions à traiter.

En plus de la radiothérapie externe, il existe la curiethérapie. La curiethérapie est une technique de radiothérapie consistant à introduire des sources radioactives dans la tumeur. Ce traitement est ciblé directement à la zone du cancer concernée, grâce à une aiguille très fine, qui permet de placer ses sources à l'intérieur des tissus (peau, sein, langue, prostate...): les effets secondaires dans les autres parties du corps sont donc considérablement réduits. La curiethérapie n'est pratiquée que pour les cancers qui ne se sont pas propagés dans d'autres parties du corps. On distingue deux types de curiethérapie:

- la curiethérapie interstitielle : il s'agit de l'implant de fils à l'intérieur des tissus, dans un tube en plastique qui est placé sous la peau, après anesthésie locale, péridurale, ou générale.
- la curiethérapie endocavitaire : il s'agit de mettre une source radioactive dans les tumeurs dans les cavités naturelles (vagin, utérus, rhinopharynx). Cette technique provoque une grande irritation de la zone traitée, qui s'atténue après quelques semaines.

La RIT (Radio-ImmunoThérapie) est une forme de radiothérapie interne utilisée dans le cas de tumeurs non visualisables en imagerie. Il s'agit de coupler un radioélément émetteur de particule β à un agent de vectorisation, soit un AcMo (monoclonal), ou bien un fragment d'Ac. Ce traitement de radiothérapie interne cible les cellules tumorales avec une plus grande efficacité que la radiothérapie externe, évitant ainsi les effets secondaires au niveau de la peau et des tissus sains. La RIT β a une efficacité prouvée dans le traitement des cancers médullaires de la thyroïde, ainsi que dans les traitements des lymphomes et des leucémies [Goldenberg, 2002]. Le développement de nouveaux émetteurs α est actuellement en cours afin de pouvoir cibler les cancers hématologiques diffus et les micrométastases [Couturier *et al.*, 2005 ; McDevitt *et al.*, 2001].

Enfin, l'hadronthérapie est une technique de radiothérapie qui consiste à irradier à l'aide d'ions lourds comme le carbone. Contrairement aux rayons conventionnels dont le profil de dose délivrée aux tissus diminue progressivement avec la profondeur traversée, celui

des ions est caractérisé par un dépôt de dose élevée en fin de parcours, dénomé pic de Bragg. L'intérêt principal de cette technique, par rapport aux autres thérapies utilisant les rayons X ou γ par exemple, est l'absence de brûlure des tissus sains situés autour de la tumeur. Ceci est lié non seulement à la précision du «tir» mais également aux particules énergétiques elle-mêmes. Grâce à ces propriétés, alliées à une faible diffusion latérale, la dose déposée dans les tissus par des hadrons chargés peut être strictement confinée au volume cible avec une précision nettement plus grande qu'en radiothérapie conventionnelle (X, γ , e^-). Cette technique est encore expérimentale. Des études cliniques ont montré que l'hadronthérapie est utilisable pour le traitement de tumeurs radiorésistantes dont la localisation est critique pour l'utilisation d'une radiothérapie conventionnelle [Jerezek-Fossa *et al.*, 2006].

I.2. Mécanismes moléculaires et cellulaires induits par les radiations

Depuis pratiquement un siècle, les radiations tiennent une place importante dans le traitement des cancers, par l'utilisation de radiothérapie externe, curiethérapie ou encore radioimmunothérapie. Pendant longtemps la mort cellulaire était attribuée au dépôt d'énergie dans l'ADN, créant ainsi des lésions irréversibles. Plus récemment, les recherches en radiobiologie ont mis en évidence l'importance de voies de signalisation induites par les radiations au niveau de la membrane ou bien du cytoplasme.

I.2.1. Cibles moléculaires des radiations

I.2.1.1. L'ADN

Les dommages cellulaires provoqués par les rayonnements ionisants sont dus principalement à leur effets sur l'ADN. Les modifications structurales des molécules d'ADN entraînent des défauts dans le codage génétique, à l'origine de possibles mutations ou de mort cellulaire. Deux types de mécanismes ont été mis en évidence pour expliquer les anomalies de l'ADN. Les radiations ont d'abord un effet direct sur les molécules d'ADN. L'ionisation d'un atome constituant la molécule d'ADN est à l'origine d'une recombinaison avec un autre atome, modifiant la structure chimique de l'ADN (Figure 1).

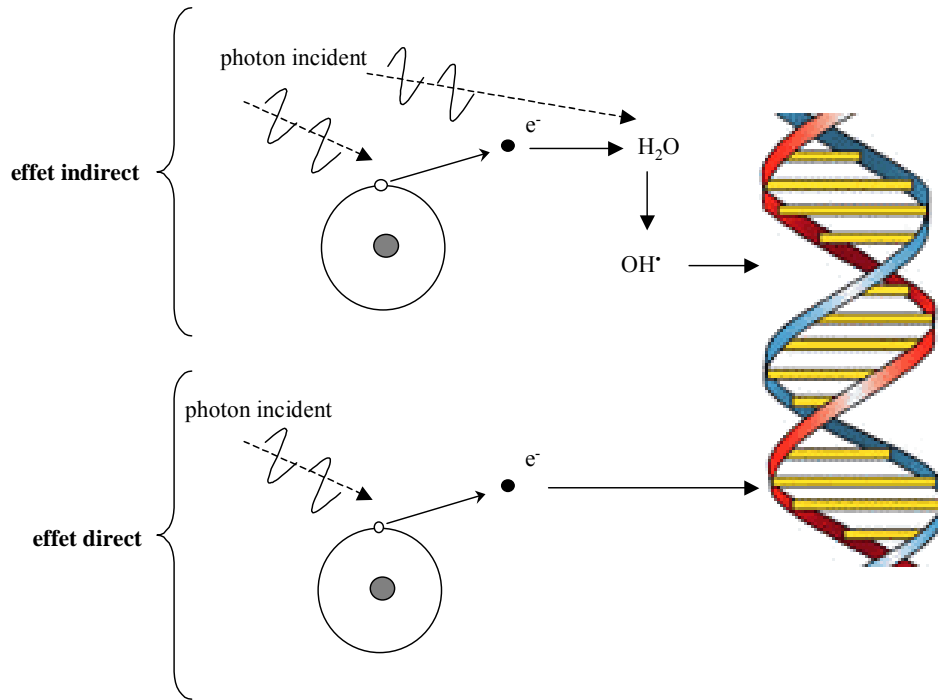


Figure 1 : Action directe et indirecte des radiations sur la molécule d'ADN.

L'effet direct est important pour les rayons de type α , mais a une moindre importance pour ceux de type X ou γ . Le deuxième mécanisme consiste en une radiolyse de l'eau intracellulaire (qui constitue 40 % du poids des organismes vivants) et de l'oxygène à l'origine de la formation de radicaux libres appelés ROS (Reactive Oxygen Species) tels que les radicaux superoxydes O_2^\bullet , les hydroxydes OH^\bullet , ou encore le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Tous ces radicaux ont une forte réactivité avec les constituants biologiques tels que l'ADN (Figure 1).

Les lésions induites par les radiations au niveau de l'ADN sont de plusieurs types et ont des conséquences biologiques plus ou moins importantes selon leur nature [Moustacchi, 2000] (Figure 2):

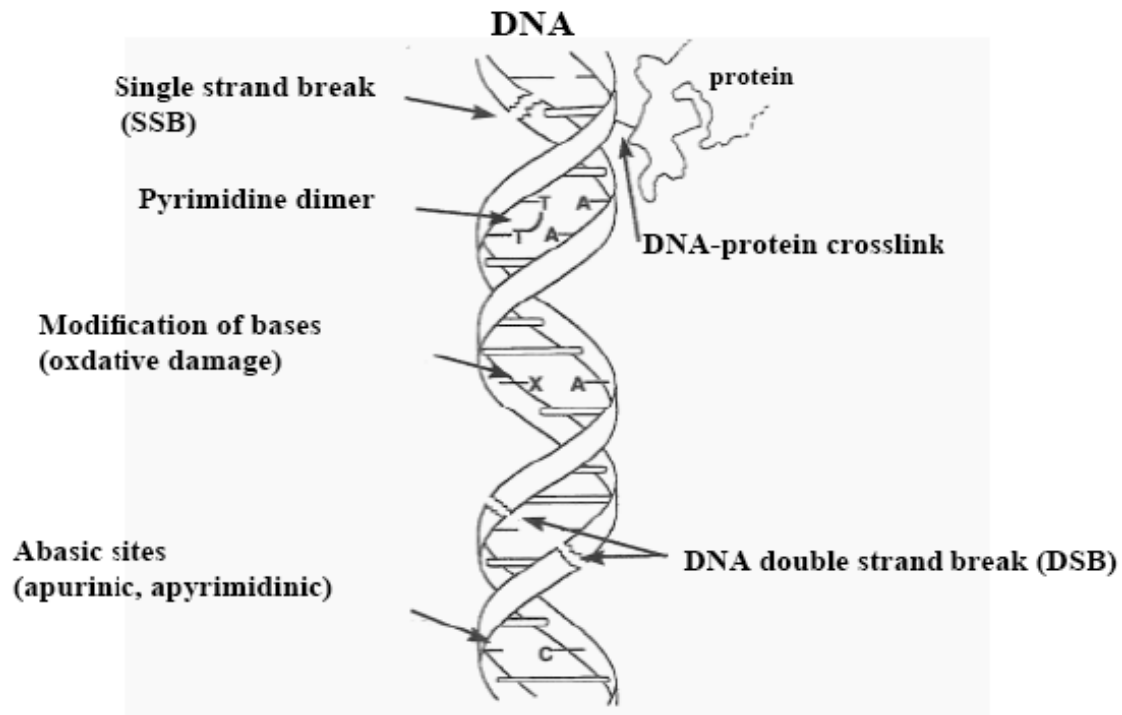


Figure 2 : Schéma des différents types de lésions radioinduites de l'ADN [Friedberg et al., 1995].

- Les dommages concernant les bases regroupent toutes les formes d'altérations telles que l'oxydation, le pontage entre les bases voisines (formation de dimères de thymidine) ou la perte d'une base de l'ADN; leur réparation est rapide et est généralement exécutée en moins de quelques minutes. Elle s'effectue par le processus d'excision-resynthèse [Lindahl and Wood, 1999].
- Les cassures simple brin ou Single Strand Breaks (SSBs) : leur réparation est généralement exécutée en quelques dizaines de minutes par des processus d'excision-resynthèse mais aussi de recombinaison [Lindahl and Wood, 1999].
- Les cassures double brins ou Double Strand Breaks (DSBs) : les DSBs non réparés peuvent conduire, dans certains cas, à la perte définitive de l'information génétique contenue dans la zone altérée. La réparation des DSBs peut prendre plusieurs heures [Frankenberg-Schwager, 1989]. Dans les cellules eucaryotes, il existe deux systèmes de réparation des DSBs qui sont la recombinaison homologue, (majoritaire au cours de la phase G₂ du cycle cellulaire), et la suture ou NHEJ (Non-Homologous End Joining) (intervient au cours des phases G₁, S et G₂) [Durant and Nickoloff, 2005].

- Les pontages inter ou intra-brin d'ADN ou ADN-protéine : ces dommages empêchent la réplication de l'ADN, et leurs mécanismes de réparation sont encore peu connus.

Pour une dose donnée, ces différents types de dommages n'ont pas tous la même importance quantitative (Tableau 1):

<i>Type de dommage</i>	<i>Nombre de dommages par Gray</i>
dommages de base	1000-2000
dommages du sucre	800-1600
cassures simple brin	500-1000
cassures double brin	40
pontage ADN-ADN	30
pontages ADN-protéines	150

Tableau 1 : Types et nombre de lésions radioinduites [Powell and McMillan, 1990].

I.2.1.2. La membrane cellulaire

Des études récentes montrent que la membrane cellulaire est endommagée pendant l'irradiation, et que les dommages membranaires amorcent une signalisation cellulaire importante pour la réponse aux radiations et la mort cellulaire. Ainsi il a été montré que les radiations induisent la peroxydation des lipides de la membrane plasmique (Figure 3).

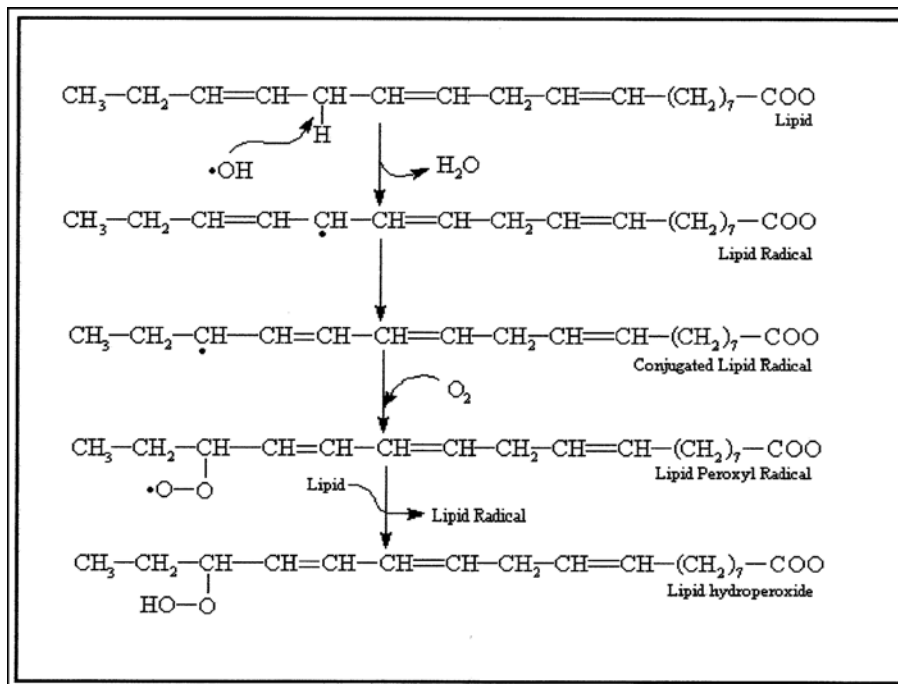


Figure 3: Peroxydation lipidique de la membrane plasmique après irradiation [Albanese and Dainiak, 2003].

Les premières études structurales avaient identifié la membrane plasmique comme une simple interface entre la machinerie intracellulaire et le milieu extracellulaire. Cependant, la membrane plasmique est aujourd'hui reconnue comme un organelle à part entière. Il existe dans la membrane des domaines organisés enrichis en sphingomyéline (SM), en céramide, en phospholipides et en cholestérol appelés rafts, ou radeaux lipidiques. Les cavéoles, des invaginations de 50 à 100 nm de diamètre de la membrane plasmique, contiennent des lipides des rafts et de la cavéoline. Les rafts contiennent différents groupes de protéines, dont les protéines à ancre GPI, certaines tyrosines kinases, des sous-unités $G\alpha$ de protéines G hétéromériques et de la synthase du monoxyde d'azote, des protéines liées au palmitate ou au cholestérol, et des protéines transmembranaires. En cas d'activation de la membrane plasmique, comme par les radiations, les rafts ou cavéoles peuvent fusionner pour former des plateformes lipidiques, entraînant ainsi le rapprochement de différentes protéines ou de récepteurs qui sont alors activés et qui induisent une signalisation intracellulaire [Anderson and Jacobson, 2002; Simons and Toomre, 2000].

Une autre voie de signalisation initiée par la membrane après irradiation est induite par la génération de céramide. Nous discuterons plus en détail de l'implication du céramide dans la réponse aux radiations dans les chapitres ultérieurs (voir chapitre Introduction III).

Enfin, les radiations sont responsables de l'activation de nombreux gènes codant pour des molécules de régulation de la prolifération et de leurs récepteurs associés à la membrane, certains induisant une signalisation anti-apoptotique tels que l'IL-1 (interleukine 1) [Ross *et al.*, 1994], G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), M-CSF (Monocyte-Colony Stimulating Factor) [Sakakeeny *et al.*, 1994], TNF (Tumor Necrosis Factor) [Sherman *et al.*, 1991], et d'autres pro-apoptotiques tels que Fas récepteur [Albanese and Dainiak, 2000b; Reap *et al.*, 1997] et Fas ligand [Albanese and Dainiak, 2000a].

I.2.2. Les effecteurs cellulaires des radiations

Les radiations induisent donc un large spectre de lésions au niveau de l'ADN mais aussi d'autres constituants cellulaires. Ces lésions représentent un signal potentiel qui active des protéines senseurs, induisant ainsi des voies de transduction du signal impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou encore la mort cellulaire.

I.2.2.1. Les protéines senseurs des dommages de l'ADN

Chez les mammifères, différentes protéines sont impliquées dans la reconnaissance ou la réparation des dommages de l'ADN induits par les radiations. On peut citer les protéines PARP (Poly(ADP-Ribose) Polymérase), DNA-PK (DNA Protein Kinase) [Jackson, 1997], p53 [El-Deiry, 2003], le complexe protéique formé par ATM (Ataxia Telangectasia Mutated) et c-Abl [Shiloh, 2001], ATR (Ataxia Telangiectasia Related protein) [Tibbetts *et al.*, 1999], ou le complexe NBS1-MRE11-RAD50 [Carney *et al.*, 1998]. D'autres protéines peuvent reconnaître les dommages radioinduits de l'ADN. Ces protéines senseurs se lient aux dommages de l'ADN, activent des mécanismes tels que la phosphorylation des composants de la voie de transduction du signal dont les composants majeurs sont ATM et ATR, et la combinaison des différents signaux induit la cellule à un arrêt du cycle, à la réparation des dommages ou la mort cellulaire (Figure 4).

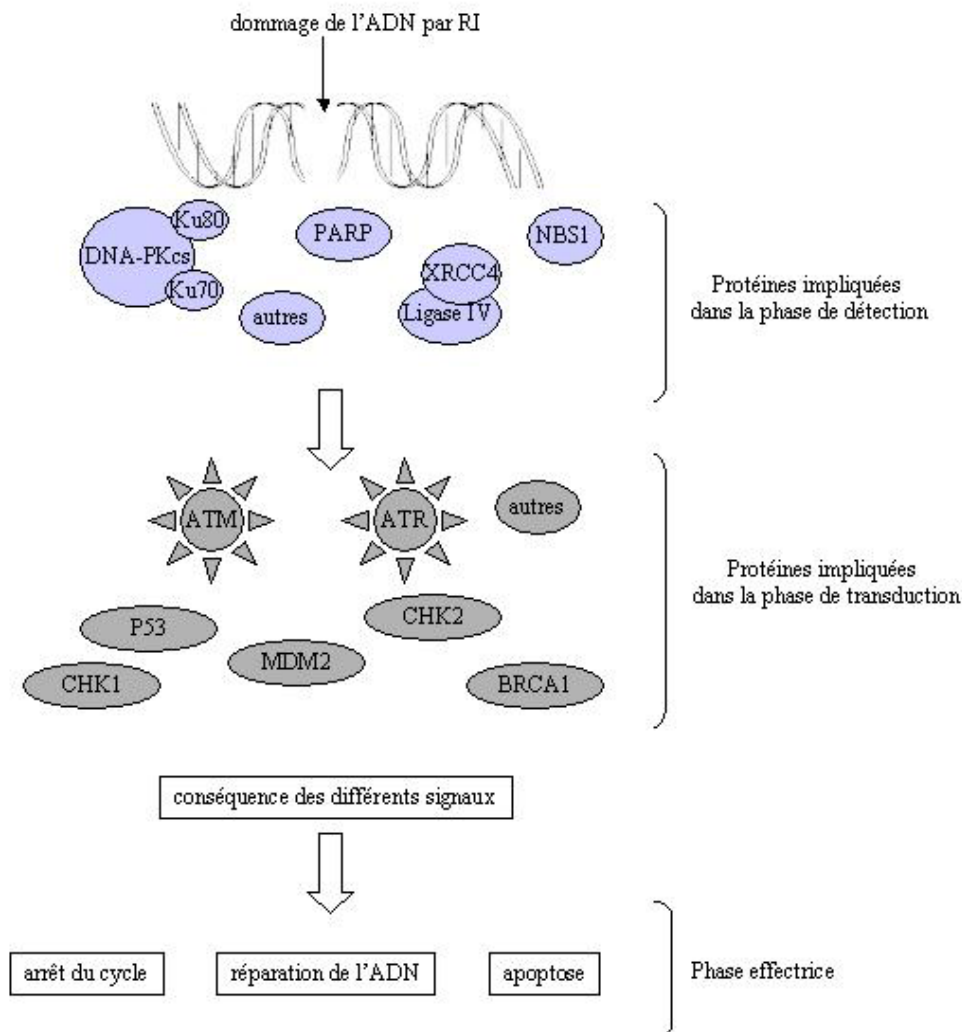


Figure 4 : Cascade de signalisation induite par les dommages radioinduits de l'ADN (d'après [Bourguignon *et al.*, 2005]).

La protéine p53 impliquée dans la signalisation induite par les radiations fait l'objet d'une étude particulière depuis de nombreuses années. Découverte en 1979 par co-immunoprécipitation avec l'antigène grand T de SV40 (Simian Virus 40), [Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979], elle a d'abord été identifiée comme un oncogène, avant d'être caractérisée comme étant un gène suppresseur de tumeur [Finlay *et al.*, 1989]. En tant que facteur de transcription ou par son interaction directe avec d'autres molécules, p53 est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la méiose, l'embryogenèse, la sénescence, la différenciation, l'apoptose, la réplication, la recombinaison, la reconnaissance des lésions, la réparation de l'ADN, ou encore l'arrêt du cycle cellulaire.

Les dommages de l'ADN induisent une augmentation de la phosphorylation de p53 par ATM, ATR ou encore DNA-PK [Shieh *et al.*, 1997], empêchant ainsi sa protéolyse suite à sa liaison avec l'oncogène MDM2. La demi-vie de p53 dans le noyau est ainsi augmentée, et elle active la transcription de nombreux gènes, tels que *p21 Waf1/cip1*, un inhibiteur de la kinase CDK4-cycline E (Cycline Dependant Kinase) impliqué dans l'arrêt en G₁ du cycle cellulaire [Sherr and Roberts, 1999; Zhou and Elledge, 2000]. p53 se lie de façon non spécifique aux SSBs et DSBs [Levine, 1997], et elle est impliquée dans les deux principales voies de réparation, soit la recombinaison via les protéines RAD51, BRCA1 [Sturzbecher *et al.*, 1996], et la NHEJ par son interaction avec les protéines NBS et DNA-PK [Kachnic *et al.*, 1999].

I.2.2.2. Les protéines de réparation de l'ADN

La recombinaison consiste à remplacer la séquence d'ADN endommagée par celle du chromosome homologue, il s'agit alors de recombinaison homologue [Thyagarajan *et al.*, 1996]. Ce type de réparation est majoritaire pendant les phases S et G₂ du cycle cellulaire. Les DSBs sont repérés par la protéine Rad52 qui coulisse le long de l'ADN et recrute ensuite Rad51. Elle forme avec l'aide d'autres protéines RPA, XRCC2, XRCC3, BRCA1 et BRCA2 un nucléofilament qui rapproche les brins homologues ou non près du site de réparation.

Pour les mammifères, le système NHEJ est le principal système de réparation des DSBs. Ce type de réparation est majoritaire pendant la phase G₁ du cycle cellulaire. L'hétérodimère formé par Ku80 et Ku70 [Walker *et al.*, 2001] coulisse le long de l'ADN. Quand il parvient à une cassure, il subit un changement conformationnel et se lit alors à la protéine DNA-PKcs (DNA Protein Kinase catalytic subunit), formant un nouveau complexe

appelé DNA-PK. Celui-ci phosphoryle les protéines histones, permettant ainsi le recrutement des protéines de réparation Ligase 4 et XRCC4.

En ce qui concerne les pontages inter ou intra-brin, il a été montré que la protéine RAD51d, de la famille de Rad51, forme un complexe avec la protéine XRCC2 afin de permettre la réparation de pontages inter-brins [Smiraldo *et al.*, 2005]. De plus, il a été montré dans la lignée DT40 (cellules B de poulet) que les protéines SNM1A et PIAS1 sont nécessaires à la réparation des pontages interchaîne de l'ADN. SNM1A et PIAS1 interagissent et sont co-localisées dans le noyau [Ishiai *et al.*, 2004]. De plus des études sur cellules embryonnaires fibroblastiques de souris ont mis en évidence le rôle de l'endonucléase ERCC1 et de la protéine XPF dans la réparation des pontages intrachaîne de l'ADN [Niedernhofer *et al.*, 2004].

Dans les systèmes eucaryotes, l'ADN est condensé en nucléosomes, constitués de séquences de 145 paires de bases et de 8 protéines histones (H1 à H4) (Figure 5).

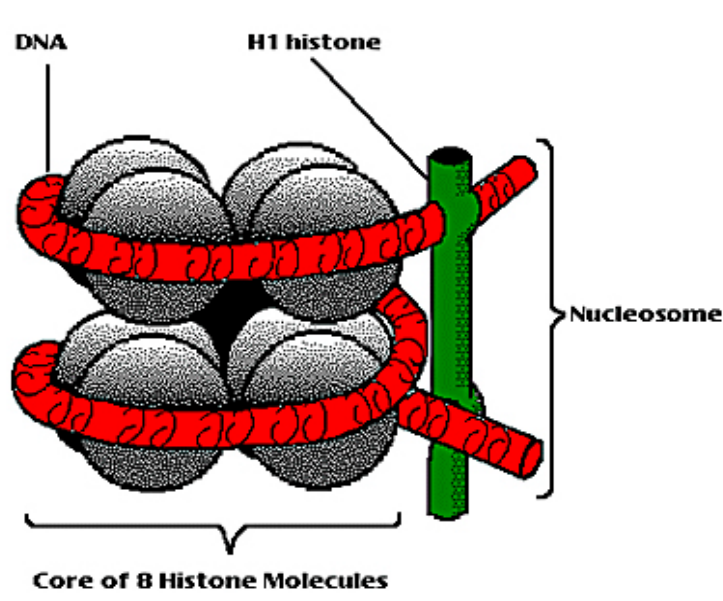


Figure 5 : Structure d'un nucléosome.

Lors de l'activation des sérine-thréonine kinases de la famille PI3K comme DNA-PKcs, ATM ou encore ATR, [Smith and Jackson, 1999; Zhou and Elledge, 2000], l'histone H2AX est phosphorylé sur son résidu sérine 139 suite aux dommages de l'ADN induits par les radiations, avec un pic de phosphorylation dans la première heure qui suit l'irradiation [Rogakou *et al.*, 1998]. Cette phosphorylation de l'histone H2AX (γ H2AX) représente donc des événements précoces qui suivent la formation de DSBs. Le taux de diminution de γ H2AX est un facteur important dans la réponse des cellules aux radiations, les diminutions rapides

étant associées aux lignées résistantes qui réparent vite leurs dommages de l'ADN [MacPhail *et al.*, 2003].

I.2.2.3. Les protéines du cycle cellulaire

L'exposition aux radiations altère la progression du cycle cellulaire. La majorité des cellules eucaryotes supérieures présente un pic de radiosensibilité à la transition des phases G₁-S et G₂-M, la phase S étant la phase la plus radiorésistante [Sinclair and Morton, 1966; Skwarchuk *et al.*, 1993; Terasima and Tolmach, 1963] (Figure 6).

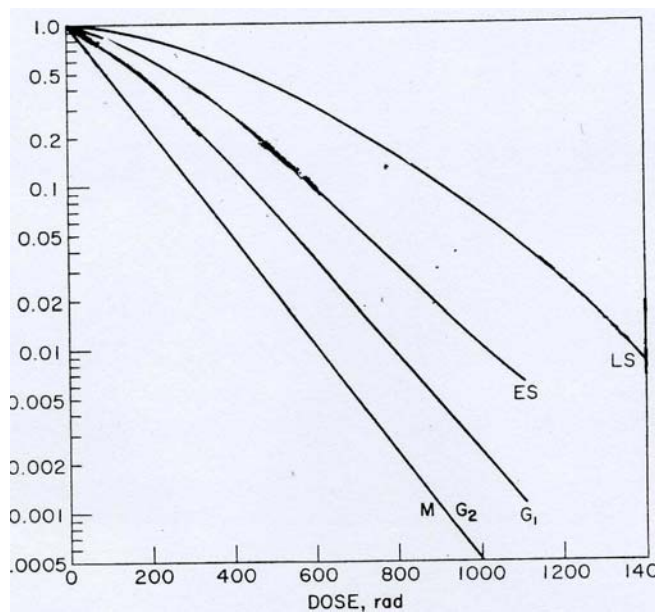


Figure 6 : Schéma de la radiosensibilité des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) en fonction de leur position dans le cycle cellulaire. (ES: early phase S, LS: Late phase S) [Sinclair, 1968].

Ainsi, toutes les lignées marquent un arrêt en phase G₂ [Rao, 1980], et les lignées exprimant une protéine p53 normale marquent un arrêt en G₁ [Kuerbitz *et al.*, 1992]. L'irradiation de fibroblastes humains normaux induit un arrêt complet en G₁ suivi de l'entrée en quiescence ou en sénescence [Seidita *et al.*, 2000]. Les arrêts aux points de restriction sont dus à l'activation d'un signal cellulaire induit par la reconnaissance des dommages de l'ADN radioinduits [Hartwell and Weinert, 1989; Murray, 1992] (Figure 7), permettant à la cellule de mettre en place les mécanismes de réparation pour empêcher les anomalies de réplication (transition G₁-S), ou les aberrations chromosomiques pendant la mitose (transition G₂-M). Ainsi lorsque le point de contrôle G₂ est inhibé, les cellules montrent un nombre d'aberrations chromosomiques plus important que celles qui ont un arrêt normal en G₂ [Olivieri and Micheli, 1983].

- L'arrêt en G₁ est associé à l'augmentation de l'expression de p21^{WAF1} qui se lie aux complexes CyclineE-CDK2 et CyclineD-CDK4 pour les inhiber, ainsi qu'à l'augmentation de l'expression de GADD45 qui se lie à PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) pour arrêter les fourches de réplication et promouvoir la réparation de l'ADN [Favaudon, 2000]. Cet arrêt, dépendant de p53, est déterminant pour le maintien de l'intégrité du génome, empêchant ainsi l'amplification des dommages en mutations irréversibles.
- L'arrêt en G₂ est associé à une inhibition de l'activité kinase de CDK1 [Lock and Ross, 1990], à une diminution de la transcription de la Cycline B [Hwang *et al.*, 1995], ou une inhibition de sa translocation vers le noyau [Smeets *et al.*, 1994].

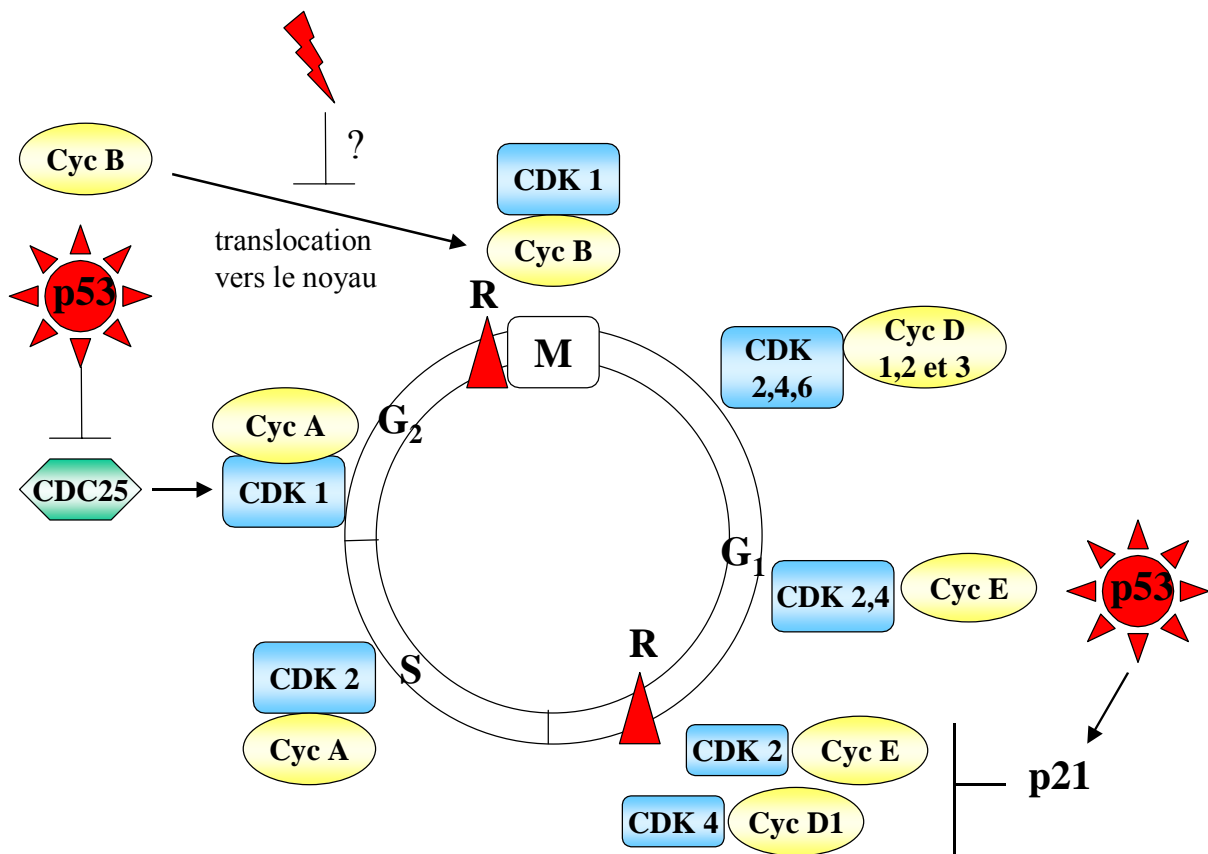


Figure 7 : Schéma des points d'action des différents complexes cyclines-CDK et régulation radioinduite du cycle cellulaire. R : point de restriction.

I.2.2.4. Voies de signalisation dépendantes de la membrane

Le modèle classique de mosaïque fluide de Singer et Nicolson [Singer and Nicolson, 1972] a été modifié depuis quelques années avec la mise en évidence de microdomaines dans la membrane plasmique qui ont des fonctions de signalisation [Simons and Ikonen, 1997]. En

effet, l'interaction des sphingolipides membranaires les uns avec les autres ainsi qu'avec le cholestérol résulte en la ségrégation de ces lipides en structures membranaires distinctes appelés rafts [Simons and Ikonen, 1997]. Leur taille varie de 30 à 300 nm. Le céramide ayant une fonction de fusion membranaire [Nurminen *et al.*, 2002], lorsqu'il est généré il induit un regroupement de ces microdomaines pour former de larges plateformes excluant le cholestérol [Holopainen *et al.*, 1998; Nurminen *et al.*, 2002]. Ces plateformes enrichies en céramide sont rapidement formées après les radiations, mais aussi après une stimulation par CD95 ou CD40, les rayons UV, la chaleur, ou encore les infections virales ou bactériennes [Gulbins and Kolesnick, 2003].

Les radiations entraînent un large spectre de lésions au niveau des macromolécules cellulaires, comme par exemple la peroxydation lipidique due aux ROS. Ces lésions peuvent activer de nombreuses voies de signalisation telles que celles dépendantes de PKC (Protein Kinase C), JNK (Jun N-terminal Kinase) ou des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). Trois familles de MAPK ont été identifiées comme étant activées après irradiation : la famille ERK (Extracellular Receptor-activated Kinase), JNK/SAPK (Stress-Activated Protein Kinase), et la voie p38. L'activation des MAPK est induite par une séquence de phosphorylations spécifiques, induisant la phosphorylation et l'activation de facteurs de transcription comme par exemple la protéine AP-1 ou encore NF- κ B (Nuclear Factor κ B) [Canman and Kastan, 1996; Devary *et al.*, 1993; Rosette and Karin, 1996]. Les résultats physiologiques sont la prolifération, l'apoptose ou encore la différenciation. La surexpression de JNK/SAPK dans des cellules T est liée à l'induction de l'apoptose après exposition aux radiations [Chen *et al.*, 1996].

Tout comme les réponses de stress activées par les dommages de l'ADN, ces mécanismes de signalisation induits par les récepteurs de surface et dommages à la membrane affectent donc la sensibilité cellulaire aux radiations [Chen *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996].

I.2.2.5. Voies de signalisation dépendantes de la mitochondrie et des caspases effectrices

La mitochondrie, puisqu'elle possède son propre ADN cellulaire, est une cible des radiations par leur action directe sur l'ADN mitochondrial, et par leur effet indirect dû aux radicaux libres qui peuvent altérer la membrane mitochondriale. Quand la mitochondrie est endommagée directement par les rayons γ [Scaife, 1966] ou par le céramide généré lors de

l'irradiation [Garcia-Ruiz *et al.*, 1997] elle subit une perte de potentiel transmembranaire, suivi d'un relargage de cytochrome C dans le cytoplasme. Le cytochrome C peut être relargué par une rupture de la membrane mitochondriale, ou bien par l'activation de pores membranaires (Figure 8) et forme alors un complexe appelé apoptosome avec les protéines Apaf-1 et procaspase 9 [Li *et al.*, 1997]. Les caspases sont des protéases qui sont régulées par clivage d'un pro-domaine. La formation de l'apoptosome entraîne le clivage de la procaspase 9 en caspase 9 active, qui clive à son tour la procaspase 3. La caspase 3 activée inhibe par clivage des protéines de structure telles que les lamines de la membrane nucléaire, des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN telles que PARP, DNA-PK, ou encore des protéines cytoplasmiques comme ICAD (Inhibitor of Caspase-Activated DNase). Une fois inactivée ICAD libère la protéine CAD (Caspase-Activated DNase) qui participe à la fragmentation de l'ADN. Le clivage de toutes ces protéines induit la cellule dans une voie apoptotique [Scaffidi *et al.*, 1999]. De plus, lorsque les dommages de l'ADN ne sont pas réparés, p53 active la transcription de Bax, un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, qui peut induire directement l'apoptose en favorisant la libération du cytochrome C au niveau des mégapores des mitochondries. La libération du cytochrome C est aussi activée par le fragment C-terminal de la protéine Bid. Bid est en effet clivée par la caspase 8 activée par les récepteurs de mort tels que CD95 [Kuwana *et al.*, 1998]. La mitochondrie permet aussi l'activation des caspases en activant les protéines Smac/DIABLO qui inhibent les IAPs (Inhibitors of Apoptosis Proteins), bloquant les fonctions des caspases 3 ou 9 [Fulda and Debatin, 2006]. Des membres de la famille Bcl-2, Bcl-XL, facteur anti-apoptotiques, sont capables d'inhiber cette induction de la voie des caspases [Yang *et al.*, 1997]. La mitochondrie a donc un rôle prépondérant dans la réponse aux radiations, et constitue une plaque tournante dans l'activation des caspases après un stress tel que les radiations, Bax ou encore les ROS (Figure 8). Elle est l'acteur majeur de la voie apoptotique.

Il faut cependant noter que les caspases sont des protéines cytosoliques qui peuvent être activées indépendamment de la mitochondrie. Les dommages à la membrane induits par les radiations peuvent activer certains récepteurs de mort tels que CD95 qui induit un clivage de la procaspase 8 en caspase 8, qui une fois active clive à son tour la procaspase 3 en caspase 3 [Walczak and Krammer, 2000].

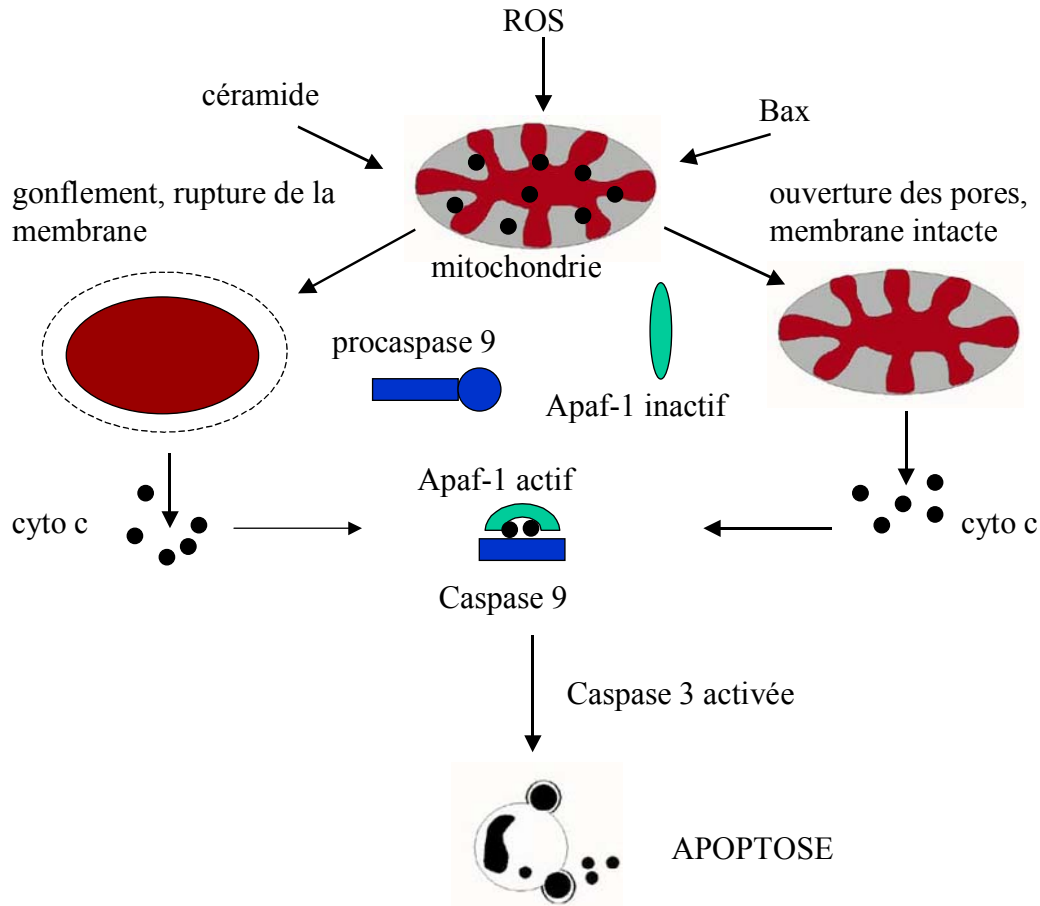


Figure 8 : Schéma représentatif de l'activation des caspases par la mitochondrie.

I.2.3. Les effets de voisinage ou effet bystander des radiations

En plus des effets directs induits par les radiations, il existe aussi des effets indirects induits par les cellules irradiées aux cellules voisines non irradiées. Il s'agit de l'effet bystander encore appelé effet de voisinage. Depuis quelques années, de nombreuses études ont mis en évidence l'induction par l'irradiation de mutations, d'échanges de chromatides sœurs, de formations de micronoyaux et de variations dans l'expression génique des cellules non irradiées mais proches de cellules qui sont directement irradiées [Suzuki *et al.*, 2006]. Ces études montrent que certains signaux induits par l'irradiation dans les cellules directement touchées peuvent être transmis aux cellules voisines non irradiées par une communication intercellulaire [Azzam *et al.*, 1998], ou bien par le relargage de facteurs solubles dans le milieu de culture [Mothershill and Seymour, 1998]. L'effet bystander est comparé à une réaction de type inflammatoire. Les signaux en cause dans les effets dits bystander sont divers (facteurs clastogéniques ou substances susceptibles d'endommager les chromosomes, passage

d'espèces actives de l'oxygène et d'autres molécules par les canaux de jonction, stimulation de la production d'espèces actives de l'oxygène). Les conséquences du signal bystander sur les cellules voisines sont également multiples (apoptose, induction d'une instabilité génétique, mort différée, mutations), et elles dépendent de nombreux facteurs encore mal identifiés.

I.3. Les différents types de mort radioinduite

I.3.1. Classification des types de mort cellulaire

Les différents types de mort ont dans un premier temps été définis par des caractéristiques morphologiques, sans tenir compte des mécanismes biochimiques impliqués. En 2005, le Comité sur la Mort Cellulaire a établi une nomenclature, « The Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD) afin de clarifier les différents types de mort et d'empêcher les déviations d'utilisation des différents termes [Kroemer *et al.*, 2005]. Ainsi, le NCCD définit 8 types de mort cellulaire :

- L'apoptose : le terme d'apoptose a été proposé par Kerr et ses collaborateurs [Kerr *et al.*, 1972] afin de définir le type de mort accompagné d'un arrondissement de la cellule, d'une rétractation des pseudopodes, d'une réduction du volume cellulaire, soit la pycnose, d'une condensation de la chromatine et d'une fragmentation du noyau. Il n'y a pas ou peu de modification des organelles, pas de formation de vésicules de la membrane avant les derniers stades de la mort par apoptose.
- L'autophagie : ce type de mort n'induit pas de condensation de la chromatine, mais la formation de grosse vacuoles dans le cytoplasme qui possèdent deux membranes et contiennent les organelles cytoplasmiques en dégénérescence, ou encore le cytosol [Levine and Klionsky, 2004].
- La nécrose ou l'oncose : elle est caractérisée par un gonflement du cytoplasme, une rupture de la membrane plasmique, une dilatation des organelles tels que les mitochondries, le réticulum endoplasmique ou encore l'appareil de Golgi, et une condensation modérée de la chromatine [Jonathan *et al.*, 1999].
- La catastrophe mitotique : ce type de mort apparaît pendant ou après une mitose défectueuse et est accompagné de caractères morphologiques tels que la formation de micronoyaux (soit des fragments de chromosomes non distribués entre les noyaux formés pendant la mitose), ou encore de multinucléation (soit la présence

de plusieurs noyaux due à un problème de séparation pendant la cytokinèse) [Miranda *et al.*, 1996].

- L'anoikis : ce type de mort est en fait caractérisé par les marqueurs apoptotiques, et est induit par un détachement de la cellule de son substrat, ou encore des autres cellules.
- L'excitotoxicité : ce type de mort est cantonné aux neurones lorsque leurs canaux calciques sont activés, augmentant la concentration cytoplasmique en Ca^{2+} (calcium) [Orrenius *et al.*, 2003].
- La cornification : il s'agit d'une forme de mort très spécifique restreinte aux cellules épithéliales de l'épiderme, conduisant à la formation de cornéocytes, soit d'enveloppes cornifiées. Ce type de mort est aussi appelé kératinisation [Candi *et al.*, 2005].

Auparavant, les mécanismes responsables de la mort des cellules induite par les radiations étaient classés en deux formes distinctes appelées mort interphasique et mort reproductive [Dewey *et al.*, 1995; Radford, 1991; Shinohara and Nakano, 1993; Yamada and Ohyama, 1988]. La mort interphasique était généralement caractérisée par des marqueurs apoptotiques [Yamada and Ohyama, 1988], tandis que la mort reproductive incluait non seulement les cellules nécrotiques, mais aussi les cellules vivantes ayant perdu leur capacité reproductrice [Thompson and Suit, 1969]. Elles étaient basées sur des concepts classiques de radiobiologie utilisant les tests de survie clonogénique [Puck and Marcus, 1956]. En effet, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'induction de la mort radioinduite étaient peu connus. Depuis, la mort radioinduite peut être classée en deux modes distincts, tenant compte de la progression de la cellule dans le cycle cellulaire, en sachant que l'apoptose tient une place prépondérante dans ces deux types de mort nommés mort prémitotique ou mort postmitotique.

D'autres types de mort ont été caractérisés comme étant impliqués dans la mort radiobiologique. On peut citer la sénescence, l'intercinèse (ou disparition physique quasi immédiate après des doses d'irradiation très élevées, faisant intervenir les lysosomes), ou encore la pyknose. Ces morts ont été caractérisées par des observations au microscope. Cependant, il s'agit surtout d'étapes particulières des types de mort décrits précédemment.

I.3.2. La mort prémitotique

Le mort prémitotique est classiquement appelée apoptose, ou encore apoptose prémitotique. Elle correspond à l'apoptose définie par le NCCD. Il s'agit du type de mort qui apparaît généralement immédiatement ou dans les premières heures après irradiation [Shinomiya *et al.*, 2000]. Elle est classiquement reconnue par la coupure de l'ADN en fragments de 200 paires de bases ([Radford and Murphy, 1994; Radford *et al.*, 1994]. On trouve les notions de « homo-phase » apoptose quand la cellule entre en apoptose pendant la même phase du cycle cellulaire que celle ou elle a initialement été affectée, et « homo-cycle » apoptose, quand elle entre en apoptose dans le même cycle cellulaire que celui où le stress a été subit [Halicka *et al.*, 1997].

L'apoptose prémitotique est généralement induite par les dommages de l'ADN via un mécanisme impliquant p53 et l'activation transcriptionnelle de Bax [Miyashita *et al.*, 1994; Miyashita and Reed, 1995; Zhan *et al.*, 1994], induisant la cellule dans une voie apoptotique dépendante de la mitochondrie. Cette apoptose est aussi induite par les dommages causés par les ROS activant la voie mitochondriale [Green and Reed, 1998], ainsi que par la génération du céramide [Haimovitz-Friedman *et al.*, 1994b]. Puisque l'apoptose prémitotique est une mort rapide, une activation de la caspase 3 cytoplasmique préexistante peut être impliquée dans ce processus. L'addition de l'inhibiteur de caspase 3, Ac-DEVD-CHO, empêche le clivage de PARP dans les cellules U937 irradiées à 20 Gy [Shinomiya *et al.*, 2000].

L'apoptose prémitotique se retrouve dans tous les types cellulaires, que ce soit les cellules saines ou tumorales. Elle a par exemple été mise en évidence dans des cellules de mélanome [Meijer *et al.*, 2005] mais aussi dans des spermatogonies [Jahnukainen *et al.*, 2000]. De façon générale, l'apoptose prémitotique regroupe tout phénomène d'apoptose induit par les dommages de l'ADN ou bien par ceux à la membrane générés lors d'une irradiation, et ce phénomène s'opère indépendamment de l'avancée de la cellule dans le cycle cellulaire et de façon assez rapide.

1.3.3. La mort postmitotique

La mort postmitotique est aussi connue sous le nom de mort mitotique. Elle correspond à la catastrophe mitotique définie par le NCCD, résultant de mitoses aberrantes. Ces mitoses ne créent pas de ségrégation chromosomique et de division cellulaire correctes. Elles conduisent généralement à la création de grosses cellules parfois polyploïdes [Nagl,

1990] avec un ou plusieurs micronoyaux [Abend *et al.*, 1996; Heddle and Carrano, 1977]. Ce phénomène implique souvent un blocage en G₂-M du cycle cellulaire et est suivi d'une mitose défectueuse ou incomplète [Sleiman and Stewart, 2000]. Cette forme de mort est un phénomène assez lent qui apparaît après une ou plusieurs divisions cellulaires [Radford and Murphy, 1994].

Les SSBs mal réparés peuvent être amplifiés en DSBs qui peuvent, après mitose, donner naissance à des anomalies chromosomiques soit instables (chromosomes dicentriques, acentriques, anneaux), ou bien stables (translocations), des mutations et des recombinaisons génétiques (Figure 9).

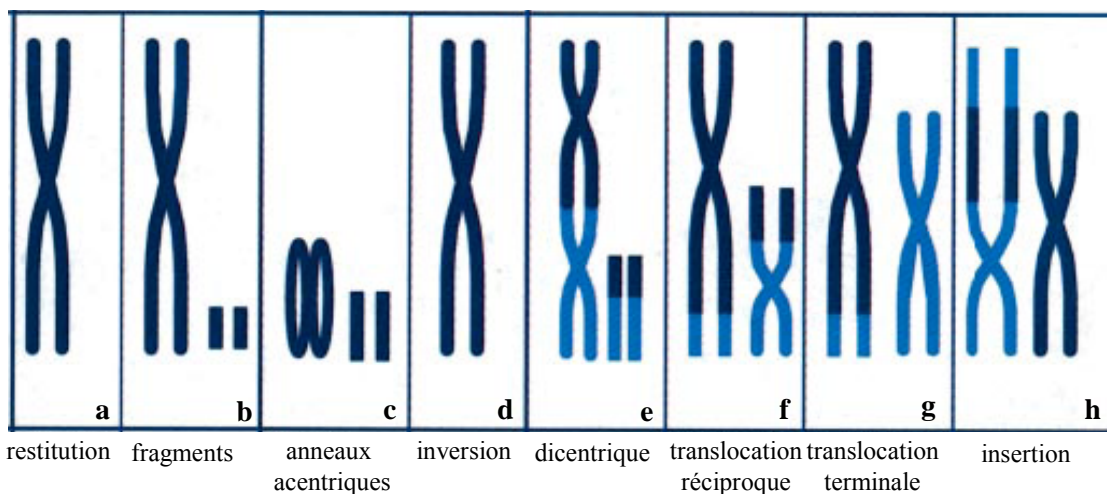


Figure 9 : Schéma des aberrations chromosomiques après irradiation. Dans le cas d'une cassure sur 1 chromosome (a-d), on peut obtenir une restitution (a), des fragments (b), des acentriques (c), ou des inversions des bras p et q (d); dans le cas d'une cassure sur deux chromosomes (e-h), on peut obtenir un dicentrique (e), une translocation réciproque (f), une translocation terminale (g), ou une insertion (h).

Les fragments acentriques sont expulsés du noyau et conduisent à la formation de micronoyaux : il s'agit de l'exonucléose. Ce micronoyau peut subir, tout comme le noyau principal, les condensations et décondensations de la chromatine en suivant le cycle cellulaire. L'exocytose du micronoyau est souvent la dernière étape de la mort mitotique. Cette mort mitotique a été caractérisée comme étant la forme majeure de mort après les radiations [Jonathan *et al.*, 1999]. La catastrophe mitotique est souvent confondue avec une phase précoce de l'apoptose, puisque dans de nombreux types cellulaires elle est généralement suivie d'apoptose ou de nécrose [Demarcq *et al.*, 1994; Jordan *et al.*, 1996].

Les radiations régulent donc de nombreux processus cellulaires tels que le cycle cellulaire, la réparation ou la prolifération par de multiples voies. Ces voies dépendent de la

cible cellulaire touchée (ADN, membrane plasmique et ses composants, mitochondrie, protéines cytoplasmiques), et ses cibles activent de nombreuses voies de signalisation telles que la voie des sphingolipides, des MAPK, PI3K (Phosphoinositol-3 Kinase), ou encore les caspases (Figure 10).

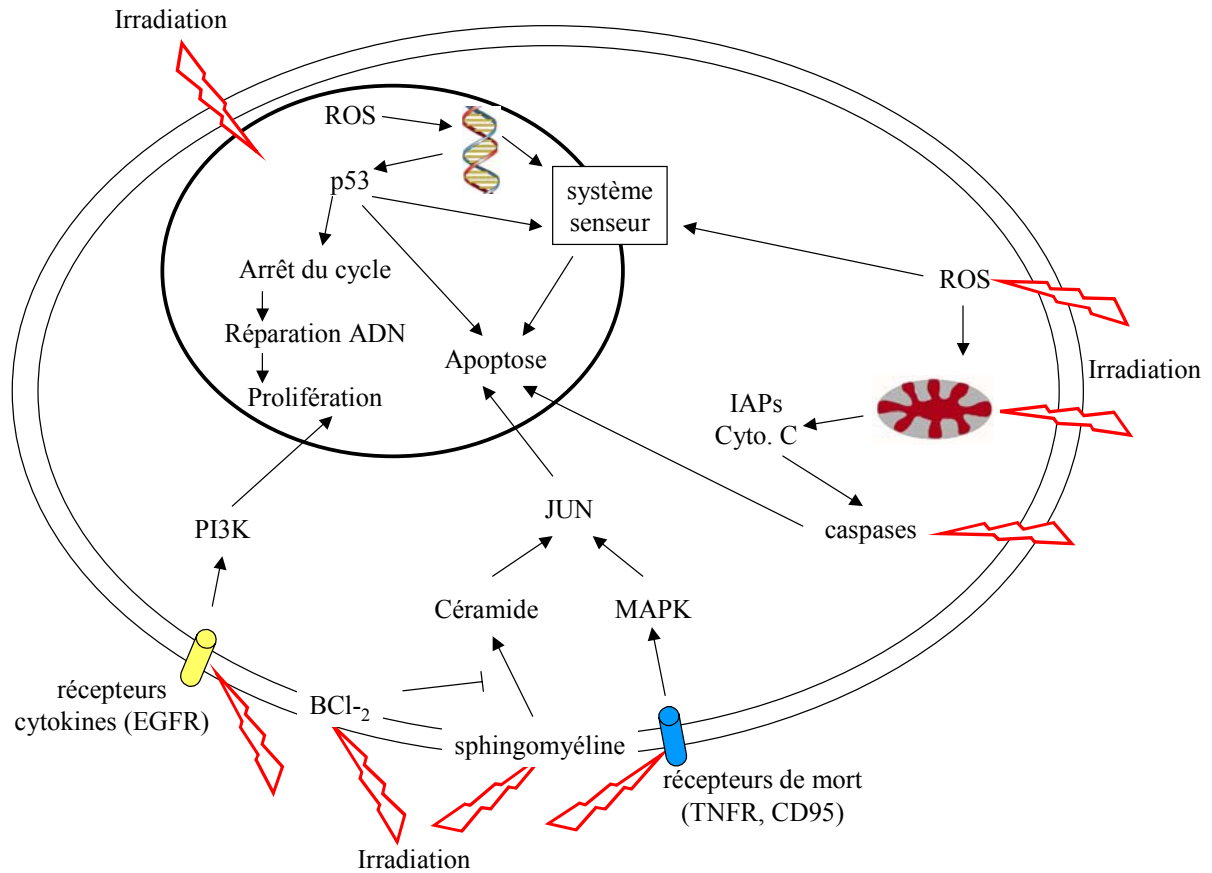


Figure 10: Signalisation et conséquences cellulaires induites par les radiations (d'après [Pouget and Mather, 2001]).

La mort induite par ces différentes voies lors d'une irradiation touche non seulement les cellules tumorales en cas de radiothérapie, mais aussi les cellules saines comme par exemple les cellules endothéliales.

II IMPLICATION DES CELLULES ENDOTHELIALES DANS LA REPOSE DU TISSU SAIN ET TUMORAL APRES IRRADIATION

II.1. L'angiogenèse

Les cellules de mammifères ont besoin d'oxygène et de nutriments pour leur développement et leur survie. Ainsi, elles sont généralement collées ou localisées à une distance maximale de 100 à 200 μm des vaisseaux sanguins qui leurs permettent l'apport en oxygène et nutriments nécessaires. Cette distance est la limite de diffusion de l'oxygène [Carmeliet and Jain, 2000]. Au delà, les cellules recrutent de nouveaux vaisseaux sanguins par les mécanismes de vasculogenèse ou d'angiogenèse [Risau, 1997]. Le terme d'angiogenèse n'est pas récent puisqu'en 1787, un chirurgien britannique, le Dr John Hunter, utilise pour la première fois le terme « angiogenesis » pour décrire la croissance des vaisseaux sanguins dans les bois de rennes. Plus tard, en 1935, un pathologiste, le Dr Arthur Tremain Hertig, décrit l'angiogenèse dans le placenta des guenons prégnantes [Tobelem, 2000].

II.1.1. Définitions

La vasculogenèse consiste en la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par le recrutement à partir de la moelle osseuse de progéniteurs de cellules endothéliales, les angioblastes. Elle est prépondérante pendant l'embryogenèse, et on la retrouve dans la cancérogenèse lorsque les cellules tumorales recrutent des progéniteurs angioblastiques afin de former de nouveaux vaisseaux [Carmeliet, 2000]. Les progéniteurs sont recrutés à partir de la moelle osseuse et se différencient *in situ* en cellules endothéliales.

Le terme d'angiogenèse fut tout d'abord utilisé pour décrire la croissance de bourgeonnement endothélial à partir d'un vaisseau préexistant. Plus récemment, le terme d'angiogenèse est utilisé pour décrire la croissance et le remodelage d'un réseau primitif existant en un réseau vasculaire complexe [Carmeliet, 2000]. Elle intervient au cours de la vie adulte dans l'implantation du placenta, la cicatrisation, mais aussi dans certains processus pathologiques (tableau 2).

<i>Développement</i>
Système cardiovasculaire Vascularisation des organes : cerveau, foie, moelle osseuse
<i>Physiologie</i>
Cycle hormonal féminin: utérus Grossesse: placenta, glandes mammaires Cicatrisation et réparation des fractures
<i>Maladies</i>
Croissance tumorale Néovascularisation oculaire Hémangiomes Arthrose rhumatoïde Artériosclérose (plaques de néovascularisation)

Tableau 2 : *Angiogenèse au cours du développement normal et pathologique.*

II.1.2. L'angiogenèse tumorale

Au cours de l'angiogenèse tumorale, de nouveaux capillaires se forment à partir de capillaires préexistants ou de veinules post-capillaires. En réponse à des stimulus angiogéniques relargués par les cellules tumorales, les cellules endothéliales sont activées, induisant une vasodilatation locale, une augmentation de la perméabilité vasculaire, et une accumulation de fibrine extravasculaire [Carmeliet and Jain, 2000]. Ces phénomènes sont suivis d'une dégradation de la membrane basale du vaisseau parent. Des processus cytoplasmiques sont alors mis en place à partir des cellules endothéliales activées, et une migration dirigée prend place vers le stimulus angiogénique issu de la tumeur (Figure 11). Les cellules endothéliales migrantes s'alignent les unes aux autres pour former un bourgeonnement capillaire, et les cellules endothéliales en prolifération augmentent ensuite la taille du capillaire à partir de l'apex du bourgeon. Le bourgeon développe alors une lumière proximale à la région de prolifération [Pepper, 1996]. La maturation du vaisseau se termine par la reconstitution de la membrane basale [Ausprunk and Folkman, 1977; Paku and Paweletz, 1991].

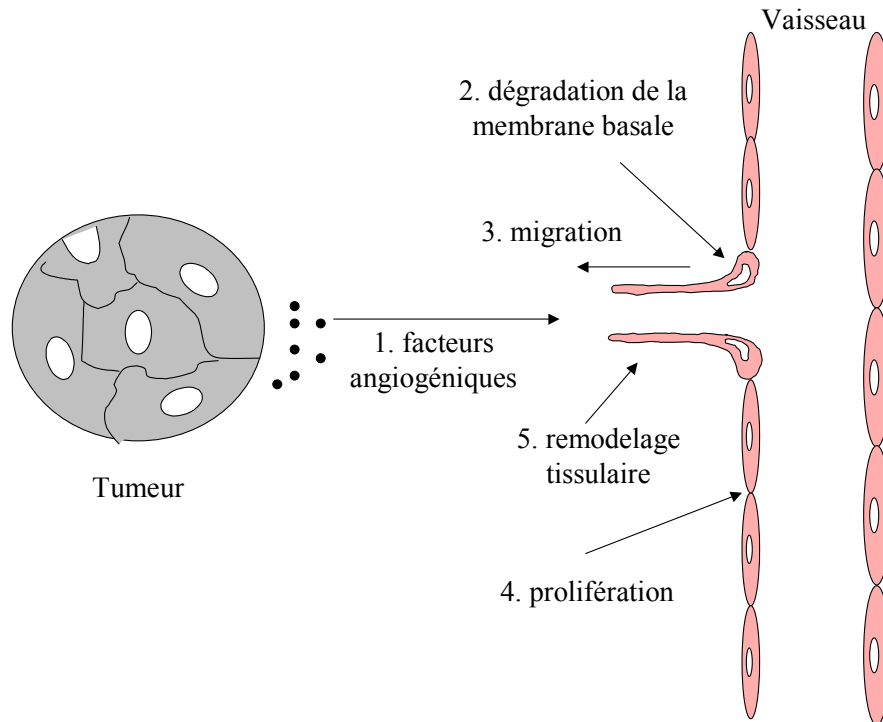


Figure 11 : Principales étapes impliquées dans l'activation des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse.

Dans un organisme adulte sain, le renouvellement des cellules endothéliales est un processus très limité. En effet, à un temps donné, 0,01 % des cellules endothéliales sont en division [Engerman *et al.*, 1967; Hobson and Denekamp, 1984]. Le maintien de la quiescence des cellules endothéliales est dû à la dominance des facteurs anti-angiogéniques par rapport aux facteurs pro-angiogéniques [Folkman, 1995b; Liotta *et al.*, 1991; Pepper *et al.*, 1996]. Au cours de l'angiogenèse tumorale, la dominance continue des régulateurs positifs conduit à une croissance incontrôlée des cellules endothéliales. Ces régulateurs agissent directement ou bien indirectement par l'intermédiaire de régulateurs inflammatoires ou de cellules non endothéliales. D'un point de vue fonctionnel, une étape importante dans le développement tumoral appelé « angiogenic switch » correspond à la sortie de la tumeur de son état de dormance [Carmeliet, 2000; Folkman, 1995a]. L'état de dormance qui est de durée variable, est l'état dans lequel se trouve la tumeur avant d'être vascularisée. Au-delà d'une taille comprise entre 0,2 et 2 mm³, soit 10⁵ à 10⁶ cellules, la croissance des tumeurs *in vitro* est limitée par l'équilibre entre prolifération active et apoptose due à l'hypoxie [Bergers *et al.*, 1998; O'Reilly *et al.*, 1996]. Ainsi le switch angiogénique est le passage d'un phénotype pré-angiogénique à un phénotype angiogénique.

Une des voies de signalisation majeure impliquée dans l'angiogenèse tumorale implique la cytokine VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Le VEGF et ses récepteurs (VEGFR) ont une action au niveau de la survie des cellules endothéliales, de la mitogenèse, de la migration, de la différenciation, de la perméabilité vasculaire ainsi que dans le recrutement de progéniteurs des cellules endothéliales [Hicklin and Ellis, 2005]. Ces différents effets biologiques sont dus à l'activation par les VEGFR de nombreuses voies de signalisation telles que PLC γ , PKC, ERK ou Akt [Zachary, 2003]. Le VEGF se lie aux récepteurs VEGFR-1 (Flt1) et VEGFR-2 (KDR, Flk1). Le VEGFR-2 est le médiateur principal de la perméabilité vasculaire induite lors de l'angiogenèse. L'action du VEGFR-1 au niveau de l'angiogenèse est plus complexe. Il pourrait en effet fonctionner comme un leurre afin de séquestrer le VEGF et empêcher son interaction avec VEGFR-2 [Ferrara, 2004]. Cependant, VEGFR-1 est aussi impliqué dans l'hématopoïèse et le recrutement de monocytes et autres cellules dérivées de la moelle osseuse impliquées dans la vascularisation tumorale et inductrices d'angiogenèse [Gerber *et al.*, 2002; Hattori *et al.*, 2002].

Les cellules tumorales induisent la sécrétion (entre autres par l'action du VEGF) de MMPs (Matrix Metallo Proteinases), en particulier MMP-2 et MMP-9 [Bergers *et al.*, 2000], ainsi que d'activateurs du plasminogène. Elles sécrètent aussi Ang-2 (Angiopoïétine 2), qui participe au détachement des cellules musculaires lisses de la matrice extracellulaire et facilite ainsi la migration des cellules endothéliales. Ang-2 est un antagoniste d'Ang-1 qui stabilise les vaisseaux et se lie aux récepteurs Tie-2 exprimés par les cellules endothéliales [Maisonpierre *et al.*, 1997]. Les cellules endothéliales activées peuvent ainsi migrer, proliférer et s'assembler en structure tubulaire. Enfin, la maturation des vaisseaux nécessite le recrutement de péricytes et de cellules musculaires lisses, ainsi que la reformation de la membrane basale. Ces processus sont médiés par Ang-2, mais aussi par le PDGF- β (Platelet Derived Growth Factor β) [Lindahl *et al.*, 1997]. En effet, les péricytes expriment les récepteurs PDGF-R β et Tie-2 qui sont alors activés et viennent se fixer à la structure tubulaire nouvellement formée afin de la stabiliser, et de lui donner un diamètre homogène. Les vaisseaux de cerveau de souris de phénotype PDGF-R β ^{-/-} ont une structure tortueuse et un diamètre qui peut atteindre 25 à 100 μ m à certains endroits, alors que les souris sauvages ont un diamètre capillaire d'environ 5 μ m [Lindahl *et al.*, 1997].

En ce qui concerne la formation de vaisseaux sanguins tumoraux, l'angiogenèse n'est pas le seul phénomène impliqué, mais il a été le plus étudié. La formation d'un nouveau réseau capillaire intervient aussi par le phénomène de la vasculogenèse lorsque les précurseurs angioblastiques sont recrutés à partir de la moelle osseuse. Le VEGF ou le bFGF

(basic Fibroblast Growth factor) induisent les angioblastes à se différencier [Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996; Shalaby *et al.*, 1997]. Au cours de la vasculogénèse, TGF- β 1 (Tumor Growth Factor β 1) et TGF- β récepteur 2 interviennent mais leurs voies de signalisation sont encore mal identifiées [Dickson *et al.*, 1995].

II.2. Thérapies anti-angiogéniques

L'hypothèse que la tumeur produit une substance angiogénique soluble a été émise en 1968 [Ehrmann and Knoth, 1968; Greenblatt and Shubi, 1968]. En 1971, Folkman propose que la croissance tumorale et le processus métastatique sont angiogénèse-dépendants, et que bloquer l'angiogénèse pourrait être une stratégie afin d'arrêter la croissance tumorale [Folkman, 1971]. Depuis, de nombreuses découvertes ont été faites en ce qui concerne l'angiogénèse tumorale, et l'utilisation de facteurs anti-angiogéniques a confirmé l'efficacité de la thérapie anti-angiogénique sur la croissance des tumeurs et la dissémination tumorale. Cibler le réseau vasculaire est donc une thérapie anti-cancéreuse faisant partie des thérapies ciblées qui est possible de nos jours, et qui de plus semble très prometteuse.

II.2.1. Définition et exemples

Les cibles des thérapies anti-angiogéniques sont principalement les cellules endothéliales, et ceci pour deux raisons majeures : ces cellules sont génétiquement stables, contrairement aux cellules cancéreuses qui sont transformées et donc génétiquement instables. Par cette homogénéité, les cellules endothéliales sont donc plus facile à cibler. De plus, les cellules endothéliales sont facilement accessibles par administration systémique. Les thérapies anti-angiogéniques ont une finalité différente des thérapies anti-cancéreuses : le but est en effet de stabiliser l'évolution de la maladie plutôt que de chercher à éradiquer la tumeur comme par la radiothérapie ou encore la chimiothérapie.

La première preuve expérimentale que le ciblage de la vascularisation tumorale est efficace a été apportée par Burrows et Thorpe en 1993 sur un modèle murin. Une lignée de neuroblastome exprimant l'IFN- γ (interféron- γ) induisait l'expression de molécules de CMH de classe II sur les cellules vasculaires tumorales. Des Ac de forte affinité couplés à la ricine dirigés contre ces molécules ont induit la mort des cellules vasculaires, et la régression tumorale [Burrows and Thorpe, 1993].

Depuis, de nombreux résultats obtenus en recherche fondamentale ont été transposés au niveau clinique. On peut définir trois classes de composés anti-angiogéniques selon les mécanismes ciblés : la première concerne les agents dirigés contre les molécules impliquées dans l'angiogenèse. La seconde classe concerne ceux qui perturbent l'adhésion des cellules endothéliales. Et enfin la dernière concerne les agents qui vont inhiber la formation des néovaisseaux tumoraux [Matter, 2001].

II.2.1.1. Les agents ciblant les facteurs angiogéniques

Cette classe d'inhibiteurs bloque l'action de certains facteurs de croissance spécifiques des cellules endothéliales. La principale voie exploitée actuellement est celle du VEGF. Plusieurs stratégies anti-VEGF ont été développées, comme les Ac neutralisant le VEGF ou les VEGFRs, des hybrides solubles VEGF/VEGFR, et enfin des TKIs (Tyrosine Kinase Inhibitors) associés aux VEGFRs [Hicklin and Ellis, 2005]. Les différentes classes de drogues développées en tant qu'inhibiteurs du VEGF sont résumées ci-dessous (Tableau 3). Certains de ces agents sont actuellement en cours d'essais cliniques.

L'Ac anti-VEGF Bevacizumab (Avastin; Genentech), en combinaison avec la chimiothérapie, est le premier de ces agents dont l'utilisation dans des thérapies anti-cancéreuses a été approuvée aux Etats-Unis dans le traitement de neuroblastomes, de cancers colorectaux ou encore d'adénocarcinomes. En effet, une des premières stratégies utilisées pour inhiber l'activité du VEGF est d'utiliser des Ac dirigés contre le couple VEGF/VEGFR. Des études précliniques avec un Ac anti-VEGFR-2 ont démontré une diminution dans l'induction de la signalisation induite par le VEGF, une diminution de l'angiogenèse, et une diminution de la croissance primaire et métastatique dans une variété de tumeurs différentes [Prewett *et al.*, 1999; Shaheen *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1999].

De petites molécules TKI des VEGFR représentent une autre approche développée pour bloquer l'angiogenèse induite par le VEGF. Plusieurs TKI ont été mises au point afin de bloquer l'activité du VEGFR-2, mais elles montrent une activité pour les autres récepteurs de VEGF, ainsi que d'autres récepteurs à tyrosine kinase tels que les membres de la famille de l'EGFR (Epithelial Growth factor Receptor), PDGFR- α , PDGFR- β , c-kit, ou encore Flt-3 [Hicklin and Ellis, 2005].

Enfin, l'inhibition d'une variété de régulateurs de l'expression ou de la production du VEGF est une stratégie potentielle pour moduler indirectement les effets angiogéniques. L'EGFR, HER-2, COX-2, ou encore HIF-1 α sont des cibles potentielles. Cependant, ces

méthodes sont compromises par le fait que pour chaque régulateur comme le VEGF, plusieurs régulations intracellulaires existent. Ainsi, inhiber une des voies peut ne pas conduire à une inhibition complète de l'angiogenèse due au VEGF.

<i>Agent</i>	<i>Classe</i>	<i>Cible</i>	<i>Fournisseur</i>
Bevacuzimab	MAB	VEGF-A	Genentech
IMC-1121B	MAB	VEGFR-2	ImClone Systems
CDP-791	Pegylated DiFab (construction de 2 Ac)	VEGFR-2	Celltech
2C3	MAB	VEGF-A	Peregrine
PTK-787	TKI	VEGFR-1, -2	Novartis
AEE788	TKI	VEGFR-2, EGFR	Novartis
ZD6474	TKI	VEGFR-1, -2, -3, EGFR	AstraZeneca
AZD2171	TKI	VEGFR-1, -2	AstraZeneca
SU11248	TKI	VEGFR-1, -2, PDGFR	Pfizer
AG13925	TKI	VEGFR-1, -2	Pfizer
AG013736	TKI	VEGFR-1, -2	Pfizer
CEP-7055	TKI	VEGFR-1, -2, -3	Cephalon
CP-547,632	TKI	VEGFR-1, -2	Pfizer
VEGF-trap	Récepteur soluble hybride	VEGF-A, PlGF (placenta growth factor)	Aventis/Regeneron
GW786024	TKI	VEGFR-1, -2, -3	GlaxoSmithKline
Bay 93-4006	TKI	VEGFR-1, -2, PDGFR	Bayer/Onyx
AMG706	TKI	VEGFR-1, -2, -3	Amgen

Tableau 3: Inhibiteurs de la voie VEGF/VEGFR en essais cliniques [Hicklin and Ellis, 2005].

II.2.1.2. Les agents ciblant les enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire

Une seconde stratégie anti-angiogénique vise à empêcher les interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules endothéliales [Egeblad and Werb, 2002]. Plusieurs de ces composés sont des inhibiteurs des MMPs (MMPIs) impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire, empêchant ainsi les cellules endothéliales stimulées de digérer la membrane basale et de migrer vers la source du stimulus angiogénique [Zhou *et al.*, 2000].

On peut citer parmi ces agents le Batimastat (BB94), une molécule de petit poids moléculaire dérivée de l'acide hydroxamique et basée sur la structure d'un substrat naturel des MMPs, le collagène. Il s'agit d'un MMPI à large spectre d'action et réversible. Il a une faible solubilité qui restreint son administration au niveau intra-péritonéal ou intra-pleural, empêchant son développement au-delà des phases cliniques I et II [Macaulay *et al.*, 1999]. Le Marimastat (BB2516) est le second composé à être testé chez l'Homme. Il est l'équivalent soluble du Batimastat, et est administré oralement. Là encore, les essais de phase III sur des

cancers pancréatiques se sont avérés non concluants. En effet, aucune différence n'a été observée entre les patients traités avec le Marimastat par rapport au groupe contrôle traité avec la gemcitabine au niveau de l'amélioration de la survie. Par contre 44 % des patients du groupe traité avec le Marimastat présentent une toxicité au niveau musculaire et osseux contre 12 % seulement pour le groupe traité à la gemcitabine [Bramhall *et al.*, 2001]. Malgré ces résultats peu satisfaisants, d'autres composés ciblant les MMPs ont été développés, comme le Néovastate, ou le Solimastat, ou encore le SI-27 [Nakamura *et al.*, 2001] qui induit l'apoptose et augmente l'effet anti-tumoral du TNF α dans certaines lignées cellulaires humaines.

Les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ sont spécifiquement exprimées par les cellules endothéliales et permettent leur interaction avec la matrice extracellulaire. Il a été montré que des Ac anti-intégrine (Vitaxin) ou des peptides synthétisés chimiquement inhibent l'angiogenèse tumorale [Gutheil *et al.*, 2000].

II.2.1.3. Inhibition de la formation des néovaisseaux tumoraux

La troisième cible d'action est l'inhibition de la formation des nouveaux vaisseaux tumoraux formés. Ainsi, une attention particulière a été apportée à l'angiostatine, un inhibiteur naturel de l'angiogenèse. L'angiostatine inhibe la croissance tumorale en empêchant la formation de nouveaux vaisseaux tumoraux [O'Reilly *et al.*, 1994]. L'angiostatine est un fragment dérivé de la protéolyse du plasminogène. Différentes formes d'angiostatine ont été mises en évidence, avec différentes activités biologiques. De plus, elle possède de nombreuses cibles cellulaires de surface, ce qui complexifie l'identification de son mode d'action [Wahl *et al.*, 2005]. Cependant, il a été montré qu'elle induit un arrêt du cycle cellulaire ainsi que l'apoptose des cellules endothéliales [Claesson-Welsh *et al.*, 1998]. L'endostatine, fragment C-terminal du collagène XIII a été montré comme inhibant la prolifération et la migration des cellules endothéliales via un arrêt en G₁ en inhibant la cycline D1 [Hanai *et al.*, 2002].

Une autre façon d'empêcher la formation des néovaisseaux tumoraux est de cibler les péricytes qui les stabilisent. Ces cellules issues de progéniteurs périvasculaires sont mobilisées à partir de la moelle osseuse en réponse au PDGF- β . Elles relarguent localement du VEGF et de l'Ang-1 stabilisant les vaisseaux. Ainsi, des combinaisons de TKIs ciblant les VEGFRs et PDGFR- β augmentent les effets anti-angiogéniques, et ceci même dans les tumeurs de stades tardifs [Bergers *et al.*, 2003].

Enfin, d'autres composés ont été identifiés comme ayant des effets anti-angiogéniques, sans pour autant que leurs mécanismes d'action soient connus. On peut citer le Thalidomide, qui inhibe l'angiogenèse induite par le TNF- α , mais aussi le bFGF et le VEGF. Son activité est démontrée dans le cas des glioblastomes, des cancers de la prostate, du sein, du poumon, mais aussi pour le syndrome de Kaposi. Parmi ces autres molécules, on trouve aussi la suramine, qui se lie au bFGF, mais qui a d'autres mécanismes d'action tels que l'inhibition de la PKC ou de la topoisomérase II. Elle est utilisée dans le cas de cancers de la prostate mais aussi de tumeurs du cerveau et de myélomes. Les taxanes, comme le paclitaxel, sont des agents cytotoxiques qui stabilisent les microtubules, empêchant ainsi la division cellulaire conduisant à la mort cellulaire. Elles ont aussi des propriétés anti-angiogéniques [Belotti *et al.*, 1996]. Elles sont utilisées dans les cancers du sein, du poumon ou de l'ovaire.

Les thérapies anti-angiogéniques sont donc prometteuses par la diversité des champs d'action possible, selon que l'on cible les molécules impliquées dans l'angiogenèse, les cellules endothéliales elles-même ou encore les nouveaux vaisseaux formés.

II.2.2. Limites des thérapies anti-angiogéniques

Face à tous ces développements anti-angiogéniques la question suivante peut être posée: l'inhibition de l'angiogenèse est-elle suffisante pour guérir le cancer? Pour y répondre, il faut prendre en compte le mode d'action des thérapies anti-angiogéniques.

Une des limites actuelles de la thérapie anti-angiogénique est le peu de recul observé au niveau de ses effets toxiques. En effet, ces traitements devront certainement être administrés sur de longues périodes puisqu'il s'agit de stabiliser le développement tumoral. L'absence d'angiogenèse endogène dans les tissus normaux rend improbable l'apparition d'effets secondaires. Cependant, il apparaît essentiel de déterminer précisément les mécanismes cellulaires et moléculaires à la base de ce processus afin de sécuriser le transfert clinique, et de limiter les effets toxiques chez les patients.

Une autre limite des thérapies anti-angiogéniques est basée sur les composés utilisés. Un des traitements actuel le plus prometteur est le Bevacizumab (Avastin; Genentech). Cet Ac dirigé contre le VEGF a récemment été montré dans une étude de phase III comme améliorant la survie des patients avec un cancer colorectal métastatique [Ferrara *et al.*, 2004]. Malheureusement, le développement de tels Ac monoclonaux est compliqué par le fait qu'ils sont d'origine murine et qu'ils doivent donc être humanisés avant d'être utilisés chez des patients afin d'éviter toute réaction anti-Ac de souris. De plus, une large application clinique

est limitée par le fait que de fortes concentrations doivent être administrées, et sur de longues périodes puisqu'ils ont une demi-vie relativement courte. Afin de pallier à ces problèmes, plusieurs laboratoires ont centralisé leurs recherches sur le développement de vaccins qui ciblent spécifiquement des antigènes de l'endothélium tumoral associé à l'angiogenèse, ou bien des médiateurs solubles de l'angiogenèse. Certains ont rapporté des effets anti-tumoraux de différents vaccins sur des modèles animaux pré-cliniques [Okaji *et al.*, 2006].

Certains patients traités avec des inhibiteurs du VEGF, en combinaison avec la chimiothérapie, ont une survie prolongée mais succombent tout de même à la maladie. En effet, le VEGF ciblé semble être remplacé par d'autres voies de signalisation angiogéniques, puisque la maladie progresse. Ces voies peuvent potentiellement inclure celles d'autres membres de la famille du VEGF, comme par exemple les facteurs lymphangiogéniques tels que VEGF-C et VEGF-D qui peuvent se lier à VEGFR-2 et l'activer après clivage protéolytique, mais aussi des voies indépendantes du VEGF. Ainsi, l'évidence d'une certaine résistance aux thérapies anti-angiogéniques émerge [Kerbel *et al.*, 2001; Sweeney *et al.*, 2003]. Cette résistance peut être acquise par la sélection de variants de facteurs de croissance tumoraux résistants à l'hypoxie, et donc moins dépendants de l'angiogenèse [Yu *et al.*, 2002]. Un remodelage des vaisseaux tumoraux les rend alors plus matures et stabilisés, ce qui les rend moins répondeur aux thérapies anti-angiogéniques [Glade Bender *et al.*, 2004].

Ainsi, ces thérapies ne guérissent pas le cancer mais le maintiennent dans un état non invasif. En effet, quand ils sont administrés seuls, les traitements anti-angiogéniques donnent de faibles réponses au niveau clinique [Cobleigh *et al.*, 2003; Mayer, 2004]. Il paraît plus envisageable de considérer les thérapies anti-angiogéniques comme faisant partie d'un ensemble de traitements anti-cancéreux, combinant la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie conventionnelle. En effet, l'administration de thérapies anti-angiogéniques combinées à des thérapies cytotoxiques telles que chimio- ou radiothérapies aurait de meilleurs bénéfices puisqu'une telle combinaison atteint deux compartiments : les cellules tumorales et les cellules endothéliales. En effet, les agents cytotoxiques tuent les cellules tumorales directement, tandis que les agents anti-angiogéniques les tuent indirectement en les privant de nutriments [Teicher, 1996]. Il semble que la chimiothérapie ou la radiothérapie aient des effets anti-angiogéniques en induisant des dommages ou en tuant directement les cellules endothéliales tumorales, leurs progéniteurs ou encore les cellules endothéliales circulantes, augmentant ainsi la mort indirecte des cellules tumorales [Hicklin and Ellis, 2005]. De plus, les cellules cancéreuses peuvent exprimer des récepteurs pour des facteurs de croissance angiogéniques tels que VEGFR1 ou VEGFR2. Ainsi, des thérapies telles que celles

utilisant des Ac anti-VEGF pourraient conduire directement à la mort des cellules tumorales en interférant avec leurs voies de survie [Hicklin and Ellis, 2005]. Les agents anti-angiogéniques semblent donc augmenter les réponses de la chimiothérapie ou radiothérapie.

Récemment, le concept de la normalisation de la vascularisation tumorale a fait son apparition dans les thérapies anti-angiogéniques [Jain, 2005]. Il semblerait que certains facteurs anti-angiogéniques peuvent normaliser les structures et les fonctions dérégulées de la vascularisation tumorale afin de la rendre plus efficace à délivrer les traitements et l'oxygène à la tumeur. Cette normalisation serait exploitable dans une certaine fenêtre de temps après le traitement anti-angiogénique. Des études réalisées sur des tumeurs humaines implantées dans des souris et traitées avec un Ac anti-VEGFR2 montrent qu'une fenêtre de normalisation d'environ 6 jours apparaît pendant laquelle on observe une augmentation de l'oxygénation de la tumeur qui augmente l'effet de la radiothérapie en accentuant la concentration en ROS créés lors de l'irradiation [Winkler *et al.*, 2004]. Cette fenêtre de normalisation est donc une période pendant laquelle la radiothérapie permet la meilleure réponse tumorale.

Afin de pouvoir optimiser ce genre de thérapies combinées anti-cancéreuses, il est donc important de connaître les voies moléculaires des cellules endothéliales impliquées dans leur réponse aux agents anti-angiogéniques, mais aussi dans leur réponse aux radiations.

II.3. Effets de l'irradiation sur les cellules endothéliales

Les thérapies anti-angiogéniques sont limitées par le fait qu'elles ciblent majoritairement l'endothélium angiogénique, c'est à dire les cellules endothéliales en prolifération, mais pas les cellules endothéliales quiescentes de la tumeur. Ainsi, elles ne sont réellement efficaces qu'en tout début de la vascularisation tumorale, soit à un stade généralement antérieur au dépistage. De plus, ces traitements sont généralement non létaux. Ils ont un effet cytostatique qui n'induit pas la mort des cellules endothéliales mais les empêche seulement de former de nouveaux vaisseaux. Contrairement à ces thérapies, les radiations sont cytotoxiques pour les cellules endothéliales.

II.3.1. Effets cellulaires de l'irradiation sur les cellules endothéliales

II.3.1.1. Activation des cellules endothéliales

Suite à l'irradiation, les cellules endothéliales subissent un changement de distribution de l'actine-F, ainsi qu'une augmentation dose-dépendante du flux trans-endothélial de l'albumine [Friedman *et al.*, 1986] ou encore de solutés de faible poids moléculaire [Waters *et al.*, 1996]. De plus les cellules endothéliales irradiées présentent des changements dans la synthèse et la sécrétion de certaines molécules comme par exemple la sécrétion de facteurs de croissance [Witte *et al.*, 1989]. Ces facteurs de croissance sont synthétisés *de novo* et sécrétés par les cellules qui ont une forte activité métabolique post-radique.

L'irradiation active les cellules endothéliales qui acquièrent alors un phénotype thrombogénique, pro-inflammatoire et pro-coagulant. L'irradiation module *in vitro* et *in vivo* l'expression des molécules d'adhésion endothéliales telles que ICAM-1 (Inter Cellular Adhesion Molecule-1), VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1), PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1), P- et E-sélectine [Quarmby *et al.*, 1999]. Elles secrètent de plus des marqueurs tels que la thrombomoduline [Zhou *et al.*, 1992], le facteur von Willebrand [Matucci-Cerinic *et al.*, 1992] ou encore l'héparinase [Nicolson *et al.*, 1991].

II.3.1.2. Mort des cellules endothéliales

Une hypertrophie du cytoplasme des cellules endothéliales irradiées a été observée [Lam *et al.*, 1985; Rubin *et al.*, 1989]. Ainsi des cellules géantes se forment permettant de combler les trous laissés par les cellules endothéliales mortes afin de maintenir une monocouche cellulaire confluite [Fischer-Dzoga *et al.*, 1984].

De plus il a été montré que les cellules endothéliales irradiées en culture présentent des dommages chromosomiques tels que des micronoyaux [Raicu *et al.*, 1993], des SSBs ou des DSBs [Fuks *et al.*, 1994; Nubel *et al.*, 2006]. Cependant, très peu d'études rapportent une mort mitotique des cellules endothéliales après irradiation, excepté quand les cellules sont irradiées après un prétraitement à l'angiostatine [Hari *et al.*, 2000]. Par contre, plusieurs études *in vitro* ont rapporté une mort apoptotique des cellules endothéliales irradiées [Fuks *et al.*, 1994; Gaugler *et al.*, 1998], 6 à 10 h après irradiation pour les cellules endothéliales de la microvascularisation [Langley *et al.*, 1997], et 12 à 16 h sur des cellules de macrovaisseaux aortiques [Gajdusek *et al.*, 2001]. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* avec la mise en évidence de la mort apoptotique des cellules endothéliales microvasculaires dès 4 h [Paris *et al.*, 2001; Pena *et al.*, 2000], qui perdure jusqu'à 24 h post-irradiation [Li *et al.*, 2003; Pena *et al.*, 2000].

II.3.2. Effets tissulaires de l'irradiation des cellules endothéliales

II.3.2.1. Généralités

Un facteur limitant de l'utilisation des radiations est dû aux effets délétères de la radiothérapie sur les tissus sains. La compréhension de la réponse tissulaire aux radiations au niveau moléculaire et fonctionnel pourrait augmenter l'application de la radiothérapie, et peut-être conduire à de nouveaux traitements. Les altérations dans la structure de la microvascularisation en réponse aux radiations semblent être un facteur clé dans les dommages radioinduits des organes. En effet, les effets précoces des radiations apparaissent majoritairement dans le réseau microvasculaire [Dimitrievich *et al.*, 1984; Quarmby *et al.*, 1999].

L'endothélium vasculaire est essentiel dans la régulation du tonus vasculaire et du flux sanguin, ainsi que dans l'homéostasie vasculaire [Anderson, 1999; Bonetti *et al.*, 2003]. Suite à une irradiation, l'endothélium subit des changements qui influent sur la régulation du tonus vasculaire et du flux sanguin. Ainsi, on observe une diminution de la synthèse de certains vasodilatateurs comme le NO (Nitric Oxyde) [Cai and Harrison, 2000], ou encore les prostacyclines (PGI₂) [Siegal and Pfeffer, 1995], ainsi qu'une augmentation de certains vasoconstricteurs comme l'endothéline-1, Ang2 ou encore TXA₂ (thromboxane A₂) [Siegal and Pfeffer, 1995]. Ainsi l'irradiation entraîne une vasoconstriction, suivie d'une diminution du flux sanguin [Acker *et al.*, 1998; Peterson *et al.*, 1992] qui peuvent conduire à des problèmes de perfusion et à une hypoxie tissulaire.

L'endothélium irradié perd ses fonctions de barrière et voit ainsi une augmentation de sa perméabilité. Ainsi, une recrudescence des éléments circulants au niveau des tissus peut induire des oedèmes tissulaires [Maisin, 1970; Peterson *et al.*, 1992; Siegal and Pfeffer, 1995]. Des oedèmes pulmonaires ont été observés chez le rat [Ward *et al.*, 1993], ou encore chez les victimes irradiées de l'accident de Tokai-Mura [Hirama *et al.*, 2003].

Une autre principale cause des dommages des tissus sains est due à l'induction d'une réaction inflammatoire impliquant l'infiltration des leucocytes dans les organes irradiés. Cette infiltration est due à une cascade d'adhésion. Un certain nombre de travaux ont montré que les molécules d'adhésion endothéliales E-sélectine (CD62E, ELAM-1) interagissent avec des sialyl Lewis(x) glycanes granulocytaires afin de médier l'attachement, et le roulement des granulocytes [Abbassi *et al.*, 1993; Brunk *et al.*, 1996; Goetz *et al.*, 1997]. Les étapes en aval de cette cascade d'adhésion, soit l'adhésion ferme des granulocytes sur l'endothélium,

impliquent l'interaction de la molécule ICAM-1 exprimée par les cellules endothéliales avec les intégrines granulocytaires CD18 [Luscinskas and Gimbrone, 1996; Springer, 1994]. En effet des travaux *in vivo* ont montré que l'administration d'Ac anti-CD18 ou anti-ICAM-1 diminue le nombre de leucocytes adhérents post-irradiation [Panes *et al.*, 1995]. De plus, l'infiltration leucocytaire est inhibée dans les souris ICAM-1^{-/-} [Hallahan and Virudachalam, 1997]. D'autres molécules d'adhésion sont exprimées après une activation des cellules endothéliales par l'irradiation telles que PECAM-1, VCAM-1 ou encore la P-sélectine [Quarmby *et al.*, 1999]. Ces infiltrats inflammatoires peuvent conduire à une fibrose tissulaire. Les cellules endothéliales activées relarguent en plus le facteur von Willebrand [van Kleef *et al.*, 2000] qui induit un recrutement des plaquettes au niveau des vaisseaux sanguins, entraînant ainsi des thromboses [Mouthon *et al.*, 2001] qui obstruent la lumière du vaisseau sanguin et empêchent une bonne perfusion tissulaire.

II.3.2.2. Implication des cellules endothéliales irradiées au niveau du tissu sain : exemple du Syndrome Gastro-Intestinal (SGI)

Il a été montré que les cellules endothéliales irradiées subissent une apoptose *in vitro* [Gaugler *et al.*, 1998; Langley *et al.*, 1997] et *in vivo* [Li *et al.*, 2003; Paris *et al.*, 2001; Pena *et al.*, 2000; Santana *et al.*, 1996]. Les cellules endothéliales étant très proches des cellules parenchymateuses des tissus, comme par exemple les cellules épithéliales, une forte communication s'établit entre ces deux types cellulaires (Figure 12). Les dommages des cellules endothéliales peuvent donc entraîner des dommages au niveau des cellules épithéliales. L'apoptose des cellules endothéliales apparaît comme un événement précoce après irradiation, (entre 4 h et 10 h), et apparaît être dose-dépendante. Un effet maximal de l'apoptose est observé dans la muqueuse intestinale à 15 Gy [Paris *et al.*, 2001], dans les poumons à 25 Gy [Santana *et al.*, 1996] et dans le SNC (Système Nerveux Central) à 40 Gy [Pena *et al.*, 2000]. Des études histo-pathologiques montrent que les dommages de l'endothélium sont restreints à la microvascularisation, tandis-que les gros vaisseaux semblent résistants aux effets délétères des radiations.

Ces études *in vivo* montrent que l'intégrité tissulaire est dépendante de la réponse des cellules endothéliales aux radiations. Nous allons exposer ce principe de dépendance des tissus sains aux cellules endothéliales en détaillant le cas du SGI.

Le SGI est la principale toxicité précoce associée à la radiothérapie de tumeurs abdominales humaines. Il consiste en des diarrhées, une déshydratation, des infections

entérobactériennes, et, dans les cas les plus sévères, peut aboutir à un choc septique et à la mort du patient [Potten, 1990].

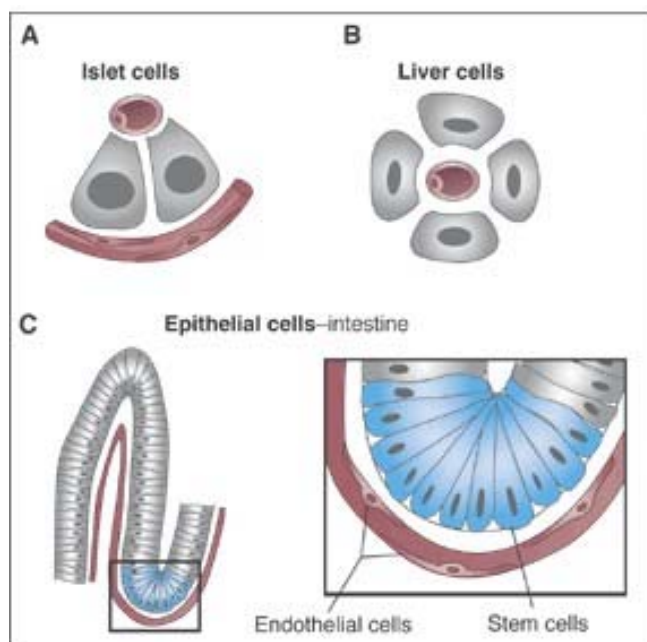


Figure 12: Place centrale des cellules endothéliales dans l'organisation tissulaire. (A) Les cellules Islet du pancréas sont prises en sandwich entre deux capillaires sanguins (les cellules musculaires sont similairement positionnées). (B) Les cellules du foie sont organisées autour d'un capillaire central. (C) Les cellules souches de la muqueuse intestinale dans les cryptes de Lieberkühn sont séparées des cellules endothéliales par une courte distance (environ 100 μm) [Folkman and Camphausen, 2001].

Pendant longtemps le SGI était associé directement aux dommages induits par les radiations à un groupe de cellules clonogéniques épithéliales à l'intérieur des cryptes en position 4 ou 5 à partir de la base des cryptes de Lieberkühn, ces dommages radioinduits entraînant la mort des cellules clonogéniques épithéliales [Booth and Potten, 2000; Potten, 1990; Potten *et al.*, 1997]. Ce principe était basé sur le fait qu'une seule cellule clonogénique vivante apparaît suffisante pour régénérer une unité crypte-villosité après un dommage [Potten, 1990] (Figure 13). Au-delà d'une irradiation de 8 Gy, la mort des cellules clonogéniques dose-dépendante entraîne la diminution de la régénération des cryptes intestinales, jusqu'à un seuil où le niveau de régénération des cryptes est insuffisant pour empêcher l'apparition du SGI. Ainsi, une dénudation progressive de l'épithélium intestinal conduit, à partir du jour 6 ou 7 après irradiation, à la mort de la souris par le SGI.

En 2001, les travaux de Paris et collaborateurs bouleversent ce concept en montrant, sur un modèle murin, que l'endothélium vasculaire à l'intérieur de la muqueuse intestinale est la cible principale des radiations, entraînant un dysfonctionnement des cellules souches épithéliales [Paris *et al.*, 2001]. Cette hypothèse était basée sur le fait que des facteurs de survie endothéliaux tels que le VEGF [Okunieff *et al.*, 1998] ou le bFGF [Houchen *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 1997; Okunieff *et al.*, 1998] protègent l'intestin des dommages radioinduits, et que l'endothélium est la première cible des radiations au niveau du cerveau et du poumon [Pena *et al.*, 2000; Santana *et al.*, 1996].

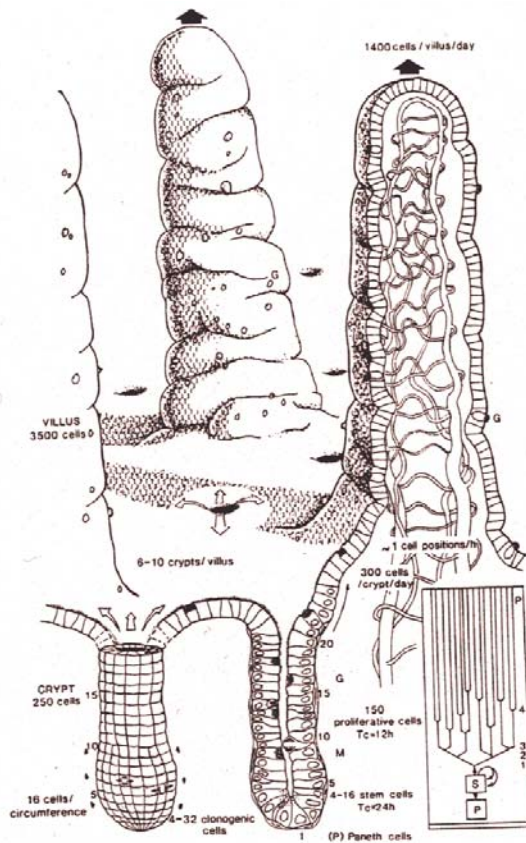


Figure 13 : Schéma d'une unité villosité-crypte intestinale. Les cellules souches permettent la régénération des cryptes et/ou des villosités après un dommage [Potten, 1992].

Paris et collaborateurs montrent qu'une injection de bFGF empêche l'initiation de l'apoptose des cellules endothéliales intestinales, protégeant ainsi les cellules épithéliales de l'intestin contre les dommages radioinduits. Cependant, le bFGF ne protège pas directement la moelle osseuse et les animaux meurent donc d'une aplasie médullaire. Ils ont montré par hybridation *in situ* que les cellules endothéliales expriment les récepteurs au bFGF, mais pas les cellules épithéliales, démontrant ainsi que la protection par le bFGF du SGI est due à la protection des cellules endothéliales. D'autres travaux ont validé le fait que la radiosensibilité des cellules endothéliales régule la réponse tissulaire [Maj *et al.*, 2003]. Le fait de protéger la mort des cellules endothéliales par le bFGF inhibe la diminution de la taille des cryptes observée 18 à 24 h après irradiation, mais ne favorise pas leur multiplication 3,5 jours après l'irradiation. Ces résultats montrent que le bFGF agit contre l'apoptose des cellules endothéliales, mais pas sur la régénération des cryptes. Ainsi, la fonction microvasculaire régule la réponse intestinale aux radiations en empêchant les dommages des cryptes intestinales. Enfin d'autres travaux ont été réalisés en protégeant les cellules endothéliales de l'intestin et des poumons de la mort radioinduite avec COMP-Ang1, un analogue de l'Ang1 [Cho *et al.*, 2004]. Le récepteur Tie-2 est exprimé principalement par les cellules endothéliales, et le fait que les souris traitées avec COMP-Ang1 voient leur survie augmenter

après irradiation valide le fait que protéger les cellules endothéliales diminue les effets des dommages radioinduits au niveau des tissus sains comme l'intestin.

Nous avons récemment mis en évidence par un modèle de co-culture que des cellules épithéliales non irradiées mises en présence avec des cellules endothéliales irradiées à 15 Gy présentent une diminution du nombre de cellules ainsi que du pourcentage de mitose, une augmentation de la surface cellulaire et une augmentation de l'apoptose [Gaugler *et al.*, 2007]. L'intervention d'un effet bystander au niveau de la régulation de la mort des cellules épithéliales intestinales par les cellules endothéliales irradiées fait partie des phénomènes à prendre en compte en ce qui concerne par exemple le cas du SGI.

Ces résultats sont en accord avec un « modèle à deux compartiments » pour la mort radioinduite des cellules épithéliales intestinales. Les cellules endothéliales intestinales meurent les premières, suivies par les cellules clonogéniques épithéliales qui dépendent du soutien des cellules endothéliales. Un tel modèle à deux compartiments a été proposé pour la croissance des tissus normaux, qui semble dépendre d'une expansion antérieure des cellules endothéliales et de l'angiogenèse. Ainsi, la réparation tissulaire, comme lors de la régénération du foie après une hépatectomie, est toujours précédée d'une revascularisation [Folkman and Camphausen, 2001].

II.3.3.3. Implication des cellules endothéliales dans la réponse tumorale

Un tel modèle à deux compartiments peut se retrouver au niveau de la tumeur, dans le sens où les thérapies anti-angiogéniques inhibent la croissance tumorale [Folkman, 1995a]. Les cellules tumorales se développent autour d'un vaisseau sanguin, et elles stimulent la croissance de nouveaux vaisseaux en relarguant des facteurs mitogènes endothéliaux et des facteurs chimiostatiques comme le bFGF ou le VEGF. Les cellules endothéliales, à leur tour, protègent les tumeurs en relarguant une vingtaine de facteurs de survie et de croissance incluant l'interleukine-6 (IL6) ou encore l'EGF (Epithelial Growth Factor) [Rak *et al.*, 1995]. Si des souris porteuses de tumeurs sont traitées avec des thérapies anti-angiogéniques l'apoptose des cellules endothéliales précède la mort des cellules tumorales de 3 à 5 jours, suggérant que les cellules tumorales sont dépendantes des cellules endothéliales au niveau de leur survie [Browder *et al.*, 2000]. Ce modèle à deux compartiments pourrait expliquer la synergie observée quand la radiothérapie est combinée avec une thérapie anti-angiogénique [Mauceri *et al.*, 1998].

Ce principe de dépendance de la réponse tumorale par rapport à la radiosensibilité des cellules endothéliales a été mis en avant par l'observation de la radiosensibilité des tumeurs. Certaines tumeurs sont très radiosensibles *in vivo*, comme par exemple les lymphomes hodgkiniens, tandis que d'autres, comme par exemple les glioblastomes, sont résistantes. Cependant, ces tumeurs ont les mêmes radiosensibilités *in vitro* [Fertil and Malaise, 1985]. En effet, *in vitro* ces cellules tumorales dépourvues de leur micro-environnement sont la seule cible des radiations qui agissent directement sur leur ADN, les induisant dans une voie apoptotique. *In vivo*, il y a une multitude de cellules de soutien (incluant les cellules endothéliales) pouvant avoir des radiosensibilités différentes, qui interagissent avec les cellules tumorales, et qui sont également les cibles des radiations. Ainsi, les cellules tumorales meurent aussi par leur dépendance à ces cellules de soutien, et non pas seulement suite aux dommages radioinduits de l'ADN.

Cette relation entre cellules tumorales et cellules endothéliales a été démontrée sur un modèle murin [Garcia-Barros *et al.*, 2003]. L'irradiation à une dose unique de 15 Gy de tumeurs de type fibrosarcome ou mélanome transplantées dans des souris sauvages induit la mort des cellules endothéliales dès 1 h post-radiation, avec un pic d'apoptose entre 4 et 6 h. Cette apoptose endothéliale est suivie de la mort des cellules tumorales et de la régression tumorale. Afin de montrer l'implication des cellules endothéliales dans cette régression, les mêmes tumeurs ont par la suite été transplantées dans des souris invalidées pour le gène *Bax*. Les cellules endothéliales qui irriguent la tumeurs ont donc un génotype *Bax*^{-/-}. L'exposition à une dose unique de 15 Gy de ces tumeurs n'entraîne ni la mort des cellules endothéliales, ni la mort des cellules tumorales. Tout comme pour le SGI, ces résultats démontrent que la survie clonogénique d'une cellule tumorale n'est pas le seul élément à prendre en compte afin d'évaluer la régression tumorale. En effet, la mort des cellules endothéliales est directement impliquée dans la régression tumorale.

Les cellules endothéliales, par leur rôle central au niveau de l'intégrité du tissu sain et tumoral, ont une implication évidente au niveau de l'évolution des thérapie anti-cancéreuses. Une meilleure compréhension moléculaire et cellulaire de la mort radioinduite des cellules endothéliales permettrait d'améliorer les thérapies en terme d'efficacité au niveau de la régression tumorale par l'optimisation des thérapies anti-angiogéniques et leur combinaison avec les thérapies traditionnelles, mais aussi au niveau de la protection des tissus sains. Cette mort radioinduite des cellules endothéliales a été montrée comme étant dépendante de la génération du céramide.

III IMPLICATION DE LA GENERATION DU CERAMIDE DANS L'APOPTOSE RADIOINDUITE DES CELLULES ENDOTHELIALES

III.1. Présentation de la voie des sphingolipides

L'idée que les phospholipides fonctionnaient comme des composants structuraux inertes de la membrane cellulaire a changé dans les années 1970 avec la découverte de l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PI) par la phospholipase C (PLC) conduisant à la formation de métabolites lipidiques impliqués dans la signalisation cellulaire. Ainsi, l'observation de la biogenèse de l'inositol 1,4,5-triphosphate (Ins(1,4,5) P_3) et du diacylglycérol (DAG), stimulateurs potentiels de la mobilisation de Ca^{2+} intracellulaire, et de l'activité de la PKC a été le début de la reconnaissance du rôle des glycérophospholipides (GPLs) dans la transduction du signal. Ainsi, d'autres lipides membranaires capables d'induire des molécules de transduction du signal ont été identifiés, comme la SM (sphingomyéline). Le céramide, qui est le produit immédiat de l'hydrolyse de la SM, et d'autres métabolites (comme la sphingosine ou la Sphingosine-1-Phosphate (S1P)) ont été montrés comme jouant un rôle important dans la transduction du signal.

III.1.1. Le céramide : composant de la voie des sphingolipides

La génération d'une variété de molécules lipidiques impliquées dans la transduction du signal à partir de l'hydrolyse de GPLs membranaires est une réponse biochimique précoce intracellulaire à une stimulation extracellulaire. Ces événements placent les seconds messagers lipidiques au centre d'une multitude de voies de transduction du signal. Les seconds messagers impliqués dans la transduction du signal sont le DAG, les inositols phosphates, l'acide arachidonique et ses métabolites, et le céramide, plus récemment identifié.

Le céramide appartient à la famille des sphingolipides. Ils sont le plus souvent localisés dans le feuillet externe de la membrane plasmique, même si on les trouve aussi dans les membranes d'autres organelles, et sont des composants des voies de signalisation utilisées par de nombreux types cellulaires, comme les cellules endothéliales. Les sphingolipides sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Le céramide est le composant central de leur structure (Figure 14).

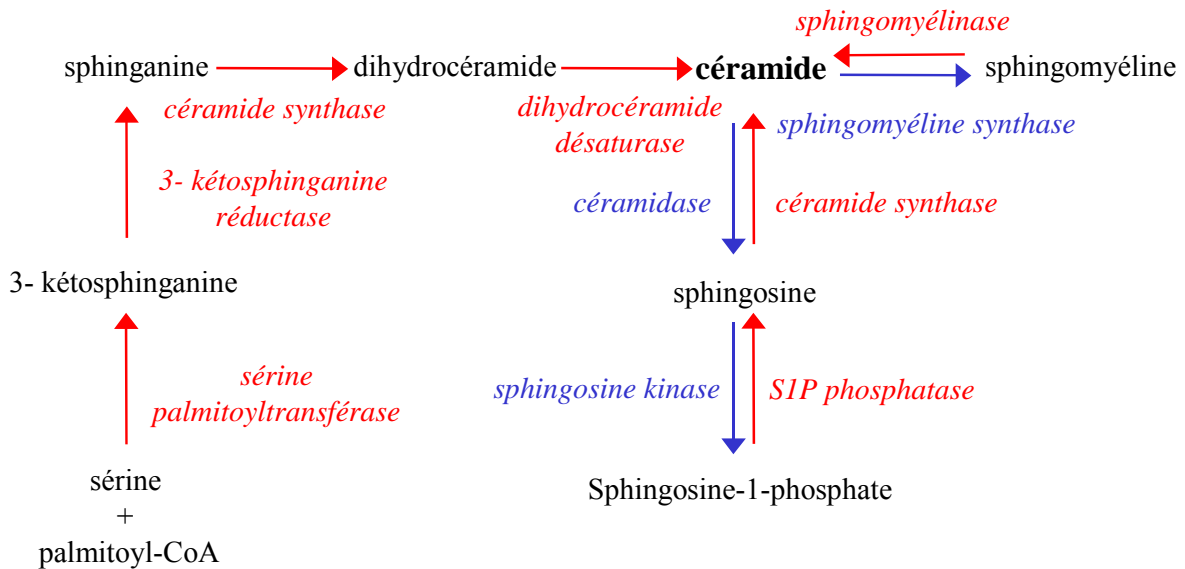


Figure 14: Métabolisme des sphingolipides.

Le céramide est constitué d'une base à longue chaîne (sphingosine ou dihydrosphingosine) et d'un acide gras de longueur variant de 16 à 24 carbones lié par une liaison amide à l'azote de la base. La SM (ou N-acylsphingosine-1-phosphocholine : céramide-phosphocholine) est constituée d'un groupe phosphorylcholine lié au céramide par un pont phosphodiester. La SM est synthétisée à partir du céramide par l'addition d'une choline phosphate dérivée d'une phosphatidylcholine, catalysée par la phosphatidylcholine :céramide choline phosphotransférase (soit la SM synthase). Le céramide est synthétisé *de novo* par la condensation d'une sérine et d'un palmitoyl CoA pour former le 3-kétosphinguanine, suivi d'une réduction en dihydrosphingosine convertie en dihydrocéramide par la CS (Céramide Synthase) suivi de l'insertion d'un trans-4,5-double pont par la dihydrocéramide désaturase. Le dihydrosphingosine est synthétisé dans le réticulum endoplasmique, mais la zone d'insertion du double pont est encore inconnue [Pfeilschifter and Huwiler, 2000].

III.1.2. Génération du céramide par les sphingomyélinases

Outre la synthèse *de novo* du céramide par la condensation d'une sérine et d'un palmitoyl-CoA, celui-ci peut être généré par l'hydrolyse de SM en céramide par les SMases. Puisque la source principale de céramide en transduction du signal semble être l'hydrolyse de SM, la compartimentalisation subcellulaire de SM apparaît comme étant un déterminant critique non seulement dans la régulation de la production de céramide, mais aussi dans

l'identification des cibles cellulaires pour l'action du céramide. Bien que la plus grande concentration de SM se trouve dans le feuillet externe de la membrane plasmique, le feuillet interne et le compartiment lysosomal/endosomal peuvent être fonctionnellement des sites importants pour l'hydrolyse de SM et la génération de céramide [Rosenwald and Pagano, 1993; Wiegmann *et al.*, 1994]. Ainsi, l'existence de différents pools de SM est intéressante dans le sens où certains pools pourraient plus facilement induire la génération de céramide à proximité de ses cibles cellulaires, telles que les kinases ou encore les phosphatases modulées par le céramide pendant la signalisation.

En 1999, Samet et Barenholz ont proposé une classification des SMases en 5 catégories [Samet and Barenholz, 1999], une SMase acide (aSMase), une SMase sécrétée (sSMase) [Schissel *et al.*, 1998a], une SMase neutre (nSMase) associée à la membrane et dépendante du Mg^{2+} (Magnésium) [Okazaki *et al.*, 1989], une SMase neutre cytosolique et indépendante du Mg^{2+} [Okazaki *et al.*, 1994], et enfin une SMase alcaline (bSMase) du tractus intestinal. Bien que ces enzymes catalysent la même réaction, l'hydrolyse de SM en céramide et phosphorylcholine, chaque enzyme possède une localisation cellulaire distincte et semble être régulée par différents mécanismes.

L'aSMase, une glycoprotéine soluble, a été la première décrite [Barnholz *et al.*, 1966]. Elle est codée par le gène *sphingomyéline phosphodiesterase 1 (smpd1)*. Son activité optimale se trouve à pH 5, ce qui explique sa localisation dans le compartiment endosomal/lysosomal [Schutze *et al.*, 1992]. L'aSMase est la plus décrite, puisqu'elle a été purifiée, séquencée et clonée [Quintern *et al.*, 1989], et que des souris invalidées pour le gène de l'*asmase* ont été construites, mimant les caractéristiques de la forme neuroviscérale de la maladie humaine Niemann-Pick [Otterbach and Stoffel, 1995]. Une étude menée dans des cellules B et dans des lymphocytes de patients porteurs de la maladie Niemann-Pick a montré qu'après l'activation de récepteurs de surface Fas (CD95), une SMase est transloquée de sa localisation intracellulaire au feuillet externe de la membrane plasmique, riche en SM [Grassme *et al.*, 2001].

L'aSMase et la sSMase sont issues d'un précurseur protéique commun qui est dirigé soit vers les lysosomes et donne l'aSMase, ou soit vers la voie de sécrétion de l'appareil de Golgi pour donner la sSMase [Schissel *et al.*, 1998a; Schissel *et al.*, 1998b]. L'enzyme sécrétée est activée par des concentrations physiologiques en Zn^{2+} (Zinc), mais il se peut que des formes indépendantes du Zn^{2+} existent [Schissel *et al.*, 1998b]. La sSMase semble avoir un rôle dans l'hydrolyse de LDL (Low Density Lipoprotein) lorsqu'ils sont oxydés ou agrégés, un élément impliqué dans l'athérosclérose [Schissel *et al.*, 1998a].

La première nSMase a été clonée en 1998 par Tomiuk et collaborateurs sur la base de son homologie de séquence avec les nSMases bactériennes [Tomiuk *et al.*, 1998]. Cette nSMase1 est codée par le gène *smpd2*, elle est dépendante du Mg^{2+} et est localisée au niveau du réticulum endoplasmique. Des souris déficientes pour nSMase1 ne montrent pas de phénotype particulier, ni d'accumulation de SM ou autres lipides [Zumbansen and Stoffel, 2002]. Une deuxième nSMase nommée nSMase2 et codée par le gène *smpd3* a été clonée [Hofmann *et al.*, 2000]. Cette enzyme est exprimée principalement dans le cerveau au niveau de l'appareil de Golgi. Elle a un pH optimum de 7 et est aussi dépendante du Mg^{2+} . La surexpression de nSMase2 dans des cellules MCF7 indique que l'enzyme serait impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire [Marchesini *et al.* 2003]. Les souris possédant une délétion dans le gène *smpd3* présentent le syndrome *fragilitas ossium* et ont une perte complète de l'activité de nSMase2. Ces souris sont plus petites à la naissance, et présentent des déformations et de nombreuses fractures des membres et des os longs [Aubin *et al.*, 2005]. Enfin, une troisième nSMase humaine a été clonée sur la base de son homologie de séquence avec une nSMase bovine [Krut *et al.*, 2006]. nSMase3 est codée par *smpd4*, elle a un pH optimum de 7 et est aussi dépendante du Mg^{2+} . nSMase3 semble localisée dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi, et elle est activée par le TNF dans les cellules MCF7 [Krut *et al.*, 2006].

Enfin, la bSMase du tractus intestinal a été purifiée à partir de l'intestin de rat [Cheng *et al.*, 2002]. Cette enzyme n'est pas exprimée dans d'autres organes, elle requiert les sels biliaires pour son activation et est indépendante du Mg^{2+} . Une déficience en cette enzyme pourrait être reliée à la carcinogenèse du colon [Nilsson and Duan, 1999].

Les SMases représentent donc un groupe d'enzymes régulées et exprimées différemment, chacune ayant des rôles précis dans la transduction du signal. Ces différences pourraient expliquer comment le céramide est impliqué dans de nombreux processus biologiques.

Les SMases sont activées par différents stimuli tels que les cytokines ou facteurs de croissance par leur interaction avec des récepteurs membranaires. On peut citer le $TNF\alpha$, l'IL-1 β , l'IFN- γ , ou encore le NGF (Nerve Growth Factor) [Ballou *et al.*, 1996]. En plus d'induire l'accumulation de céramide, ces cytokines sont aussi capable de moduler une variété de réponse cellulaire comme la croissance, la différenciation ou la mort des cellules immunitaires, suggérant que le céramide est impliqué dans la modulation de certains aspects de la réponse aux cytokines. Bien que les mécanismes moléculaires précis par lesquels les SMases sont activées suite à une interaction récepteur ligand sont encore peu clairs, ils ont

été bien étudiés en ce qui concerne l'hydrolyse de SM en réponse au TNF α , en particulier en ce qui concerne l'aSMase. Certaines preuves indiquent que l'aSMase et les nSMases sont activées indépendamment par le TNF α , et que le céramide généré par chacune est impliqué dans des voies de signalisation distinctes [Heller and Kronke, 1994; Wiegmann *et al.*, 1994]. Dans des cellules U937 et Jurkat, le TNF α active la phosphatidylcholine phospholipase C (PC-PLC) dont le produit, le DAG, active l'aSMase. Le céramide généré active NF- κ B. D'autres études effectuées sur des cellules transfectées avec des plasmides d'expression codant pour le récepteur TNF-R55 sauvage ou muté ont montré que la signalisation induite par l'aSMase et les nSMases suite à une activation par le TNF α sont distinctes et activées par des domaines intracellulaires du récepteur TNF-R55 différents [Wiegmann *et al.*, 1994]. Ces expériences ont montré que l'aSMase est liée à l'activation de NF- κ B, contrairement à la neutre. Par contre, la nSMase induit les kinases PDP (Proline Directed Protein) et l'activation de PLA₂ (Phospholipase A₂) tandis que l'aSMase ne semble pas moduler ces enzymes.

Malgré les études effectuées avec le TNF α , les intermédiaires moléculaires liant les récepteurs de surface aux différentes SMases ont encore à être identifiés.

III.2. Les effets biologiques du céramide

Le céramide est impliqué dans la régulation de divers processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation ou encore l'apoptose. L'intérêt majeur porté sur le céramide est du à son implication dans la sensibilité à l'apoptose initiée après des agents cytotoxiques naturels tels que le TNF α , l'IFN γ , l'IL-1 [Ballou *et al.*, 1992; Mathias *et al.*, 1993] ou Fas, ou encore par les agents chimiothérapeutiques ou l'irradiation [Spiegel *et al.*, 1996]. En effet, l'apoptose induite par la daunorubicine, un agent chimiothérapeutique, est liée à la génération de céramide [Jaffrezou *et al.*, 1996; Mansat *et al.*, 1997a; Mansat *et al.*, 1997b]. Le céramide est aussi généré après traitement par d'autres agents chimiothérapeutiques tels que la vincristine [Zhang *et al.*, 1996b], Ara-C [Strum *et al.*, 1994], le dexamétasone [Quintans *et al.*, 1994], le cisplatine, l'étoposide [Jaffrezou and Laurent, 2004], ou encore les rayons UV [Zhang *et al.*, 2001].

Le céramide active des facteurs de transcription impliqués dans la protection ou l'induction de l'apoptose tels que AP-1 ou NF- κ B [Schutze *et al.*, 1992]. Ainsi dans les cellules HL60 l'activation d'AP-1 et de l'apoptose induite par le céramide est inhibée par le curcumine, un inhibiteur d'AP-1 [Sawai *et al.*, 1995]. De plus il active le facteur NF- κ B dans

des cellules perméabilisées, alors qu'il a une très faible activité dans des cellules non perméabilisées, laissant penser que le céramide est nécessaire mais pas suffisant pour induire une activation de NF- κ B [Schutze *et al.*, 1992].

Par l'addition de céramide exogène, il a été montré qu'il induit une inhibition de la croissance et une activation de la différenciation dans les cellules leucémiques. Par exemple, le céramide inhibe le facteur c-Myc, un activateur de prolifération [Wolff *et al.*, 1994]. Le céramide possède d'autres cibles cellulaires telles que la phospholipase A₂, ou la cyclo-oxygénase [Ballou *et al.*, 1992].

La voie de JNK/SAPK a été identifiée comme étant un médiateur critique dans la signalisation apoptotique induite par le céramide dans les lignée U937 ou encore dans les cellules endothéliales bovines [Verheij *et al.*, 1996]. Cette cascade implique l'activation séquentielle de MEKK1 (mitogene-activated protein KKK), SEK1, SAPK et enfin c-Jun. En effet, l'apoptose médiée par le céramide est bloquée par un oligonucléotide antisens c-Jun [Sawai *et al.*, 1995]. Il active aussi la voie des MAPK de façon indirecte [Raines *et al.*, 1993], ainsi que la PKC- ξ . Le céramide a aussi été montré comme activant une sérine-thréonine protéine kinase CAPK (Ceramide-Activated Protein Kinase). Cette protéine a été identifiée comme étant une kinase suppresseur de Ras [Zhang *et al.*, 1997]. Le céramide active aussi une protéine phosphatase de la famille PP2A, la CAPP (Ceramide-Activated Protein Phosphatase) [Dobrowsky and Hannun, 1992]. L'activation de la protéine CAPP pourrait être impliquée dans le dysfonctionnement du métabolisme des lipides et du glucose dans les cellules B [Jangati *et al.*, 2006].

La voie du céramide interfère avec la voie de signalisation induite par les glycérophospholipides résultant dans la formation de DAG et l'activation de la PKC, impliquée entre autres dans la régulation de la croissance cellulaire et la protection contre l'apoptose [Hannun and Obeid, 1995]. La génération du céramide par l'aSMase induit un regroupement des récepteurs CD95 dans des rafts membranaires riches en sphingolipides, entraînant une apoptose. Des Ac anti-Fas (clones CH-11 et Jo2) induisent un regroupement des récepteurs CD95 à un pôle de la membrane de façon dépendante du céramide, et les hépatocytes SMase^{-/-} sont déficients dans l'induction de la génération de céramide et dans le regroupement des CD95, inhibant l'induction de l'apoptose [Cremesti *et al.*, 2001]. Le céramide est aussi impliqué dans l'inhibition de la PI3K, inhibant ainsi la prolifération cellulaire et induisant une voie de signalisation apoptotique [Zundel and Giaccia, 1998].

Les différentes voies de régulation cellulaire impliquant le céramide et leurs connections sont représentées dans la Figure 15 (Figure 15).

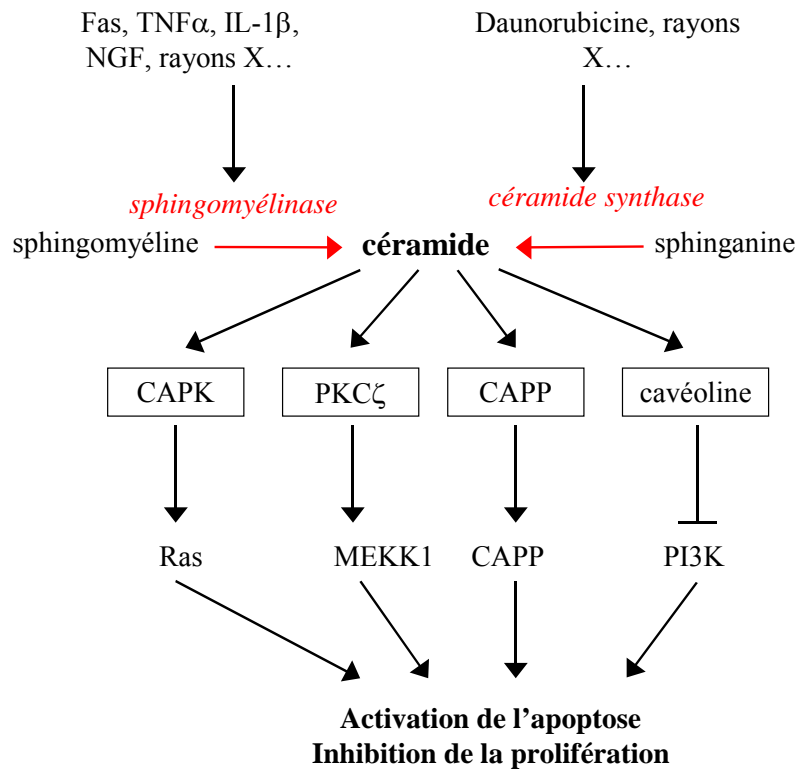


Figure 15 : Schéma de la signalisation induite par le céramide.

III.3. Effets de l'irradiation sur la génération du céramide

L'implication de la signalisation membranaire dans la mort cellulaire radioinduite a été étudiée dans le cadre de l'implication du céramide comme un composant critique de l'apoptose [Hannun, 1996; Spiegel *et al.*, 1996]. La première évidence que les dommages radioinduits de la membrane peuvent initier l'apoptose a été apportée par Haimovitz-Friedman et collaborateurs. Ils ont montré que l'irradiation induit la génération de céramide à partir de SM dans des préparations membranaires dépourvues de noyaux, suggérant que la génération de céramide est indépendante des dommages de l'ADN [Haimovitz-Friedman *et al.*, 1994b]. Des lymphoblastes issus de patients avec la maladie Niemann-Pick, qui présentent donc une déficience en aSMase, montrent une déficience majeure dans la génération de céramide et l'induction de l'apoptose après irradiation [Santana *et al.*, 1996]. La restauration de l'aSMase dans ces cellules restaure les effets des radiations. Ces données *in vitro* ont été confirmées *in vivo* dans les souris déficientes pour le gène *asmase*. Les cellules B matures, les cellules endothéliales, ou encore le mésothélium de ces souris sont résistants à la mort cellulaire induite par les radiations [Santana *et al.*, 1996]. De plus, les fibroblastes embryonnaires de ces souris sont résistants *ex vivo* aux radiations. Cette résistance est levée

par l'ajout de concentration à des doses non létales de céramide-C₁₆ de l'ordre du nanomolaire. La possibilité de lever la résistance à l'apoptose par l'ajout de céramide naturel démontre que cette résistance est directement due au manque de céramide, et non de l'aSMase. De la même façon, il a été montré que les ovocytes issus de souris de génotype *asmase*^{-/-} sont résistants *ex vivo* à l'apoptose radioinduite [Morita *et al.*, 2000]. La translocation de l'aSMase à la membrane après les radiations induit la génération de céramide et la formation de plateformes lipidiques qui peuvent atteindre une taille de 10 µm. Elles sont impliquées dans le regroupement de récepteurs tels que CD95, qui, se retrouvant à une forte densité, peuvent s'oligomériser et induire une signalisation intracellulaire apoptotique. Dans les cellules déficientes pour le gène *asmase*, Bax n'est pas activée, il n'y a pas de relargage de cytochrome C ni d'apoptose en réponse aux UV. Cette réponse est restaurée par l'expression transitoire ou stable de l'aSMase humaine ou par l'ajout de céramide-C₁₆. Ces résultats montrent que l'activation de l'aSMase est indispensable pour que les changements conformationnels de Bax aient lieu, induisant un relargage de facteurs pro-apoptotiques par la mitochondrie tels que le cytochrome C ou Smac [Kashkar *et al.*, 2005].

Cependant, il a été montré que d'autres SMases sont impliquées dans la génération de céramide après irradiation. Ainsi, une perte de la génération de céramide par la nSMase dans une lignée murine WEHI-231 confère une résistance à l'apoptose radioinduite [Chmura *et al.*, 1997]. Cette même enzyme est impliquée dans la génération de céramide radioinduite dans les cellules TF-1, cellules humaines de leucémie myéloïde [Bruno *et al.*, 1998; Jaffrezou *et al.*, 2001]. Dans d'autres types cellulaires, les deux enzymes, soit l'aSMase et la nSMase sont à l'origine de la réponse radioinduite, comme par exemple dans les cellules tumorales SQ-20B [Chmura *et al.*, 1997].

Tout comme pour l'induction de céramide après traitement au TNF-α, à la vincristine ou encore avec un Ac anti-Fas [Hannun, 1996], un modèle biphasique de la production de céramide après irradiation a été présenté [Haimovitz-Friedman, 1998]. Plus récemment, un lien a été mis en évidence entre les protéines impliquées dans la voie de signalisation des dommages radioinduits de l'ADN et dans la génération du céramide. Ainsi, il a été montré dans des lymphoblastes que le céramide est produit dans les premières minutes après irradiation par l'hydrolyse de SM dépendante de l'aSMase et indépendante de la voie induite par les dommages de l'ADN, et qu'une seconde génération de céramide apparaît quelques heures après irradiation induite par la CS. Cette seconde génération est dépendante de la voie des dommages de l'ADN et est médiée par ATM [Vit and Rosselli, 2003]. L'implication de la voie de signalisation des dommages radioinduits de l'ADN dans la génération du céramide a

été confirmée par Ch'ang et collaborateurs. Ils ont montré que lorsque l'apoptose de l'endothélium vasculaire intestinal est inhibée pharmacologiquement par le bFGF, les cellules souches des cryptes intestinales subissent une apoptose induite par le céramide généré *de novo* par la CS pour des doses supérieures à 18 Gy, tandis que ATM inhibe la CS, favorisant ainsi la survie des cellules souches à des doses inférieures à 18 Gy [Ch'ang *et al.*, 2005]. De la même façon, il a été montré que les dommages de l'ADN induisent une génération de céramide via l'activation de la CS dans les cellules HeLa [Liao *et al.*, 1999].

L'apoptose médiée par le céramide après irradiation est donc générée suite aux dommages de la membrane par l'activation de l'aSMase ou encore de la nSMase, mais aussi suite aux dommages de l'ADN par l'activation de la CS.

Certaines études ont mis en évidence les mécanismes de signalisation intracellulaire mise en place par la génération radioinduite de céramide. Dans les cellules BAEC (Bovine Aortic Endothelial Cells) et U937, l'induction de céramide par un stress, qu'il soit dû aux radiations, aux UV, à la chaleur, aux cytokines ou encore oxydatif, active le système JNK et l'apoptose. En effet, il a été montré que les dominants négatifs pour les kinases de la cascade JNK sont résistants à l'apoptose en réponse à l'ajout de céramide exogène, ou encore aux radiations [Verheij *et al.*, 1996]. Dans les cellules Rat-1 Myc-ER, le céramide induit en réponse aux radiations mais aussi aux UVC ou à l'hyperosmolarité, couple la PI3K à la cavéoline-1, induisant l'inactivation de la PI3K [Zundel and Giaccia, 1998]. Puisque la voie de signalisation de la PI3K confère des signaux anti-apoptotiques dans de nombreuses lignées de mammifères, son inactivation favorise une réponse apoptotique suite aux radiations. L'implication de la protéine Bcl-2, elle, est controversée en ce qui concerne son rôle dans la réponse à la génération radioinduite de céramide. Dans les cellules Jurkat, les radiations, CD95, ou encore l'étoposide induisent la génération de céramide et l'apoptose. L'ajout de Bcl-2 inhibe la réponse apoptotique de ces cellules [Tepper *et al.*, 1999]. Cependant, d'autres études ont montré que la protéine Bcl-2 n'inhibe pas la génération de céramide induite par un stress [Decaudin *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1995; Susin *et al.*, 1996]. L'implication de la protéine Bax en aval du céramide a été démontrée. Des fibroblastes aSMase^{-/-} issus de patients atteints de la maladie Niemann Pick ne présentent pas de changement conformationnel de la protéine Bax ni sa translocation à la membrane, pas de relargage de cytochrome C. Ces fibroblastes sont résistants à l'apoptose induite par les UV. La translocation de Bax est restaurée par l'ajout de céramide exogène ou par l'expression transitoire de l'aSMase [Kashkar *et al.*, 2005].

Il est important de noter que la modulation pharmacologique du céramide en réponse aux radiations peut affecter les niveaux de céramide et la sensibilité de la réponse aux radiations. En effet, l'équipe de Weichselbaum a sélectionné une population de WEHI-231 par un traitement sur une longue période avec un inhibiteur de l'acide céramidase, la *N*-oléylethanolamine. Cet inhibiteur empêche la dégradation du céramide intra-cellulaire en sphingosine, conférant ainsi aux cellules une résistance à l'apoptose médiée par l'aSMase en réponse aux radiations [Chmura *et al.*, 1997].

III.4. Importance du céramide dans la mort radioinduite des cellules endothéliales

Nous avons établi précédemment l'importance des cellules endothéliales dans l'intégrité du tissu sain et tumoral après irradiation. Plusieurs études ont montré le rôle de l'aSMase et du céramide dans la réponse des cellules endothéliales aux radiations dans les tissus sains, tels que dans les poumons [Santana *et al.*, 1996], dans la muqueuse intestinale, [Paris *et al.*, 2001], et dans le SNC [Li *et al.*, 2003 ; Pena *et al.*, 2000]. Les mesures de la cinétique de génération du céramide dans les extraits tissulaires de poumon montrent que l'apoptose des cellules endothéliales est précédée par une augmentation de la concentration en céramide, qui peut atteindre jusqu'à deux fois son taux basal 15 min après une dose de 15 Gy [Santana *et al.*, 1996]. La preuve que l'activation de l'aSMase est nécessaire pour cette réponse aux radiations provient d'études réalisées sur des souris invalidées pour le gène de *asmase* (Figure 16), qui démontrent une inhibition de la génération du céramide dans l'endothélium des poumons, de l'intestin ou encore du cerveau après une irradiation corporelle totale d'animaux *asmase*^{-/-}. Ces animaux présentent cependant une apoptose normale p53-dépendante dans le thymus, alors que dans les souris *p53*^{-/-} une génération normale de céramide et une apoptose sont observées dans le poumon et l'intestin, et que l'apoptose dans le thymus est inhibée. Ces résultats montrent que les voies dépendantes de p53 et de la SM sont indépendantes. Ainsi, dans les souris *asmase*^{-/-}, le SGI est inhibé, confirmant l'implication de l'apoptose médiée par le céramide des cellules endothéliales dans l'intégrité tissulaire.

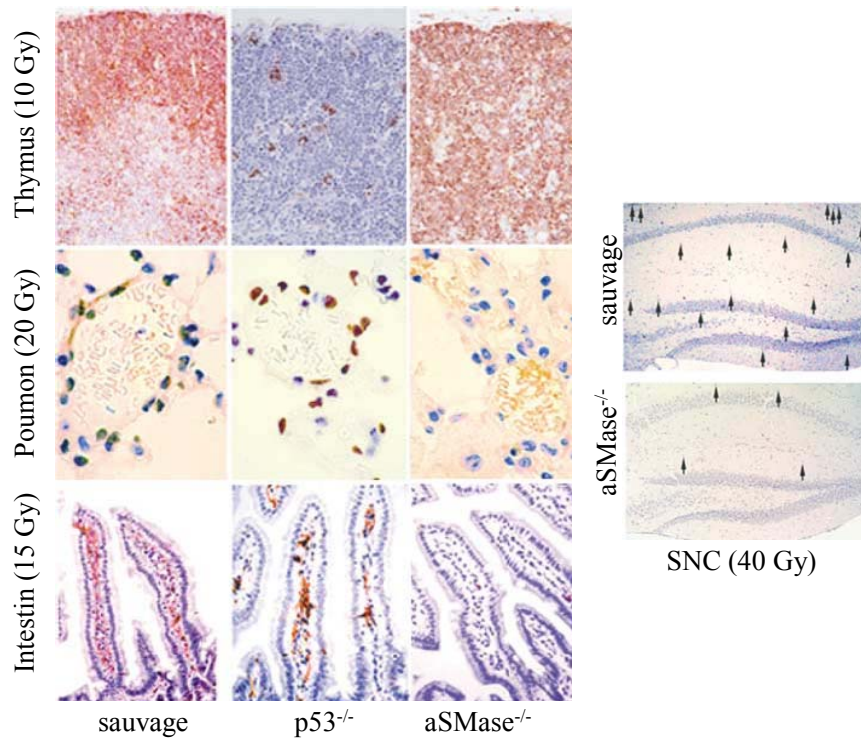


Figure 16 : Coupe histologiques mettant en évidence l'apoptose des cellules endothéliales par marquage TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labelling). Les tissus ont été obtenus à partir de souris dont le fond génétique est indiqué 4 à 10 h après une irradiation corporelle totale. Les noyaux marrons indiquent la présence de cellules apoptotiques [Paris *et al.*, 2001; Pena *et al.*, 2000; Santana *et al.*, 1996].

Il a été montré que l'injection intraveineuse de bFGF empêche la génération de céramide et inhibe la réponse apoptotique des cellules endothéliales dans l'intestin, le cerveau et les poumons des souris sauvages [Haimovitz-Friedman *et al.*, 1997a; Paris *et al.*, 2001; Pena *et al.*, 2000; Santana *et al.*, 1996]. Ces données *in vivo* confirment celles observées *in vitro*, montrant l'inhibition de la génération de céramide aSMase-dépendante et de l'apoptose des cellules endothéliales par le bFGF [Fuks *et al.*, 1995; Haimovitz-Friedman *et al.*, 1994a]. Cette inhibition de l'apoptose des cellules endothéliales est médiée d'une part par l'activation de la PKC et de la voie des MAPK [Haimovitz-Friedman *et al.*, 1994a; Verheij *et al.*, 1996], mais aussi par l'inhibition de la génération de céramide médiée par l'aSMase (Données non publiées par le groupe d'Haimovitz-Friedman, revue dans [Kolesnick and Fuks, 2003]).

De la même façon des études ont montré le rôle de l'aSMase et du céramide dans la réponse des cellules endothéliales aux radiations dans les tumeurs [Garcia-Barros *et al.*, 2003]. Des mélanomes B16F10, ou encore des fibrosarcomes MCA/129 ont été transplantés dans des souris sauvages ou invalidées pour le gène *asmase*. Il est important de noter que les

mêmes tumeurs ont été implantées dans les deux types de souris, levant ainsi l'hypothèse que les différences de croissance et de réponses aux radiations seraient dues à leur expression différentielle de l'aSMase dans l'hôte. Ces résultats montrent que les tumeurs poussent 2 à 4 fois plus vite dans les souris déficientes pour l'aSMase. De plus, les tumeurs des souris sauvages sont radiosensibles. Par exemple, le fibrosarcome montre une diminution de 70 % de sa taille après une dose de 15 Gy, alors que les mêmes tumeurs des souris *asmase*^{-/-} sont résistantes. Cette différence de radiosensibilité des tumeurs est due à la différence observée dans l'apoptose radioinduite des cellules endothéliales de la microvascularisation tumorale. Les cellules endothéliales déficientes pour l'aSMase sont résistantes à l'apoptose. Suite à ces résultats l'hypothèse d'une réponse immune anti-tumorale déficiente dans les souris *asmase*^{-/-} a été émise. Cette déficience pourrait être à l'origine de la résistance tumorale aux radiations. Garcia-Barros et collaborateurs ont cependant montré que ni les souris sauvages, ni les souris *asmase*^{-/-} ne montrent d'infiltrat endo ou péri-tumoral, témoin d'une quelconque réponse immune [Garcia-Barros *et al.*, 2004]. Les mélanomes B16F10 et les fibrosarcomes MCA/129 ont ensuite été transplantés dans des souris *Rag*^{-/-} et *MEF*^{-/-}, qui n'expriment pas les populations cellulaires de la fonction immune, soit les cellules NK, T et B. Les tumeurs ne montrent pas de différence de croissance ou de radiosensibilité par rapport aux tumeurs transplantées dans les souris sauvages. Enfin, ils ont validé le fait que les souris *asmase*^{-/-} expriment des fonctions cellulaires induites par les cellules NK, T ou B normales. Ces résultats démontrent que la régression tumorale dépend effectivement de la radiosensibilité des cellules endothéliales. D'autres études ont confirmé cette implication de l'apoptose radioinduite médiée par le céramide des cellules endothéliales tumorales [Rafii and Lyden, 2003]. Ainsi, l'irradiation de cellules endothéliales purifiées à partir de microvaisseaux tumoraux entraîne une apoptose si les cellules expriment l'aSMase, mais est sans effet sur les cellules endothéliales *aSMase*^{-/-}. De plus, la transplantation de cellules de moelle osseuse, progéniteurs pour l'angiogenèse tumorale, dans les souris *asmase*^{-/-} restaure la radiosensibilité de la tumeur [Garcia-Barros *et al.*, 2003]. A l'inverse, la transplantation de moelle osseuse *asmase*^{-/-} dans des souris sauvages résulte en une radio-résistance des tumeurs.

Ces observations sur l'apoptose radioinduite médiée par la génération de céramide montrent l'importance du couple aSMase/céramide dans la modulation de la radiosensibilité d'un tissu sain ou tumoral. Il a été montré que les effets du céramide peuvent être modulés génétiquement par l'abrogation de l'expression de l'aSMase [Paris *et al.*, 2001; Pena *et al.*, 2000; Santana *et al.*, 1996], ou encore pharmacologiquement par le bFGF [Haimovitz-

Friedman *et al.*, 1997a; Paris *et al.*, 2001; Pena *et al.*, 2000; Santana *et al.*, 1996]. Ces données ont une grande importance, car elles laissent supposer que la modulation de cette voie du céramide dans la réponse radioinduite pourrait permettre d'optimiser les traitements anti-cancéreux. Cela permettrait aussi de limiter les effets délétères sur les tissus sains dépendants de l'apoptose des cellules endothéliales médiée par le céramide lors de traitements radio-thérapeutiques.

IV LA SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE (S1P), UN METABOLITE DU CERAMIDE

La S1P est un dérivé de la sphingosine, qui est la structure primaire de la majorité des sphingolipides. Elle a été identifiée en 1884 par Thudichum et nommée le « Sphinx », à cause de sa structure énigmatique. Il a fallu attendre plus d'un siècle avant de voir ce lipide comme un médiateur cellulaire vital. La S1P était à l'origine considérée comme formée principalement au cours de la détoxification de la sphingosine par la phosphorylation et la dégradation de cette dernière [Stoffel and Assmann, 1970]. Depuis, la S1P a été montrée comme régulant de nombreuses fonctions cellulaires comme la croissance cellulaire [Olivera and Spiegel, 1993; Zhang *et al.*, 1991] ou encore inhibant la mort cellulaire programmée, ou apoptose [Cuvillier *et al.*, 1996]. Une littérature très importante a pris place depuis sur les nombreuses fonctions de la S1P dans les organismes supérieurs. Le fait qu'une simple molécule telle que la S1P puisse avoir de si nombreuses fonctions cellulaires est dû à sa signalisation intracellulaire mais aussi à ses fonctions extracellulaires spécifiques. Enfin, la S1P a un intérêt majeur car elle fonctionne en tant que rhéostat du céramide, puisqu'il s'agit d'un antagoniste naturel du céramide.

IV.1. Présentation de la S1P

IV.1.1. Synthèse et dégradation

Comme pour de nombreuses molécules de signalisation, les niveaux de S1P intracellulaire sont faibles et régulés très finement par une balance entre sa synthèse et sa dégradation (Figure 17).

L'activité de la Sphingosine Kinase (SphK), qui catalyse la phosphorylation ATP-dépendante (Adénosine Tri-Phosphate) de la sphingosine est stimulée par de nombreux agonistes, ce qui indique qu'il s'agit d'une enzyme centrale régulant la synthèse de S1P. La dégradation de la S1P est médiée par deux voies différentes : la première, qui est réversible, est la déphosphorylation reformant de la sphingosine par une S1P phosphatase (SPP) spécifique. La seconde, qui est irréversible, est la dégradation par une S1P lyase (Spl) de la S1P en hexadecenal et phosphoethanolamine, ces deux métabolites étant réutilisés pour la biosynthèse de la phosphatidylethanolamine.

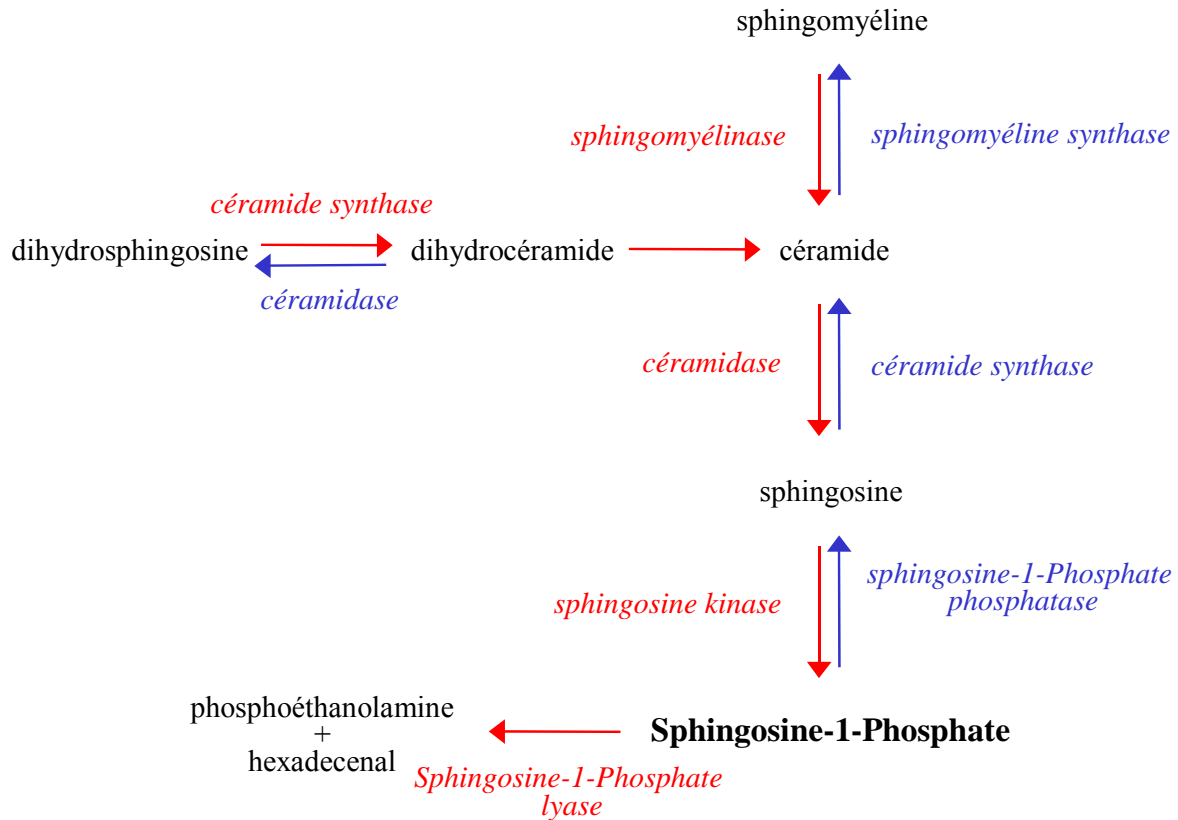


Figure 17 : Métabolisme de la SIP dans les cellules de mammifères.

Les SphK constituent une classe distincte de kinases lipidiques formées de 5 domaines très conservés au cours de l'évolution. Deux isoenzymes de mammifères nommées SphK1 et SphK2 ont été clonées et caractérisées [Liu *et al.*, 2002]. Elles sont localisées principalement dans le cytosol, bien que de petites quantités soient associées à la membrane. Ces deux enzymes ont des distributions tissulaires et temporelles bien distinctes, indiquant qu'elles induisent des fonctions cellulaires précises et qu'elles sont régulées différemment. En effet, l'ARNm (ARN messager) de SphK1 est exprimé principalement dans le cerveau, le cœur, le thymus, la rate, les reins et les poumons [Melendez *et al.*, 2000], tandis que SphK2 est fortement localisée dans les reins et le foie [Liu *et al.*, 2000a]. Il est possible que d'autres isoformes de SphK existent puisque des expériences d'immunodéplétion utilisant des Ac anti-SphK1 et anti-SphK2 ne lèvent pas toute l'activité SphK dans de nombreux tissus de souris [Fukuda *et al.*, 2003]. Récemment des souris invalidées pour *SphK1* ont montré que SphK1 n'est pas indispensable pour la viabilité ou la fertilité des souris. De plus, des fonctions médiées par la SIP telles que le développement vasculaire, ou encore la distribution lymphocytaire ne sont pas dépendantes de la SphK1 [Allende *et al.*, 2004]. Les SphKs sont activées par de nombreux agonistes qui régulent positivement la croissance cellulaire. Ces

activateurs en amont sont les RCPGs (Récepteurs Couplés aux Protéines G), les petites GTPases, les récepteurs à tyrosine kinase, les cytokines pro-inflammatoires, le Ca^{2+} , les activateurs de protéines kinase, entre autres [Maceyka *et al.*, 2002].

Les Spl constituent la principale voie de dégradation de la S1P par le clivage entre ses carbonnes C_2 et C_3 . Le premier gène *Spl* caractérisé a été cloné chez *Saccharomyces cerevisiae* [Saba *et al.*, 1997]. Les ADNc (ADN complémentaire) murin et humain des Spl ont été clonés sur la base de leurs homologues de séquence avec les gènes de la levure [Van Veldhoven *et al.*, 2000; Zhou and Saba, 1998]. La Spl est localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique [Zhou and Saba, 1998], et est exprimée de façon ubiquitaire parmi les différents tissus de mammifères, à l'exception des plaquettes où elle est absente [Pyne and Pyne, 2000]. L'étude de l'expression des ARNm de Spl montrent qu'elle est exprimée majoritairement dans le foie, les reins, les poumons, le cœur et le cerveau.

Les premières SPPs identifiées ont été clonées chez la levure et ont été montrées comme étant d'important régulateurs de la réponse au stress thermique [Mandala *et al.*, 1998; Mao *et al.*, 1999; Mao *et al.*, 1997]. Les gènes codant pour deux SPPs de mammifères, SPP1 [Le Stunff *et al.*, 2002b; Mandala *et al.*, 2000] et SPP2 [Ogawa *et al.*, 2003], ont ensuite été clonés sur la base de leurs homologues de séquences avec les gènes de levure. Ces SPPs sont dépendantes du Mg^{2+} et sont localisées dans le réticulum endoplasmique [Le Stunff *et al.*, 2002b; Ogawa *et al.*, 2003]. Les SPPs ont une grande variété de substrats comme la S1P, mais aussi le LPA (acide lysophosphatidique), l'acide phosphatidique ou le céramide-1-phosphate [Brindley and Waggoner, 1998].

IV.1.2. Secréation de la S1P

La majorité des cellules produisent de la S1P intracellulaire. Cependant, la S1P fonctionne aussi comme un médiateur extracellulaire par son interaction avec des RCPGs. Avant de discuter des ses fonctions intracellulaires et extracellulaires, il est important de comprendre comment la S1P est exportée hors de la cellule.

La S1P, par sa tête polaire qui contient des ions phosphate et ammonium, ainsi qu'un groupe hydroxyl, ne peut traverser la membrane plasmique directement. Ainsi, la sécrétion de la S1P dans le milieu extracellulaire nécessite certainement la fonction d'organelles de sécrétion, ou de transporteurs spécifiques. Cette activité de transport de la S1P a été décrite

chez la levure [Boujaoude *et al.*, 2001]. Chez les mammifères, les mécanismes précis de sécrétion, c'est à dire si la S1P est accumulée et sécrétée via des vésicules de sécrétion, ou bien si elle est exportée par un transporteur, sont peu connus. Cependant on sait que les cellules d'origine hématopoïétique sont connues pour sécréter activement la S1P. Ainsi, les plaquettes, les monocytes et les mastocytes sont les secréteurs de S1P les plus intenses [Yatomi *et al.*, 2001]. Récemment, il a été montré que les mastocytes relarguent la S1P par l'intermédiaire du transporteur ABCC1, un transporteur dépendant de l'ATP [Mitra *et al.*, 2006]. Les cellules du SNC telles que les cellules granulaires ou les astrocytes sont aussi capables de sécréter la S1P [Anelli *et al.*, 2005]. Cependant, on sait que d'autres cellules somatiques en culture, comme les fibroblastes et les cellules endothéliales, ne sécrètent pas de S1P [Hla, 2003]. De plus, la surexpression de l'enzyme SphK dans des cellules embryonnaires humaines de rein, et dans des fibroblastes NIH3T3 résulte en une très forte augmentation de S1P intracellulaire, mais pas d'augmentation significative de S1P dans le milieu extracellulaire [Olivera *et al.*, 1999]. Les études menées par le groupe d'Obeid [Johnson *et al.*, 2002] ont montré que l'activation de cellules embryonnaires humaines de rein par l'ester de phorbol induit la translocation de la SphK à la membrane plasmique, suivie de l'augmentation de S1P extracellulaire. Ces résultats laissent penser que la SphK doit être transloquée à la membrane afin de pouvoir catalyser la phosphorylation de son substrat hydrophobe, la sphingosine, permettant ainsi la production de S1P à travers la membrane dans certains contextes [Johnson *et al.*, 2002]. Il a été montré sur des cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) ou sur des cellules embryonnaires humaines de rein transfectées par la SphK qu'une fraction significative de l'enzyme (environ 5 %) est constitutivement excrétée vers le milieu [Ancellin *et al.*, 2002]. La SphK sécrétée est enzymatiquement active. Cependant, son activité est limitée par le fait que la sphingosine extracellulaire est assez restreinte. La sécrétion de SphK est constitutive et ne semble pas être activée par des stimuli extracellulaires. Dans les cellules du SNC la sécrétion de S1P n'implique pas l'exportation de la SphK [Anelli *et al.*, 2005].

Le clonage récent de la seconde isoforme SphK2 et de la SPP, ainsi que le développement de nouvelles méthodes d'analyse et de détection des enzymes pourront certainement permettre de développer notre compréhension sur la sécrétion de la S1P dans le milieu extracellulaire [Liu *et al.*, 2002].

La concentration de S1P dans le plasma humain est d'environ 200 nM et double dans le sérum pour atteindre environ 500 nM [Yatomi *et al.*, 2001]. Plusieurs techniques de dosage

ont été mises en place, par exemple par la mesure de sa modification chimique en S1P-acétylée N(H³) [Yatomi *et al.*, 1995], ou encore par sa déphosphorylation en sphingosine suivie de sa rephosphorylation en (³²P)S1P [Edsall and Spiegel, 1999]. Ainsi, de nombreuses études ont rapporté des mesures de concentration de S1P. Celle-ci varie selon les organismes, les tissus, ou selon les différents types cellulaires (tableau 4).

<i>Species</i>	<i>Plasma/serum</i>	<i>S1P (μM)</i>	<i>Sphingosine (μM)</i>	<i>Ref</i>
Human	Plasma	0.19±0.08	-	[Igarashi and Yatomi, 1998]
Human	Serum	0.48±0.08	-	[Igarashi and Yatomi, 1998]
Bovine (calf)	Serum	0.34	0.05-0.1	[Edsall and Spiegel, 1999]
Bovine (calf)	Serum	0.11	0.05-0.1	[Edsall and Spiegel, 1999]
Horse	Serum	0.68	0.05-0.1	[Edsall and Spiegel, 1999]
<i>Cell type</i>		<i>S1P (pmol/10⁸ cells)</i>	<i>Sphingosine (pmol/10⁸ cells)</i>	<i>Ref</i>
Platelets		141 ± 4	37 ± 6	[Yatomi <i>et al.</i> , 1995]
Neutrophils		150 ± 28	-	[Yatomi <i>et al.</i> , 1995]
Erythrocytes		7.17 ± 1.66	-	[Yatomi <i>et al.</i> , 1995]
Swiss 3T3		1600 ± 200	-	[Olivera and Spiegel, 1993]
HL60		111 ± 10	2500 ± 280	[Edsall and Spiegel, 1999]
Jurkat		40 ± 10	610 ± 60	[Edsall and Spiegel, 1999]
U937		2030 ± 160	1380 ± 120	[Edsall and Spiegel, 1999]
C6 glioma		1670 ± 390	414 ± 860	[Edsall and Spiegel, 1999]
MCF7		1140 ± 140	11000± 570	[Edsall and Spiegel, 1999]
PC12		860 ± 60	12100 ± 710	[Edsall and Spiegel, 1999]

Tableau 4: Concentrations de S1P et de sphingosine dans différents organismes, organes ou types cellulaires (d'après [Pyne and Pyne, 2000]).

IV.1.3. Signalisation induite par la S1P

Une certaine confusion existe dans la littérature concernant l'importance de la signalisation induite par les métabolites sphingolipidiques. En effet, les observations dépendent du type cellulaire, de la nature du stimulus observé, mais surtout de la balance entre les différents phospholipides qui peuvent médier des voies de signalisation opposées. Ainsi, la S1P agit comme un rhéostat du céramide soit intracellulairement, soit extracellulairement par sa liaison aux récepteurs S1Ps.

IV.1.3.1. Signalisation intracellulaire de la S1P

Le fait que les niveaux de S1P intracellulaire cytosolique soient stables et que sous certaines conditions la concentration en S1P augmente laisse penser que la S1P fonctionne comme un second messager intracellulaire [Spiegel and Milstien, 2002]. Par exemple, le traitement de cellules de mammifères en culture avec des hormones comme la vitamine D, avec des facteurs de croissance comme le PDGF ou le NGF ou encore avec des cytokines telles que le TNF α induit une augmentation transitoire de la concentration en S1P cytosolique [Spiegel and Milstien, 2002]. D'autres études ont montré que la S1P active directement les canaux calciques intracellulaires [Ghosh *et al.*, 1994]. Ces résultats ont été confirmés par le fait que des activateurs de la S1P intracellulaire augmentent les concentrations intracellulaires de Ca²⁺ [Spiegel, 1999]. De plus, le *N,N'*-diméthyl sphingosine, inhibiteur de la SphK mais aussi de la PKC ou des canaux ioniques inhibe le relargage de Ca²⁺ induit par un stimulus, confortant le fait que la S1P agit comme second messager [Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998]. Le Ca²⁺ induit l'ouverture ou la fermeture de plusieurs pores au niveau des organelles impliqués dans la régulation de nombreuses voies de signalisation. En plus de la mobilisation du Ca²⁺, les effets de pro-survie et de pro-croissance de la S1P peuvent être attribués à une action intracellulaire. La synthèse d'ADN mise en évidence par l'incorporation de thymidine est indépendante de l'expression de S1P₁, et dépend de l'incorporation de S1P [Van Brocklyn *et al.*, 1998]. De plus, la dhS1P (dihydro-S1P), un agoniste de S1P₁ ne protège pas de l'apoptose induite par la SMase, tandis qu'un analogue de la S1P qui n'est pas un agoniste de S1P₁ protège significativement de la mort cellulaire [Van Brocklyn *et al.*, 1998].

IV.1.3.2. Signalisation extracellulaire par les récepteurs S1Ps

Des récepteurs de surface pour la S1P ont été découverts assez récemment suite à la recherche d'un ligand endogène pour le récepteur EDG-1 (Endothelial Differentiation Gene 1). Il s'est avéré que la S1P était un agoniste de très forte affinité pour ce récepteur [Lee *et al.*, 1998]. Cela a conduit à l'identification rapide de plusieurs autres récepteurs appartenant à cette même famille, nommés EDG-3, -5, -6 et -8 [Spiegel and Milstien, 2000]. Ces récepteurs ont été renommés récemment par le Comité de Nomenclature de l'Union Internationale de Pharmacologie comme les récepteurs S1P₁ à S1P₅ [Chun *et al.*, 2002]. Si les S1P₁, S1P₂ et S1P₃ sont largement exprimés dans de nombreux tissus comme l'endothélium, le S1P₄ est limité aux tissus lymphoïdes et hématopoïétiques, et le S1P₅ au SNC. Les 5 récepteurs de

cette famille ont une forte affinité pour la S1P et activent différentes voies de signalisation intracellulaire puisqu'ils sont couplés à des petites protéines G différentes. Ainsi, S1P₁ est couplé à la protéine G_i, tandis que S1P₂ est couplé aux protéines G_q, G₁₃ et G_i. De la même façon, S1P₃ est couplé à G_q, G₁₃ et G_i [Hla *et al.*, 2001]. En ce qui concerne les récepteurs S1P₄ et S1P₅, leurs propriétés de couplage avec les protéines G ne sont pas encore claires. Il semblerait cependant qu'ils soient liés aux protéines G₁₃ et G_i (Figure 18). Après l'activation des différentes protéines G, une signalisation intracellulaire a lieu, comme la phosphorylation de certaines protéines, et des systèmes de seconds messagers sont activés, induisant alors des changements dans la régulation cellulaire. Par exemple, S1P₁ régule la formation du réseau d'actine corticale par l'activation de Rac [Lee *et al.*, 1999], tandis que S1P₂, au contraire, inhibe Rac, bloquant ainsi la migration cellulaire [Okamoto *et al.*, 2000]. La découverte de ces récepteurs apporte donc un autre concept que celui posé par les études dans lesquelles la S1P était administrée aux cellules et dont les effets étaient supposés être dus à une action en tant que second messager intracellulaire.

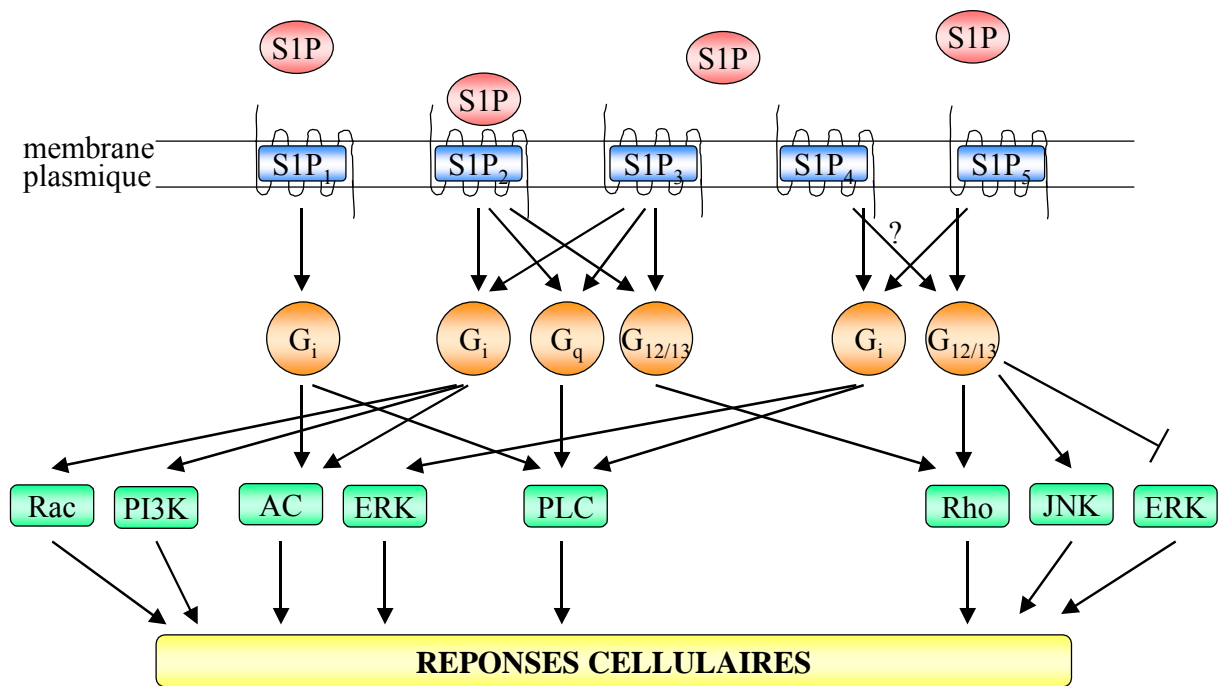


Figure 18: Activation des voies de signalisation spécifiques de chacun des récepteurs S1Ps couplés à des protéines G [Spiegel and Milstien, 2003].

La S1P est donc produite suite à la dégradation du céramide, mais aussi suite à une stimulation externe qui induit sa formation et sa fonction de second messager avant sa dégradation par la SphL ou sa phosphorylation par la SPP. De plus, la S1P peut être relarguée

par les cellules et agir de façon paracrine et/ou autocrine par son interaction avec ses récepteurs, médiant ainsi des actions extracellulaires (Figure 19).

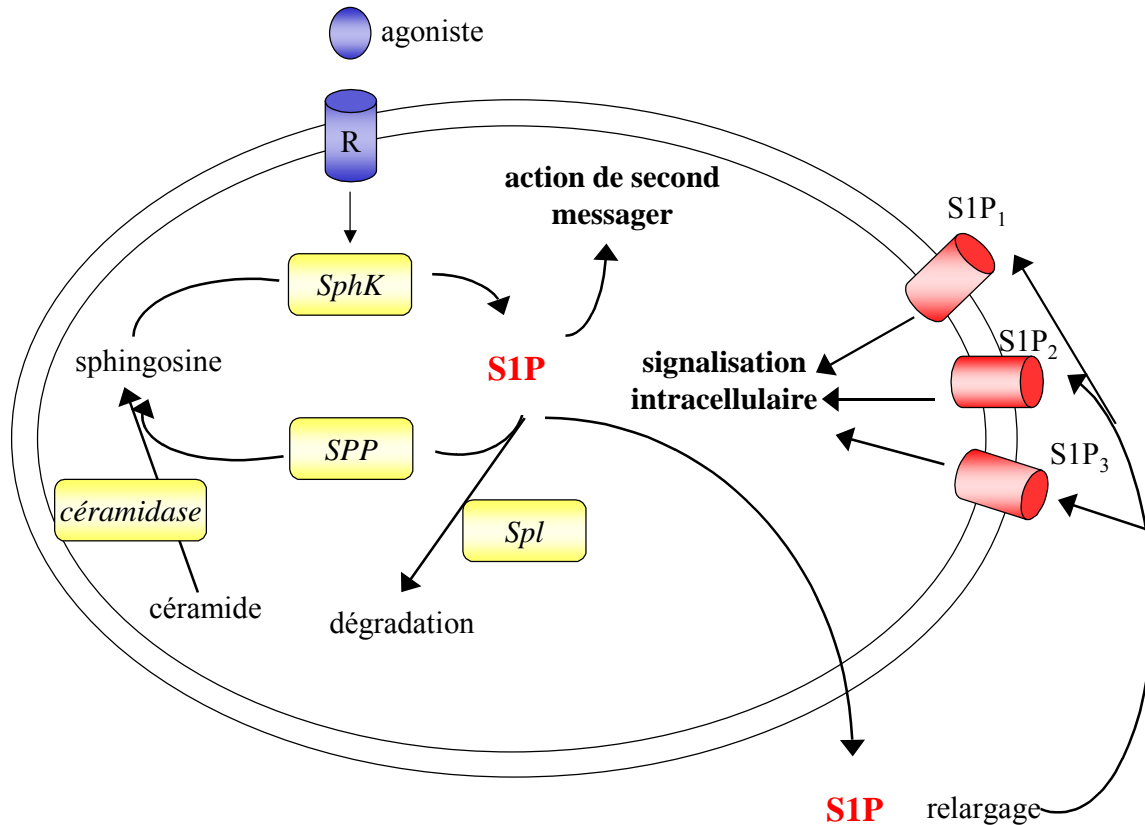


Figure 19 : Actions intracellulaires et extracellulaires de la S1P.

IV.2. Les fonctions de la S1P

IV.2.1. Activation de la prolifération

Les premières études ont montré que l'addition de S1P à des fibroblastes induit la synthèse d'ADN et la prolifération [Zhang *et al.*, 1991]. Depuis, la liste des cellules qui répondent de la même façon à la S1P s'est agrandie, et on peut y inclure les cellules endothéliales et les cellules vasculaires musculaires lisses. De nombreuses études montrent que cette activation de la prolifération est inhibée par la TP (Toxine Pertussique) qui découple les protéines G_i , montrant que l'action de récepteurs extracellulaires est impliquée dans cette activation de la prolifération [Goodemote *et al.*, 1995; Hla *et al.*, 2001]. Dans les cellules vasculaires musculaires lisses, il a été montré que l'activation de $p70^{S6K}$ dépendante du couple S1P₁/ G_i induit l'expression de la cycline D1, résultant dans la synthèse d'ADN et l'entrée en mitose [Kluk and Hla, 2001].

IV.2.2. Régulation de la motilité cellulaire

La S1P est un régulateur potentiel de la motilité cellulaire *in vitro*. Les études menées par le groupe d'Igarashi ont été les premières à montrer que la S1P inhibe la migration des cellules de mélanome et des cellules vasculaires musculaires lisses [Bornfeldt *et al.*, 1995; Sadahira *et al.*, 1992]. Un traitement par la S1P extracellulaire inhibe la formation de fibres de stress par le cytosquelette d'actine et induit une inhibition de la motilité. Dans les cellules tumorales de sein, la S1P inhibe aussi la migration [Wang *et al.*, 1999]. Dans cette étude l'action de la S1P semble être intracellulaire. De nombreux travaux ont été menés sur la S1P et les cellules endothéliales, et la S1P s'avère être un régulateur potentiel de la motilité endothéliale nécessitant une transduction du signal passant par un récepteur couplé à une protéine G_i [English *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Panetti *et al.*, 1997; Panetti *et al.*, 2000]. De plus, l'expression des récepteurs S1P₁ et S1P₃ est nécessaire pour induire la formation de contacts focaux et le chimiotactisme [Paik *et al.*, 2001]. Dans les cellules endothéliales, le traitement par la S1P induit la formation de point focaux dépendants de Rho et dus à l'assemblage des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$ qui induisent l'étalement cellulaire et la migration. Des études *in vitro* [Paik *et al.*, 2001] ou sur des souris invalidées [Ishii *et al.*, 2002] montrent que le récepteur S1P₁ induit l'assemblage de l'actine corticale dépendant de Rac et la formation de lamellipodes, alors que le récepteur S1P₃ contrôle Rho et la signalisation des fibres de stress et des points focaux. L'assemblage de l'actine corticale induit par S1P₁ passe par la voie des PI3K et active Akt [Lee *et al.*, 2001; Morales-Ruiz *et al.*, 2001]. Des dominants négatifs d'Akt inhibent l'activation de Rac induite par la S1P, l'assemblage de l'actine corticale et la migration [Lee *et al.*, 2001]. Ces études mettent en évidence l'importance de la voie PI3K/Akt dans la motilité cellulaire induite par la S1P.

Contrairement à S1P₁, le récepteur S1P₂ inhibe la migration cellulaire induite par la S1P, mais aussi par les récepteurs à tyrosine kinase tels que les récepteurs à l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) et PDGF [Okamoto *et al.*, 2000]. Les mécanismes par lesquels S1P₂ inhibent Rac sont peu clairs. Cependant, des études ont montré que l'activation d'une protéine GAP (Rac-GTPase-Activating Protein) pourrait être impliquée [Takuwa, 2002].

IV.2.3. Action sur la différenciation

Les cellules HEK293 transfectées par le récepteur S1P₁ ont une morphologie sous forme d'agrégats, un phénomène appelé différenciation morphogénétique [Lee *et al.*, 1998].

Ces assemblages entre cellules sont dus à des jonctions adhérentes via une signalisation induite par Rho [Lee *et al.*, 1998]. Dans les cellules endothéliales vasculaires, un traitement à la SIP entraîne l'assemblage de jonctions adhérentes via la régulation de Rho et de Rac GTPases [Lee *et al.*, 1999]. Des oligonucléotides antisens de S1P₁ ou S1P₃ empêchent la formation de ces jonctions adhérentes. Ainsi, la SIP semble être importante pour l'assemblage et le maintien de jonctions adhérentes entre les cellules endothéliales [Lee *et al.*, 1999]. Ces jonctions sont composées de plusieurs molécules d'adhésion telles que VE-cadhérine, PECAM-1, etc. [Dejana *et al.*, 2000]. En particulier, la VE-cadhérine est indispensable pour le développement vasculaire et l'angiogenèse puisque des souris invalidées pour le gène *VE-cad* meurent pendant le développement embryonnaire à cause de la mort des cellules endothéliales [Carmeliet *et al.*, 1999]. De plus, la VE-cadhérine est nécessaire au maintien de la perméabilité vasculaire des vaisseaux matures [Dejana *et al.*, 2000]. Puisque S1P₁ est nécessaire pour réguler l'assemblage de VE-cadhérine dans les jonctions adhérentes, ce récepteur semble nécessaire pour le développement et le maintien de la vascularisation. La SIP inhibe aussi la perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales *in vitro* induite par la thrombine [Garcia *et al.*, 2001]. Ce phénomène implique l'activité de Rac. Cependant, des études *in vivo* sont nécessaires pour déterminer si la signalisation de la SIP via ses récepteurs est importante pour la régulation de la perméabilité vasculaire.

IV.2.4. Action sur la régulation des systèmes biologiques

Les récepteurs S1Ps sont exprimés sur les cellules du système immunitaire telles que les cellules B et T [Graler and Goetzl, 2002]. L'activation des cellules T par leurs récepteurs régulent l'expression des récepteurs S1Ps chez l'homme et la souris [Graeler *et al.*, 2002; Graler and Goetzl, 2002]. Ces résultats semblent indiquer que la SIP module la fonction des cellules immunitaires qu'elles soient naïves ou activées. De plus, la SphK est largement exprimée dans les cellules du système immunitaire telles que les mastocytes, les monocytes ou les neutrophiles [Choi *et al.*, 1996; Prieschl *et al.*, 1999]. Ainsi, la SphK est activée suite à l'activation du récepteur au fragment Fc dans les mastocytes et par les facteurs chimiotactiques dans les neutrophiles [Choi *et al.*, 1996]. Plusieurs de ces cellules sécrètent de la SIP, suggérant que l'activation de ces cellules pendant l'immunité et les réactions de défense contre le non-soi entraînent la production de SIP qui peut agir dans l'environnement comme un facteur paracrine. Kappos et collaborateurs ont montré récemment que le

Fingolimod (Novartis Pharma), un agoniste des récepteurs S1Ps diminue le nombre de lésions de démyélinisation lors du traitement de patients atteints de sclérose en plaque [Kappos *et al.*, 2006].

En plus de ces effets sur le système immunitaire, la S1P a de nombreuses fonctions dans des cellules isolées à partir d'organes de différents systèmes, tels que les cellules reproductrices, les hépatocytes, les cellules du système neuronal ou encore les cellules osseuses [Hla, 2003]. Par exemple, certains travaux ont montré que la signalisation induite par la S1P active le relargage de Ca^{2+} par les flux calciques du réticulum endoplasmique des ostéoblastes. Elle pourrait donc avoir un rôle dans la physiologie osseuse [Lyons and Karin, 2001].

IV.2.5. Action sur le système cardiovasculaire

Le premier récepteur à la S1P à avoir été cloné et identifié est le S1P₁, anciennement nommé EDG-1, dont les transcrits sont abondants dans les cellules endothéliales traitées aux esters de phorbol [Hla and Maciag, 1990]. De plus, la S1P est sécrétée par les cellules présentes dans le sang telles que les plaquettes, et ses récepteurs sont exprimés par les tissus cardiovasculaires tels que les artères, les veines, le cœur et la microvascularisation. Ainsi, il était logique de penser que la S1P pouvait être un cardio- et/ou un vasorégulateur. La S1P stimule la production de NO, régulateur majeur du tonus vasculaire [Morales-Ruiz *et al.*, 2001]. En effet, elle active la voie PI3K/Akt, induisant la phosphorylation et l'activation de eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase) et la génération de NO. Le NO étant un important médiateur dont la dérégulation est impliquée dans de nombreuses maladies cardiovasculaires, la S1P peut être importante dans le contrôle physiologique normal du système vasculaire.

Dans les cellules vasculaires musculaires lisses, le S1P₁ est exprimé seulement au niveau fœtal, tandis que les récepteurs S1P₂ et S1P₃ sont exprimés tant dans la vie adulte que fœtale [Kluk and Hla, 2001]. La S1P a été à l'origine identifiée comme un inhibiteur de la migration des cellules vasculaires musculaires lisses induite par les facteurs de croissance tels que le PDGF [Bornfeldt *et al.*, 1995]. Des études plus récentes montrent que S1P₁ est essentiel pour la régulation positive du chimiotactisme de ces cellules [Kluk and Hla, 2001; Ryu *et al.*, 2002]. Ainsi, la S1P est un activateur chimiotactique dans la vie fœtale, tandis que le faible taux de S1P₁ par rapport à S1P₂ dans les cellules matures inhibe leur migration. La prolifération des cellules vasculaires musculaires lisses induite par S1P₁ implique la voie G_i/PI3K/p70^{S6K} [Kluk and Hla, 2001]. Ainsi, l'expression différentielle des isoformes de S1Ps

est importante dans la régulation physiologique et/ou pathologique des cellules vasculaires musculaires lisses.

La SIP est aussi impliquée dans l'athérosclérose. Elle est complexée aux lipoprotéines du sang telles que les LDL ou les HDL (High Density Lipoprotein). L'oxydation des LDL est un risque majeur pour l'athérosclérose car elle peut activer les SMases, les céramidases ou encore les SphK dans les cellules musculaires lisses, induisant la production de SIP dans ces cellules qui augmente alors leur pouvoir mitogénique [Auge *et al.*, 1999]. Ces résultats ont été contredits par une étude qui montre que les HDL peuvent exercer une action protectrice au niveau des cellules endothéliales de par leur action au niveau des récepteurs SIPs [Limaye *et al.*, 2005]. Ces études impliquent donc que la SIP ait un rôle, qu'il soit protecteur ou médiateur dans l'athérosclérose.

Des souris invalidées pour le gène *SIP₁* ont révélé qu'il a une fonction essentielle dans le développement embryonnaire [Liu *et al.*, 2000b]. Les souris *SIP₁^{-/-}* meurent pendant leur développement embryonnaire entre 12,5 et 14,5 jours de gestation. Le système vasculaire de ces souris est formé, suggérant que *SIP₁* n'est pas nécessaire pour la vasculogénèse initiale et l'angiogénèse. Cependant, les vaisseaux sont instables et présentent des cassures, des oedèmes et des agrégats. Les péricytes sont mal positionnés autour des vaisseaux entraînant des dysfonctionnements [Liu *et al.*, 2000b]. Ainsi, la SIP semble être primordiale dans la maturation du système vasculaire. La SIP est aussi un facteur pro-angiogénique. Elle semble faire le lien entre l'homéostasie et l'angiogénèse lors de la cicatrisation, des dommages tissulaires ou du développement tumoral [English *et al.*, 2000]. La SIP induit différents effets au niveau des cellules endothéliales tels que la survie cellulaire [Limaye *et al.*, 2005], la stabilisation des vaisseaux sanguins via des interactions avec les cellules murales par la N-cadhérine [Paik *et al.*, 2004], l'angiogénèse [Hla, 2004], et la vasculogénèse [Argraves *et al.*, 2004]. Tous ces effets au niveau des cellules endothéliales laissent penser que la SIP pourrait avoir un rôle au niveau du développement tumoral, en favorisant le développement des vaisseaux tumoraux. Des travaux récents mettent en évidence que les cellules tumorales régulent positivement l'expression de *SIP₁* par les cellules endothéliales tumorales pendant l'angiogénèse, et que ce récepteur est nécessaire afin d'obtenir une réponse angiogénique *in vivo* [Chae *et al.*, 2004].

L'implication de la SIP dans la progression tumorale et l'angiogénèse tumorale a été mise en évidence par l'utilisation d'un agoniste général des récepteurs SIPs, le FTY720. Lorsqu'il est phosphorylé le FTY720 régule négativement l'expression des récepteurs *SIP₁*, *SIP₃*, *SIP₄* et *SIP₅* au niveau de la membrane. *In vivo* le FTY720 inhibe l'angiogénèse induite

par la SIP et il inhibe la croissance tumorale primaire et métastatique de mélanome [Lamontagne et al., 2006] ou encore de cellules tumorales issues de la prostate [Chua *et al.*, 2005]. L'implication du récepteur SIP₁ dans l'inhibition de l'angiogenèse tumorale observée lors de l'utilisation du FTY720 a été confirmée récemment par l'utilisation d'un agoniste spécifique de SIP₁, le SEW2871 [Schmid *et al.*, 2007].

IV.3. Implication du rhéostat S1P/céramide dans l'inhibition de l'apoptose

La balance entre les concentrations cellulaires de céramide et de S1P semble déterminer l'état de la cellule. Généralement, la S1P et le céramide induisent des fonctions cellulaires opposées, c'est à dire prolifération et survie versus arrêt de la croissance et apoptose. Ce modèle de rhéostat est basé sur le fait que le céramide et la S1P régulent de façon différente les membres de la famille ERK et MAPK, ainsi que les caspases [Coroneos *et al.*, 1996; Cuvillier *et al.*, 1996; Pyne *et al.*, 1996]. Cependant, ce modèle de rhéostat S1P/céramide ne tient pas compte du fait que la S1P a une action intracellulaire ou extracellulaire face au céramide (Figure 20).

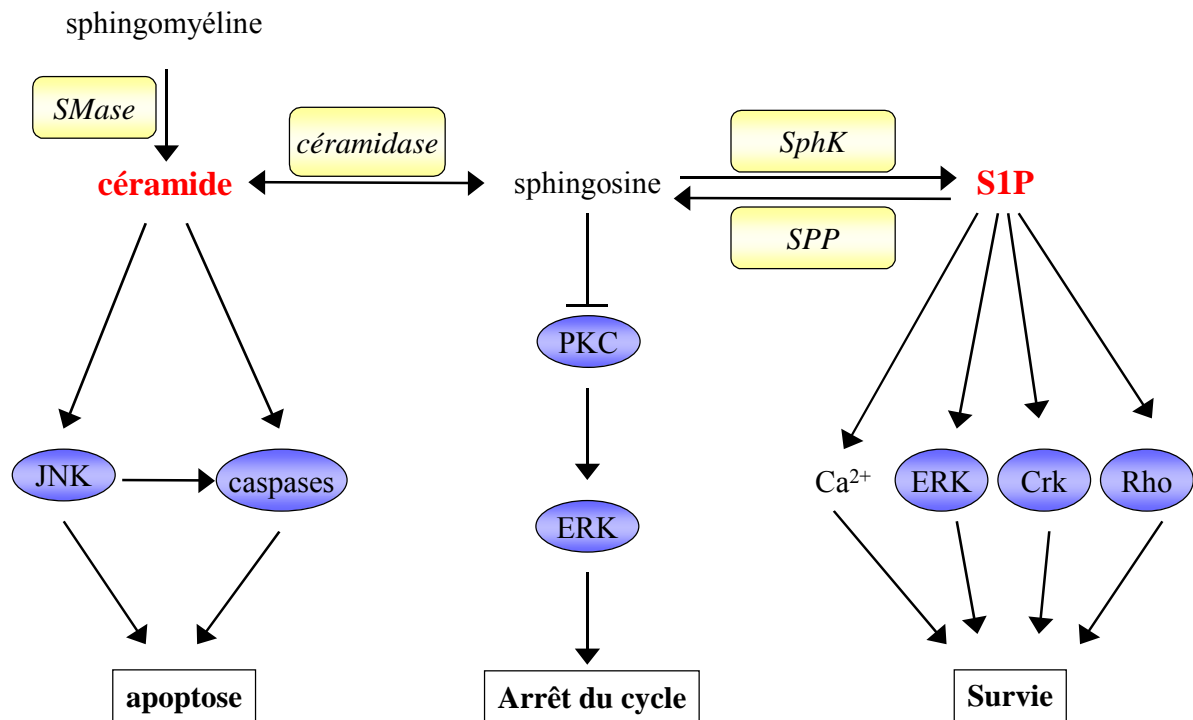


Figure 20: Le modèle du rhéostat S1P/céramide.

Ainsi, il a été montré que la S1P inhibe l'apoptose induite par le céramide, mais aussi par le TNF α , le ligand Fas, et d'autres agents toxiques [Cuvillier *et al.*, 1996; Cuvillier *et al.*,

1998; Edsall *et al.*, 1997; Kleuser *et al.*, 1998; Morita *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 1997]. Récemment le rôle de la protection par la S1P des cellules endothéliales sinusoïdales du foie de rat contre l'apoptose induite par l'éthanol a été mis en évidence [Zheng *et al.*, 2006]. Cette protection semble médiée par la production de NO, mais pas par la voie dépendante d'Akt. Il semble que la mort cellulaire dépendante du relargage de cytochrome C induite par de nombreux stimuli est inhibée par la S1P [Cuvillier *et al.*, 1998]. La S1P extracellulaire inhibe l'apoptose induite par le céramide dans les cellules endothéliales vasculaires par un mécanisme impliquant le récepteur S1P₁ et la voie de signalisation G_i/MAPK [Lee *et al.*, 1999].

Ainsi, dans certains types cellulaires la S1P favorise la survie cellulaire. Dans les cellules transfectées par la SphK, l'apoptose est réduite [Olivera *et al.*, 1999]. De la même façon, les cellules transfectées par la SPP montrent une augmentation de l'apoptose accompagnée d'une augmentation en céramide et sphingosine intracellulaires [Le Stunff *et al.*, 2002a].

Ces études ont montré que le rhéostat S1P/céramide est important pour déterminer si la cellule doit poursuivre dans une voie apoptotique ou de survie [Cuvillier *et al.*, 1996; Edsall *et al.*, 1997; Morita *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 1997]. Ainsi, quand les stimuli augmentent la concentration de céramide et de sphingosine intracellulaire entraînant l'apoptose, des facteurs de survie activent la SphK, résultant en une accumulation de S1P et la suppression de l'apoptose. Par exemple, l'apoptose médiée par le céramide induite par la doxorubicine dans des ovocytes de souris non fertilisés est levée par la S1P, mais pas par la FB1, l'inhibiteur de la CS [Perez *et al.*, 1997]. De la même façon, la S1P protège les ovocytes de souris *in vivo* et *ex vivo* de l'apoptose radioinduite médiée par le céramide [Morita *et al.*, 2000]. L'apoptose radioinduite des ovocytes est médiée par la génération de céramide, ceci ayant été validé par le fait que des souris invalidées pour le gène de l'*asmase* ne perdent pas leurs ovocytes suite aux radiations. Dans cette étude il a été montré que la radioprotection n'est pas médiée par les S1Ps récepteurs, puisque la TP, qui découple les protéines G_i, ne lève pas cette inhibition de l'apoptose. Le mécanisme d'action de la S1P dans cette radioprotection est encore mal connu. De plus, la S1P préserve la fertilité des souris irradiées, sans propagation de dommages génétiques dans les générations suivantes [Paris *et al.*, 2002]. Il s'agit donc d'un champ d'investigation très prometteur pour la préservation des ovocytes chez les femmes en âge d'avoir des enfants et qui subissent un traitement anti-cancéreux. De la même façon, la S1P protège les spermatogonies de l'apoptose radioinduite [Ojala *et al.*, 2004]. Cependant dans cette étude, l'apoptose ne semble pas médiée par la génération de céramide dépendante de

l'aSMase [Ojala *et al.*, 2005]. D'autres travaux ont montré que la S1P protège les ovocytes bovins des dommages engendrés par un choc thermique induit lors de la maturation, et que ces ovocytes ont un développement normal [Roth and Hansen, 2004]. Enfin, la radioprotection des ovocytes murins induite par une injection dans les ovaires de S1P a été récemment validée avec des concentrations plus faibles de S1P, soit 500 nM [Hancke *et al.*, 2006].

La régulation de l'apoptose semble donc être une fonction majeure de ce lipide, en particulier l'inhibition de l'apoptose médiée par le céramide. Il est possible que plus d'un mécanisme puisse être utilisé dans différents systèmes où la S1P induit la survie cellulaire. Ces mécanismes peuvent impliquer le rhéostat céramide/S1P, mais aussi des fonctions intracellulaires ou extracellulaires de la S1P.

PRESENTATION DU PROJET

PRESENTATION DU PROJET

En apportant l'oxygène et les nutriments, le réseau endothélial maintient l'homéostasie tissulaire. La vascularisation représente un tissu fortement différencié où les cellules endothéliales sont quiescentes dans la plupart des conditions normales physiologiques, sauf dans la réparation des tissus. Les dysfonctionnements de l'endothélium, comme la perte du statut non prolifératif, sont impliqués dans de nombreuses pathologies comme au cours de l'angiogenèse tumorale. Ainsi, la compréhension des mécanismes de mort des cellules endothéliales induite par les radiations a une réelle importance au niveau physiologique et pathologique. Plusieurs études ont été menées sur la radiosensibilité des cellules endothéliales en utilisant des tests de clonogénicité, qui mettent en évidence les capacités d'une cellule à se diviser après irradiation. Ces tests représentent des indicateurs de prolifération et de survie cellulaire, qui ne mettent pas en évidence les types de mort radioinduite. La mise en place d'un modèle de radiosensibilité des cellules endothéliales est essentielle pour pouvoir étudier les mécanismes impliqués dans le ou les types de mort radioinduite des cellules endothéliales.

De nouveaux développements en radiobiologie, comme la construction de souris transgéniques, ont déjà permis de mieux comprendre les acteurs impliqués dans la radiosensibilité des cellules endothéliales. Ainsi, des études *in vitro* et *in vivo* ont permis de mettre en évidence le rôle crucial du couple aSMase/céramide dans l'apoptose radioinduite des cellules endothéliales après irradiation, ainsi que dans le maintien de l'intégrité d'un tissu sain ou tumoral. Cependant, cette implication du céramide n'a pas été étudiée en fonction des types particuliers de mort radioinduite des cellules endothéliales.

Il a été montré que la S1P a un rôle important dans la régulation des fonctions induites par le céramide de part sa position de métabolite sphingolipidique. En effet, la S1P est un sphingolipide bioactif impliqué dans la régulation de fonctions biologiques telles que la différenciation, la prolifération, la migration, mais aussi la survie cellulaire, qui s'opposent donc aux voies apoptotiques induites par le céramide. Ainsi la S1P protège les HUVEC de l'apoptose induite par le C₂-céramide. De plus, des études *in vivo* sur des souris C57Bl/6 ont mis en évidence qu'un prétraitement des ovaires par la S1P protège les souris de la stérilité induite par la chimiothérapie ou la radiothérapie en inhibant la mort des ovocytes médiée par le céramide. La balance S1P/céramide a donc la capacité de moduler l'apoptose des cellules et la radiosensibilité des tissus. Cependant, aucune étude à ce jour n'a été effectuée sur les

capacités de la S1P à moduler la mort des cellules endothéliales après de fortes doses d'irradiation.

Dans ce contexte de recherche, l'objectif de ma thèse a été d'étudier l'impact des radiations à dose forte et unique au niveau des types de mort radioinduite dans les cellules endothéliales, et ceci en utilisant deux modèles d'étude :

- un modèle *in vitro* de cellules endothéliales en prolifération
- un modèle *in vivo* où les cellules endothéliales sont majoritairement quiescentes.

Ces deux modèles m'ont permis d'étudier les différents types de mort radioinduite des cellules endothéliales ainsi que l'implication du céramide dans ces types de mort, et ceci en fonction de l'état prolifératif des cellules endothéliales. De plus, j'ai cherché à mettre en évidence si la modulation pharmacologique de la voie métabolique du céramide par la S1P pouvait modifier la mort radioinduite des cellules endothéliales et la réponse tissulaire aux radiations.

RESULTATS

I MISE EN PLACE D'UN MODELE D'ETUDE DE LA RADIOSENSIBILITE DES CELLULES ENDOTHELIALES

I.1. Choix de la lignée cellulaire

La plupart des évènements physiopathologiques prennent place au niveau de la microvascularisation qui constitue la majorité du compartiment vasculaire humain. Afin d'étudier plus en amont la radiosensibilité des cellules endothéliales impliquée dans l'intégrité du tissu sain et tumoral, nous avons donc choisi de travailler sur une lignée de cellules endothéliales de microvaisseaux. Le fait de choisir une lignée et non des cellules primaires s'explique par la plus grande facilité des cellules transformées à être maintenues en culture par rapport aux cellules primaires, ce qui nous affranchit des problèmes liés à la culture. De plus, il n'existe pas de cellules endothéliales transformées spontanément qui sont cultivables à long terme.

Nous avons donc choisi de travailler avec une lignée de cellules endothéliales de microvaisseaux de derme transformées par le virus SV40, mise au point dans l'équipe de Lawley [Ades *et al.*, 1992] et nommées HMEC-1 pour Human Microvascular Endothelial Cell line.

Les cellules HMEC-1 conservent les caractéristiques morphologiques des cellules primaires en culture (Figure 21).

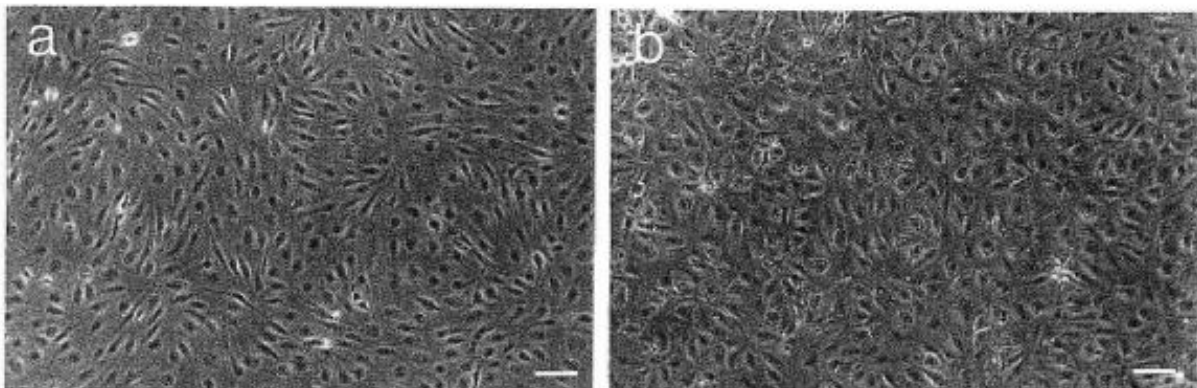


Figure 21: Les HMEC-1 (a) ont la même morphologie que les cellules microvasculaires endothéliales de derme non transformées (b). Barre = 67 μm [Ades *et al.*, 1992].

Lors de l'établissement de la lignée, le groupe de Lawley a vérifié que les HMEC-1 en culture secrètent le facteur von Willebrand, qu'elles expriment les marqueurs constitutifs des cellules endothéliales tels que CD31 et CD34, ainsi que les molécules d'adhésion ICAM-1 et CD44. Elles sont capables de former des structures tubulaires dans le matrigel, et les lymphocytes adhèrent aux HMEC-1 lorsqu'elles sont activées.

I.2. Effets de l'irradiation sur les HMEC-1

I.2.1. Les radiations induisent la mort des HMEC-1 de façon dose-dépendante

Afin d'étudier l'impact des radiations sur les HMEC-1, nous avons choisi de travailler dans deux types de milieu de culture : un milieu complet (MC) complété en Sérum de Veau Fœtal (SVF) 15 % et en EGF 10 ng/ml, et un milieu appauvri (MA) complété seulement avec 0,1 % de SVF. En effet, les conditions de culture préconisées pour les HMEC-1 sont riches en facteurs de croissance et en SVF qui peuvent interférer avec les voies de signalisation induites par les radiations. Les HMEC-1 sontensemencées à 20000 cellules /cm² en MC, incubées pendant 5 jours à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ jusqu'à atteindre la confluence. Lorsque les HMEC-1 atteignent ce stade de confluence, elles cyclent toujours puisqu'elles sont transformées par le virus SV40. Deux heures avant l'irradiation, les milieux de culture sont changés soit pour du MC neuf ou bien du MA préalablement chauffés à 37°C. Les HMEC-1 sont maintenues dans ces milieux jusqu'aux prélèvements.

Nous avons tout d'abord effectué une gamme de dose d'irradiation allant de 0 à 30 Gy. Nos observations au microscope 24 h après irradiation nous ont permis de voir que certaines cellules irradiées se détachent de la monocouche cellulaire, ainsi qu'une hypertrophie des cellules adhérentes, et ce quelles que soient les doses d'irradiation (Figure 22).

L'hypertrophie des HMEC-1 irradiées confirme les observations faites au préalable sur l'étalement des cellules endothéliales irradiées qui comblent ainsi les espaces laissés par les cellules mortes, et maintiennent une monocouche confluyente [Fischer-Dzoga *et al.*, 1984].

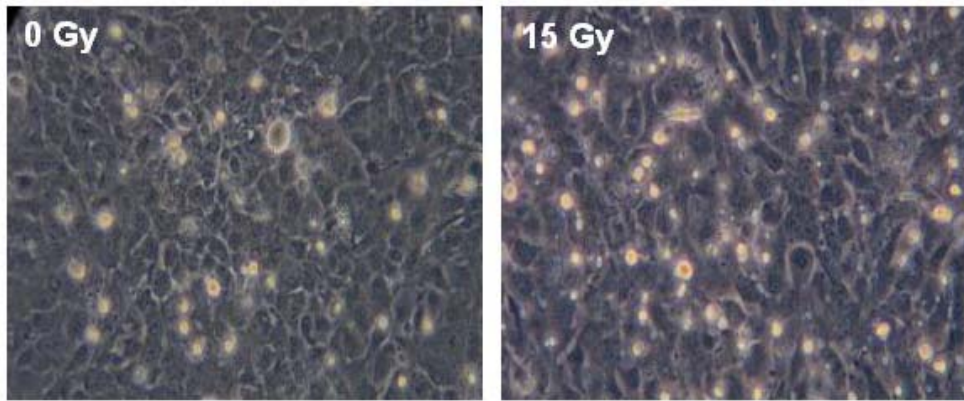


Figure 22: Photographie des cellules HMEC-1 prise au microscope 24 h après une irradiation à 15 Gy (grossissement $\times 400$).

Nous avons déterminé par comptage cellulaire le nombre de cellules flottantes, caractéristiques des cellules mortes, observées 24 h après différentes doses d'irradiation et en fonction du type de milieu (Figure 23). En effet, plusieurs équipes utilisent ce test de détachement cellulaire afin de quantifier la mort des cellules endothéliales [Albert *et al.*, 2006; Langley *et al.*, 1997].

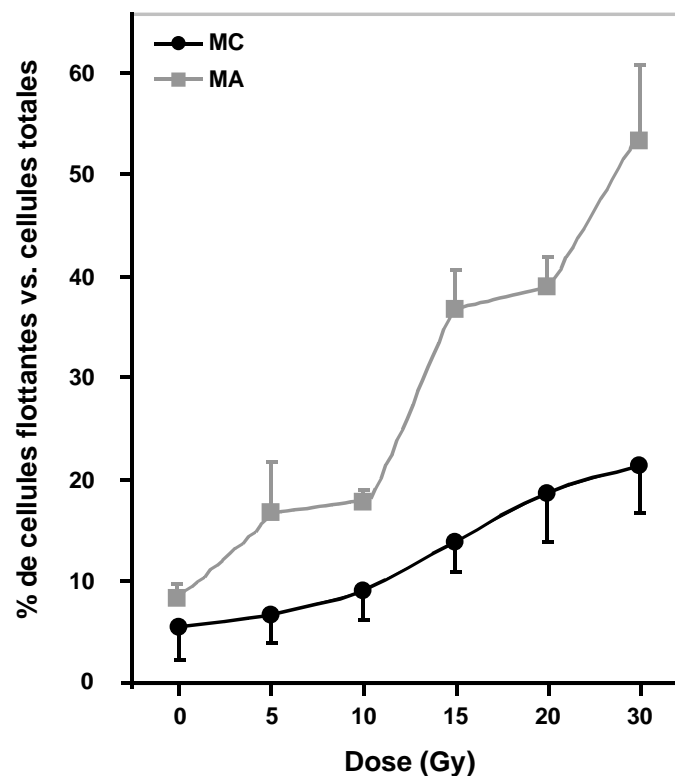


Figure 23: Pourcentages de cellules flottantes obtenus par comptage des HMEC-1 24 h après une exposition à 0, 5, 10, 15, 20 et 30 Gy. Le pourcentage est obtenu de la façon suivante : $[\text{cellules flottantes} / (\text{cellules flottantes} + \text{adhérentes})] \times 100$. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM d'au moins 3 expériences indépendantes réalisées en duplicate.

Ainsi, l'exposition des HMEC-1 à l'irradiation résulte en une augmentation dose-dépendante du nombre de cellules flottantes dans le milieu de culture 24 h après irradiation, que ce soit en MC ou en MA. En MC, on compte $6,6 \pm 1,3$ %, $13,8 \pm 1,5$ %, et $21,3 \pm 2,1$ % de cellules flottantes respectivement pour les doses de 5, 15 et 30 Gy comparés aux $5,5 \pm 1,6$ % observés pour la condition 0 Gy. Pour la condition MA, on observe respectivement $16,7 \pm 4,9$ %, $36,6 \pm 3,4$ %, et $53,3 \pm 7,4$ % de cellules flottantes après des doses de 5, 15 et 30 Gy par rapport au contrôle non irradié de $8,2 \pm 0,7$ % (Figure 23). Il y a donc 2,5 fois plus de cellules flottantes en MA qu'en MC pour toutes les doses. Ces résultats mettent en évidence que la composition du milieu MC confère une protection des cellules HMEC-1 vis-à-vis des voies de radiosensibilité.

De la même façon, nous avons procédé au comptage des cellules adhérentes 24 h après la gamme de dose de 0 à 30 Gy (Figure 24).

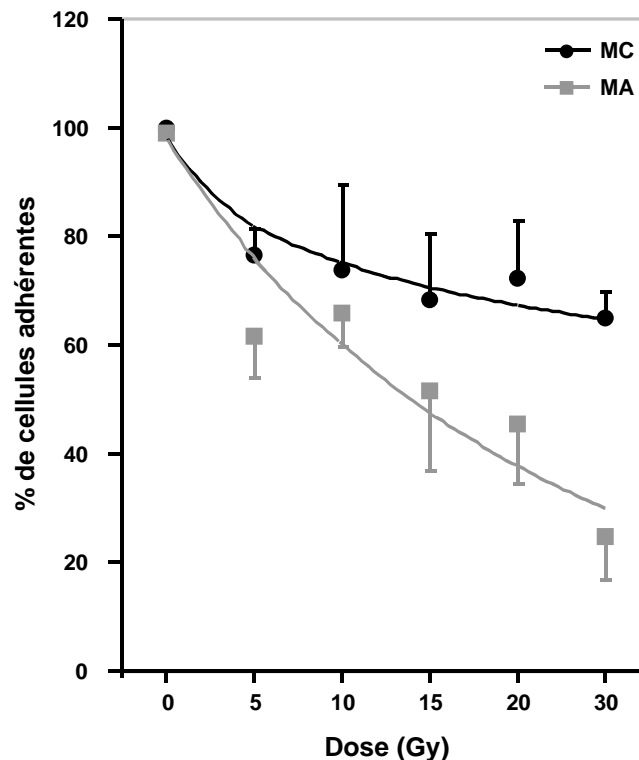


Figure 24: Pourcentages de cellules adhérentes obtenus par comptage des HMEC-1 24 h après une exposition à 0, 5, 10, 15, 20 et 30 Gy. Le pourcentage est obtenu de la façon suivante: $(\text{cellules adhérentes } X \text{ Gy} / \text{cellules adhérentes } 0 \text{ Gy}) \times 100$. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM d'au moins 3 expériences indépendantes réalisées en duplicates.

Vingt-quatre heures après l'irradiation, dans la condition MC on observe une diminution de $23,6 \pm 4,9$ %, $31,9 \pm 12,2$ %, et $35,2 \pm 4,9$ % de cellules adhérentes respectivement pour les doses de 5, 15 et 30 Gy par rapport au contrôle 0 Gy. En MA cette

diminution est plus marquée puisqu'il y a $38,4 \pm 7,8$ %, $48,6 \pm 14,5$ %, et $75,3 \pm 7,9$ % de cellules adhérentes en moins respectivement pour les doses de 5, 15 et 30 Gy comparés aux cellules non irradiées (Figure 24).

Le fait de maintenir les HMEC-1 en MA à partir de l'irradiation augmente la diminution du nombre de cellules adhérentes d'un facteur 1,6, 1,5, et 2,1 respectivement pour les doses de 5, 15 et 30 Gy. Tout comme pour les cellules flottantes, ces résultats confirment une diminution de la radiosensibilité des HMEC-1 lorsqu'elles sont maintenues en MC pendant et après l'irradiation.

Pour la suite de notre travail, nous avons décidé d'utiliser une seule dose d'irradiation. Nos observations du nombre de cellules flottantes et adhérentes 24 h après la gamme de dose de 0 à 30 Gy nous ont permis de mettre en évidence qu'à la dose de 15 Gy l'écart de radiosensibilité des HMEC-1 entre les conditions MC et MA est supérieur à celui observé pour les doses de 5 et 10 Gy (tableau 5).

	5 Gy	10 Gy	15 Gy	20 Gy	30 Gy
MC	1,2	1,6	2,5	3,4	3,9
MA	2	2,2	4,5	4,8	6,5

Tableau 5: Tableau des facteurs d'augmentation du nombre de cellules flottantes en MC et en MA par rapport au contrôle 0 Gy pour chaque dose d'irradiation.

En effet, le nombre de cellules flottantes en MA à 15 Gy est 4,5 fois supérieur à celui observé à 0 Gy alors qu'en MC il est 2,5 fois supérieur. De plus, en ce qui concerne les doses de 20 et 30 Gy, le nombre de cellules flottantes est conséquent dès 24 h post-irradiation ($35,5 \pm 3$ % et $53,3 \pm 7,4$ % respectivement pour les doses de 20 et 30 Gy en MA), ce qui limite nos possibilités d'études pour les temps supérieurs à 24 h post-irradiation. Ainsi, pour la suite de nos études nous travaillerons à la dose unique de 15 Gy.

I.2.2. Les radiations induisent la mort des HMEC-1 de façon temps-dépendante

Nous avons ensuite effectué une étude du nombre de cellules flottantes après une irradiation à 15 Gy sur une gamme de temps allant de 0 à 72 h post-irradiation (Figure 25). Tout d'abord, en MC sans irradiation, on observe une stabilisation du nombre de cellules flottantes jusqu'à 48 h ($5,5 \pm 1,4$ % à 0 h et $7,8 \pm 1,1$ % à 48 h). Après 48 h, le nombre de cellules flottantes est multiplié par 5,2 par rapport au temps 0 h. On compte en effet $28,4 \pm 5$ % de cellules flottantes à 72 h (Figure 25). Ceci peut s'expliquer par le phénomène

d'hyperconfluence entraînant la mort des cellules HMEC-1. En effet les cellules HMEC-1 sont à confluence au moment de l'irradiation, soit à $t = 0$ h, et le fait qu'elles continuent de cycliser pendant 3 jours peut entraîner une mort dépendante de l'appauvrissement et de l'oxydation du milieu de culture. Pour le contrôle MA 0 Gy on observe une augmentation du nombre de cellules flottantes dès les premières 18 h, puis il se stabilise jusqu'à 48 h ($5,5 \pm 0,6$ % à 0 h, $16,3 \pm 0,5$ % à 18 h et $15,3 \pm 1,1$ % à 48 h). Comme pour la condition MC, le nombre de cellules flottantes augmente après 48 h. L'apparition de cellules flottantes observée dans les premières 18 h semble être due à l'absence de facteurs de croissance dans le milieu puisqu'elle n'est pas observée dans la condition MC.

En ce qui concerne la condition MC 15 Gy, on observe une augmentation linéaire du nombre de cellules flottantes en fonction du temps jusqu'à 48 h, puis une forte augmentation entre 48 et 72 h. On compte en effet $10,6 \pm 5,3$ %, $26,8 \pm 3,3$ %, $36 \pm 3,4$ % et $67,5 \pm 14$ % de cellules flottantes respectivement à 6, 24, 48 et 72 h après l'irradiation à 15 Gy (Figure 25).

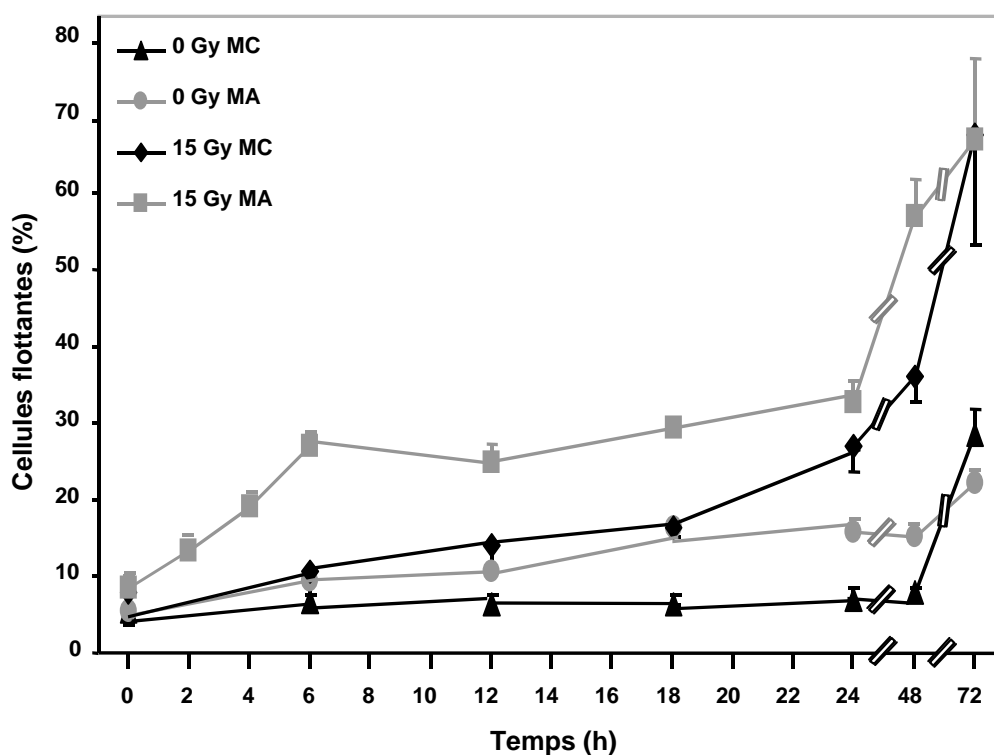


Figure 25: Pourcentages de cellules flottantes obtenus par comptage cellulaire des HMEC-1 à 0, 6, 12, 18, 24, 48 et 72 h après une irradiation à 15 Gy. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 3 à 8 expériences indépendantes ($P < 0,001$).

Lorsque les cellules HMEC-1 sont cultivées en MA, on observe une augmentation différente du nombre de cellules flottantes en fonction du temps après une irradiation à 15 Gy. Il semble y avoir deux vagues d'apparition des cellules flottantes. La première très rapide apparaît dès 2 h après l'irradiation et atteint un plateau entre 6 h et 24 h d'environ 30 % ($25,7 \pm 3,6$ % et

32,4 ± 6,1 % de cellules flottantes respectivement à 6 et 24 h). La deuxième vague apparaît après 24 h après l'exposition aux radiations et atteint 66 ± 20,2% à 72 h (Figure 25).

De la même façon, nous avons procédé au comptage cellulaire des cellules adhérentes après une irradiation à 15 Gy sur une gamme de temps de 0 à 72 h (Figure 26).

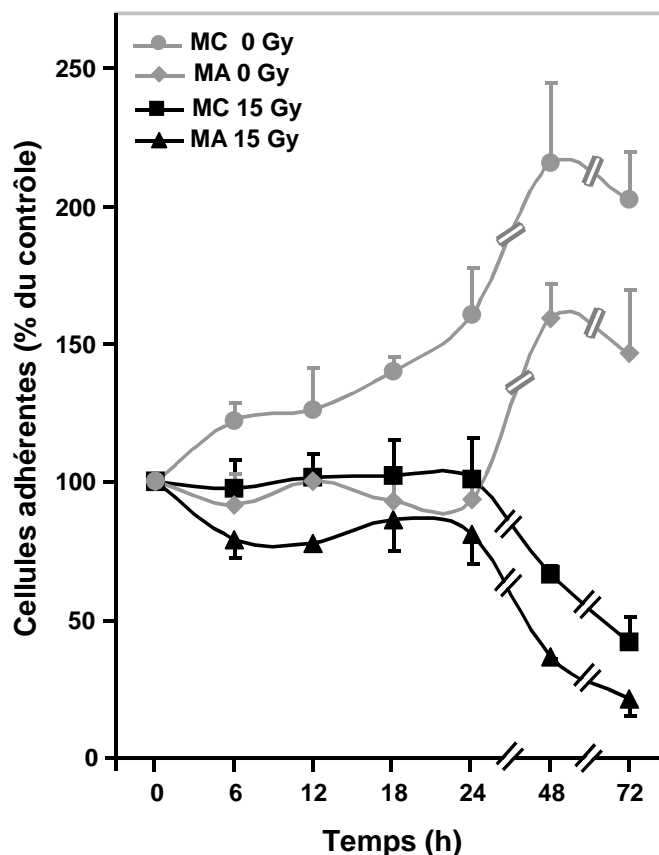


Figure 26: Pourcentages de cellules adhérentes obtenus par comptage cellulaire des HMEC-1 à 0, 6, 12, 18, 24, 48 et 72 h après une irradiation à 15 Gy. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de 3 à 8 expériences indépendantes ($P < 0,001$).

En ce qui concerne la condition 0 Gy en MC, on observe que les cellules HMEC-1 continuent de se multiplier après avoir atteint la confluence. On compte en effet 1,4, 1,6 et 2,1 fois plus de cellules adhérentes à 18, 24 et 48 h par rapport au contrôle 0 h. Par contre, à 48 h la prolifération des cellules HMEC-1 semble être ralentie (215,9 ± 28,8 % et 202,5 ± 17,3 % respectivement à 48 et 72 h) (Figure 26). Cette absence de variation du nombre de cellules adhérentes peut aussi être due à la forte mortalité qui apparaît en MC après 48 h. L'augmentation du nombre de cellules adhérentes due à la prolifération est compensée par la diminution due à la mortalité cellulaire. Pour la condition 0 Gy en MA, on note que dans les premières 24 h la prolifération cellulaire est stoppée (93,3 ± 8,8 % de cellules adhérentes par rapport au temps 0 h). La prolifération repart à partir de 24 h puisque l'on compte 159,4 ±

12,4 % de cellules adhérentes à 48 h. Tout comme pour la condition MC, la prolifération cellulaire est ralentie après 48 h puisqu'il y a $146,7 \pm 22,8$ % de cellules adhérentes à 72 h. L'absence de prolifération observée dans les premières 24 h semble être due à l'absence de facteurs de croissance dans le milieu puisqu'elle n'est pas observée dans la condition MC. Lorsque les HMEC-1 sont irradiées, on observe que la prolifération cellulaire est stoppée, que ce soit en MC et en MA (Figure 26). En ce qui concerne le MC, le nombre de cellules ne varie pas par rapport au contrôle dans les 24 premières heures post-irradiation, puis à partir de 24 h il commence à chuter. On observe une diminution de $33,7 \pm 3,4$ % et $58,1 \pm 9,4$ % des cellules adhérentes respectivement à 48 et 72 h par rapport au contrôle non irradié. Lorsque les cellules sont maintenues en MA pendant et après l'irradiation, on observe une diminution du nombre de cellules adhérentes dès 6 h post-irradiation. Cette diminution atteint un plateau entre 6 et 24 h (Figure 26). On compte en effet $21,3 \pm 6,7$ % et $19,4 \pm 10,6$ % de diminution respectivement à 6 et 24 h. Après 24 h, la diminution du nombre de cellules adhérentes reprend. On observe $63,5 \pm 0,4$ % et $78,9 \pm 5,6$ % de diminution à 48 h et 72 h post-irradiation.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par le comptage des cellules flottantes. Ainsi, les vagues de diminution du nombre de cellules adhérentes sont corrélés avec celles de l'augmentation du nombre de cellules flottantes.

Contrairement aux résultats observés pour la condition 0 Gy, la forte augmentation de cellules flottantes observée après 48 h en MC mais aussi en MA après irradiation ne peut pas être imputée à un appauvrissement du milieu de culture cellulaire, puisque par le test de comptage des cellules adhérentes nous montrons que la prolifération des cellules après l'irradiation est stoppée.

I.2.3. Apoptose radioinduite et régulation du cycle cellulaire

Afin de déterminer si les HMEC-1 mourraient par apoptose, nous avons utilisé un Ac Apo2.7 dirigé contre l'antigène 7A6 qui s'externalise sur la membrane mitochondriale lorsque la cellule entre en apoptose. Nous avons procédé à un marquage des HMEC-1 24 h après une irradiation à 15 Gy de la totalité des cellules, mais aussi des fractions séparées flottantes et adhérentes (Figure 27). On observe que l'irradiation à 15 Gy entraîne l'apoptose des cellules HMEC-1. Le nombre de cellules apoptotiques à 0 Gy est de 8,4 % et passe à 23,8 % après l'irradiation. Le marquage séparé des cellules flottantes et adhérentes met en évidence que la majorité des cellules flottantes, soit 90,2 % sont apoptotiques, et qu'une très faible proportion

de cellules adhérentes, soit 9,2 % correspond à des cellules en apoptose. Ces résultats valident notre test de comptage cellulaire (soit du pourcentage de cellules flottantes) comme pouvant être utilisé en tant que test d'apoptose.

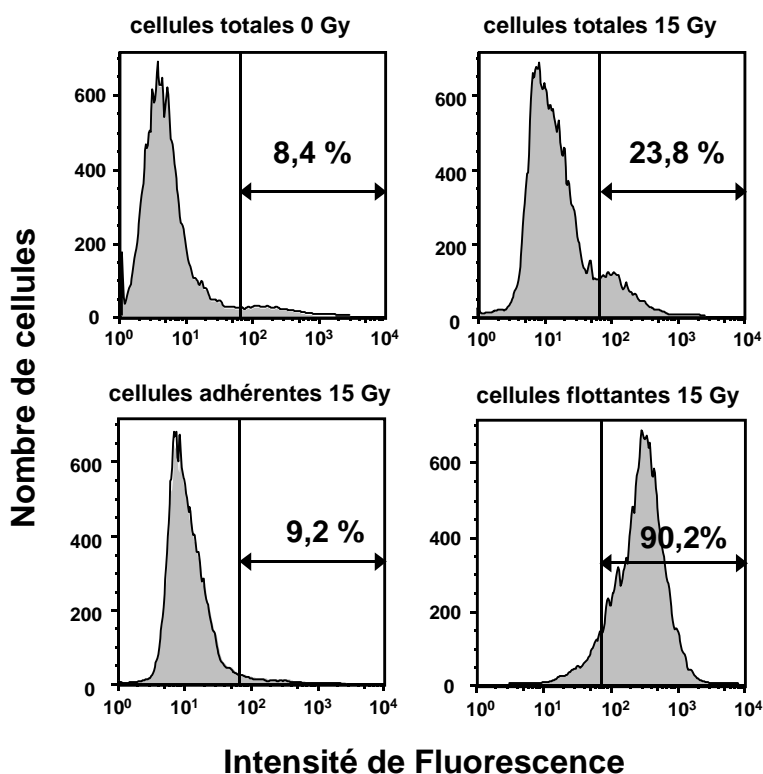


Figure 27: Détermination de la mort par apoptose par marquage Apo2.7 des HMEC-1 24 h après une irradiation à 15 Gy. Les images d'une expérience sont représentées.

Nous avons ensuite procédé au marquage Apo2.7 après une irradiation à 15 Gy en fonction du temps de 0 à 24 h, pour les cellules maintenues en MC et en MA (Figure 28). Tout comme pour le test de comptage cellulaire, on observe une augmentation du nombre de cellules apoptotiques en fonction du temps. A chaque temps, le pourcentage de cellules apoptotiques en MA est supérieur à celui en MC. Ces résultats confirment le fait que le MC confère une radiorésistance aux HMEC-1 par rapport au MA.

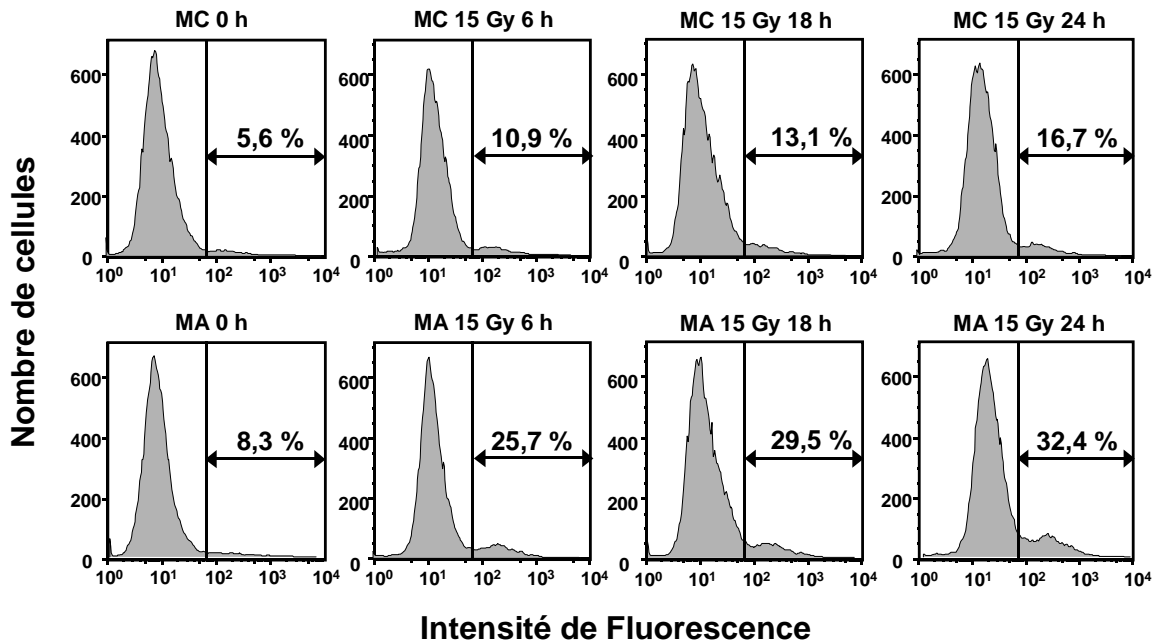


Figure 28: Détermination de la mort par apoptose par marquage Apo2.7 des HMEC-1 de 0 à 24 h après une irradiation à 15 Gy. Les images d'une expérience représentative parmi 3 expériences indépendantes sont représentées.

Il a été montré sur de nombreux types cellulaires que le cycle cellulaire est très finement régulé après irradiation. Nous avons donc voulu mettre en évidence la régulation radioinduite du cycle cellulaire après une irradiation à 15 Gy des HMEC-1, que ce soit en MC ou en MA. Pour cela nous avons procédé à une étude en cytométrie de flux en marquant la totalité des cellules à différents temps après irradiation par l'Iodure de Propidium (IP). Il s'agit d'un intercalant de l'ADN qui permet de quantifier l'ADN cellulaire, ce qui nous donne la position de la cellule dans le cycle selon qu'elle possède 2n (phase G₁) ou 4n (phase G₂) chromosomes (Figure 29). De plus, la fraction située avant le pic en G₁, nommée A₀, donne une indication sur la mortalité cellulaire. En effet, les cellules contenant moins de 2n chromosomes sont des cellules apoptotiques ou nécrotiques.

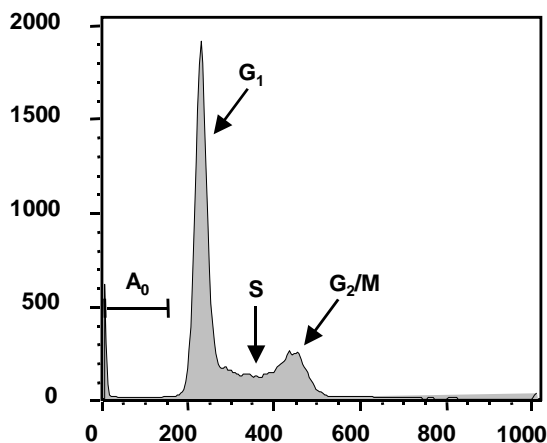


Figure 29: Schéma de la répartition de l'ADN cellulaire en fonction du cycle.

Nous avons étudié l'impact de la culture en MC ou MA sur la régulation du cycle cellulaire (Figure 30). Le fait de maintenir les cellules en MA pour les témoins non irradiés n'influe pas sur la régulation du cycle cellulaire. Les profils du cycle cellulaire en condition MC ou MA en fonction du temps sont similaires. Au temps 0 h la majorité des cellules se trouve en phase G₁. A partir du temps 6 h et jusqu'au temps 18 h on observe une augmentation des cellules en phase S et G₂/M, ce qui indique que les cellules continuent leur cycle, que ce soit en MC ou en MA. Enfin, à 24 h, on retrouve le profil observé au temps 0 h. Ces données mettent en évidence que les HMEC-1, qu'elles soient cultivées en MC ou en MA ont un cycle cellulaire d'environ 24 h (Figure 30).

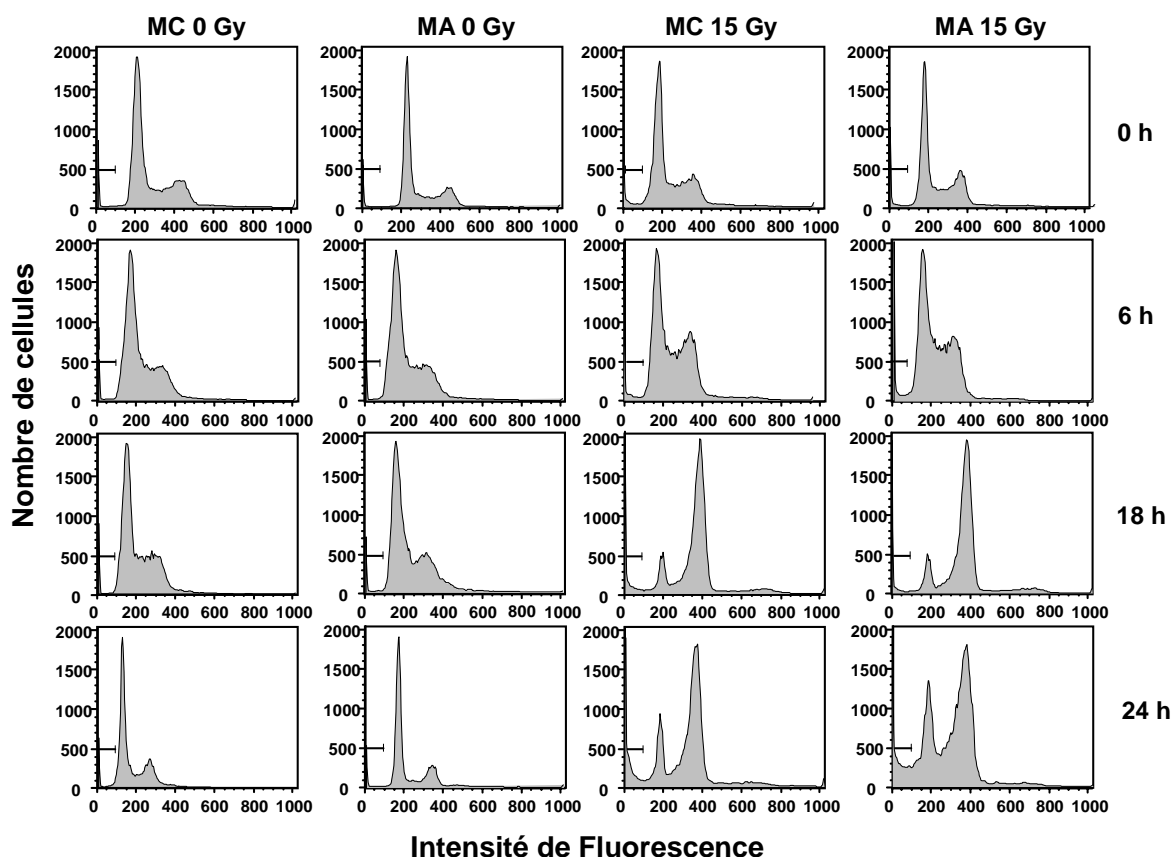


Figure 30: Régulation du cycle cellulaire mise en évidence par marquage IP des HMEC-1 en MC et MA de 0 à 24 h après une irradiation à 15 Gy. Les images d'une expérience représentative parmi 3 expériences indépendantes réalisées en duplicates sont représentées.

Nous avons ensuite procédé à cette étude du cycle cellulaire en fonction du temps après une irradiation à 15 Gy (Figure 30). Tout comme pour les témoins non irradiés, le fait de maintenir les HMEC-1 en MA pendant et après l'irradiation n'influe pas sur la régulation du cycle cellulaire. En effet, on observe les mêmes profils en MC et en MA à tous les temps étudiés après irradiation. A partir du temps 6 h, le marquage IP met en évidence un début de

blocage des HMEC-1 en phase G₂/M. A 18 h après exposition aux radiations, la majorité des cellules se trouve en phase G₂/M, et une petite quantité de cellules possède 2n chromosomes. Vingt-quatre heures post-irradiation, on observe toujours un blocage des cellules en phase G₂/M. Cependant, on note un redémarrage du cycle cellulaire, car la proportion de cellules en phase G₁ à 24 h est supérieure à celle observée pour le temps 18 h.

Lorsque l'on observe les fractions de cellules mortes A₀, on note un effet de l'irradiation sur la mortalité des cellules. En effet, en fonction du temps il y a une augmentation de cette fraction après irradiation, que ce soit en MC ou en MA (tableau 6).

	0 h	6 h	18 h	24 h
MC 0 Gy	3,8	3,6	3,6	5,5
MA 0 Gy	4,2	3,9	3	4,3
MC 15 Gy	2,7	6,8	10,4	21
MA 15 Gy	3,1	6,1	7,6	21,2

Tableau 6: Pourcentages des fractions A₀ observées par marquage IP en MC et MA de 0 à 24 h après une irradiation à 15 Gy.

I.3. La composition du milieu de culture influe sur la radiosensibilité des HMEC-1

Nos études de l'effet d'une irradiation à 15 Gy des HMEC-1 maintenues en MC ou en MA ont permis de mettre en évidence que la composition du MC confère aux cellules HMEC-1 une radiorésistance par rapport au MA. En effet, dès 6 h après une irradiation à 15 Gy en MA, on observe une augmentation du nombre de cellules flottantes, et une diminution du nombre de cellules adhérentes par rapport au MC (Figures 25 et 26). Ces résultats ont été confirmés par marquage Apo2.7 où l'on observe 25,7 % de cellules apoptotiques après une irradiation à 15 Gy en MA, et seulement 10,9 % en MC (Figure 28). Les composants qui varient dans la composition des MC et MA sont l'EGF et le SVF. Nous avons donc procédé à des tests de comptage cellulaire en MA, MA additionné d'EGF ou de SVF, et en MC après une irradiation à 15 Gy à 6 h post-irradiation (Figure 31).

Nos tests de comptage cellulaire valident ceux effectués au préalable, montrant qu'à 6 h post-irradiation en MC on n'observe pas d'apoptose des HMEC-1. En effet, on compte 6,4 ± 0,7 % d'apoptose à 15 Gy contre 7,1 ± 1 % pour le témoin non irradié (P = 0,33) (Figure 31). Dans la condition MA, on observe 16,2 ± 1,7 % après 15 Gy et 7,4 ± 1,3 % pour le 0 Gy (P = 0,009). Le MC confère donc une radiorésistance aux cellules HMEC-1 par rapport au MA (P ≤ 0,001). L'ajout de SVF ou d'EGF au MA restaure la radioprotection médiée par le MC (8,9 ± 1,2 % et 10,2 ± 2,7 % respectivement avec le SVF (P = 0,004) et l'EGF (P =

0,032)). Les deux voies médiées par les facteurs de croissance présents dans le SVF et l'EGF confèrent une radiorésistance aux HMEC-1 6 h après une irradiation à 15 Gy.

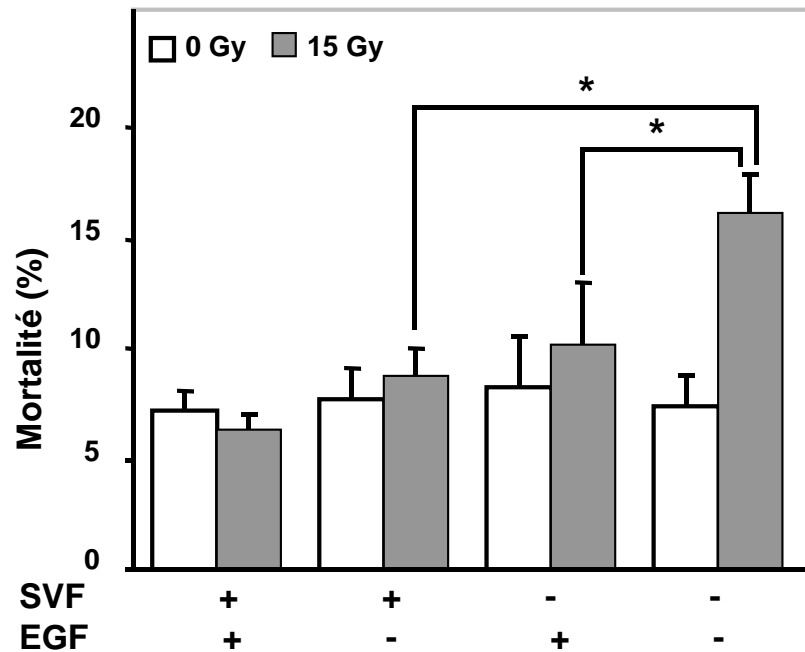


Figure 31: Test de comptage cellulaire 6 h après une irradiation à 15 Gy en fonction de la composition du milieu de culture. Les valeurs représentent la moyenne \pm ET de 2 expériences réalisées en triplicates ; * $P < 0,05$.

Nous avons ensuite procédé au même test de comptage cellulaire afin de mettre en évidence l'élément impliqué dans la radiorésistance induite par le MC 24 h après irradiation (Figure 32). Vingt-quatre heures après irradiation en MC on compte $20 \pm 2,4$ % d'apoptose contre $8,6 \pm 1,9$ % pour le témoin non irradié ($P = 0,003$) (Figure 32). En ce qui concerne le MA, il y a $28,4 \pm 1,8$ % d'apoptose contre $10,4 \pm 1,1$ % pour la condition 0 Gy ($P = 0,001$). Comme pour le temps 6 h, le MC confère donc une radiorésistance aux cellules HMEC-1 par rapport au MA 24 h après une irradiation à 15 Gy ($P = 0,009$).

Le fait d'ajouter de l'EGF au MA ne lève pas la radiosensibilité des HMEC-1 après irradiation, même partiellement. On observe $30,1 \pm 2,3$ % de cellules apoptotiques pour la condition MA + EGF, ce qui ne diffère pas de la condition MA seul ($P = 0,393$). Par contre, l'ajout de SVF au MA restaure le taux d'apoptose observé pour la condition MC. On compte en effet $19,4 \pm 3,8$ % lorsque l'on ajoute du SVF à la condition MA ($P = 0,021$). Ceci a été confirmé par l'utilisation d'un Ac anti-EGF récepteur, le cetuximab, additionné au MC, inhibant ainsi la voie médiée par l'EGF. On observe $21,8 \pm 0,3$ % d'apoptose dans cette condition, ce qui montre que le fait d'inhiber la voie médiée par l'EGF ne lève pas la protection induite par le MC ($P = 0,018$). Le fait que l'EGF induise une radioprotection à 6 h

mais pas à 24 h laisse penser que l'EGF retarde peut-être seulement la mort observée à 6 h. Ainsi, seuls les facteurs de croissance contenus dans le SVF induisent une radiorésistance 24 h post-irradiation.

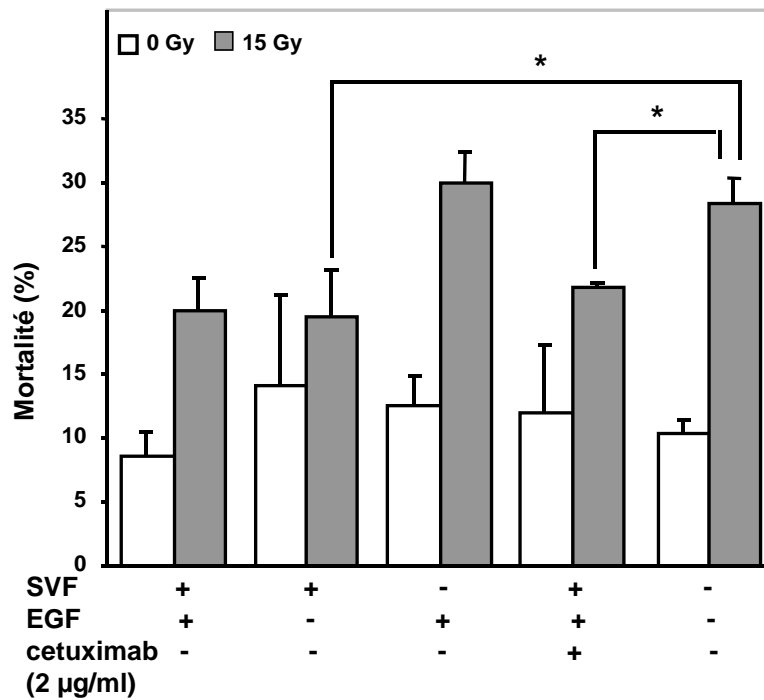


Figure 32: Test de comptage cellulaire 24 h après une irradiation à 15 Gy en fonction de la composition du milieu de culture. Les valeurs représentent la moyenne \pm ET de 2 expériences réalisées en triplicates ; * $P < 0,05$.

I.4. Conclusion

Nos études de l'effet de l'irradiation sur les cellules endothéliales montrent une radiosensibilité en fonction de la dose et du temps après irradiation. L'apoptose des cellules endothéliales *in vitro* après irradiation a déjà été décrite [Fuks *et al.*, 1994; Gajdusek *et al.*, 2001; Gaugler *et al.*, 1998; Langley *et al.*, 1997]. Ces résultats ont été confirmés sur notre modèle d'étude HMEC-1 par test de comptage cellulaire, mais aussi par cytométrie en flux en utilisant le marqueur Apo2.7, ainsi que par test TUNEL (voir chapitre Résultats II.1.2). De plus, une diminution du nombre de cellules adhérentes est observée, ainsi qu'une hypertrophie des cellules endothéliales irradiées, ce qui a déjà été décrit [Lam *et al.*, 1985; Rubin *et al.*, 1989]. Nos études menées dans deux milieux de culture différents, le MC et le MA, ont montré qu'à la dose de 15 Gy l'écart de radiosensibilité entre ces deux milieux est important, ce qui nous a motivé à choisir cette dose unique afin de poursuivre nos études. De plus, cette dose avait déjà été choisie dans des études qui avaient mis en évidence l'impact des cellules

endothéliales dans l'intégrité du tissu sain et tumoral après irradiation [Garcia-Barros *et al.*, 2003; Paris *et al.*, 2001].

Le SVF, ainsi que l'EGF ajoutés au milieu de culture confèrent aux HMEC-1 une augmentation de la résistance à l'apoptose radioinduite après une irradiation à 15 Gy. Ainsi, la différence de radiosensibilité observée entre les conditions MC et MA après une irradiation à 15 Gy est due à la combinaison de l'EGF et du SVF dans les temps précoces après irradiation, c'est à dire dans les 6 premières heures. En ce qui concerne le temps 24 h post-irradiation, la radioprotection est seulement médiée par le SVF. Nous avons décidé de poursuivre nos études en n'utilisant que la condition MA. En effet, afin de pouvoir étudier la modulation de la radiosensibilité des HMEC-1 après irradiation, nous avons préféré réduire l'impact des voies de protection médiées par des facteurs de croissance présents dans le milieu de culture.

II LA S1P PROTEGE LES HMEC-1 DE L'APOPTOSE PREMITOTIQUE, MAIS PAS DE LA MORT MITOTIQUE RADIOINDUITES

II.1. La phase d'apoptose radioinduite précoce est dépendante de la génération du céramide

II.1.1. L'inhibition de la voie du céramide par la désipramine bloque l'apoptose précoce

Afin de vérifier si l'apoptose radioinduite des HMEC-1 est médiée par la génération de céramide induite par l'activation de l'aSMase, comme il a été montré dans les cellules endothéliales *in vivo* dans le SNC [Pena *et al.*, 2000], ou encore dans le SGI [Paris *et al.*, 2001], des expériences ont été réalisées en utilisant un inhibiteur de l'aSMase, la désipramine. Les tests de comptage des cellules apoptotiques réalisés 24 h après irradiation montrent qu'un prétraitement avec 50 μ M de désipramine diminue l'apoptose de façon significative de 52,4 % par rapport au contrôle 15 Gy (contrôle 15 Gy : $20,9 \pm 2,4$ % ; condition désipramine 15 Gy : $9,9 \pm 1,5$ % ; $P = 0,003$) (Figure 33). Le taux d'apoptose observé après traitement à la désipramine n'est pas différent significativement de celui observé pour le témoin non irradié ($7,6 \pm 0,2$ % ; $P > 0,05$). La désipramine permet donc de lever la majorité de l'apoptose radioinduite des HMEC-1 après une irradiation à 15 Gy, laissant penser que cette vague d'apoptose précoce dans les 24 h après exposition est totalement dépendante de la génération de céramide par l'aSMase.

En plus de la voie aSMase, la synthèse *de novo* de céramide représente une autre voie majeure pour la génération de céramide par les cellules endothéliales après irradiation [Liao *et al.*, 1999]. Afin de confirmer la spécificité de la voie aSMase, l'inhibiteur de la CS, la FB1, a été utilisée. Aucune différence n'est observée 24 h après irradiation entre l'apoptose radioinduite des HMEC-1 traitées avec 1 μ M de FB1 et le contrôle (contrôle 15 Gy : $20,3 \pm 1,3$ % ; condition FB1 15 Gy : $21,4 \pm 2$ % ; $P = 0,315$) (Figure 33).

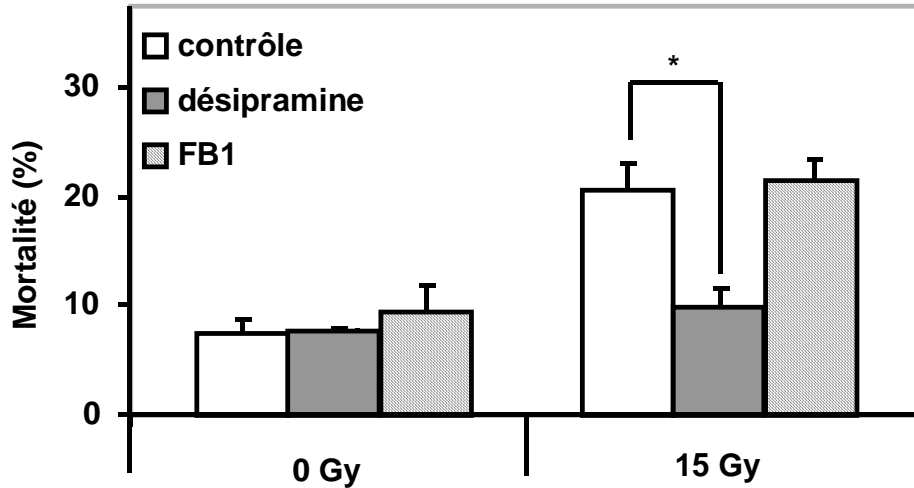


Figure 33: Pourcentages de cellules apoptotiques obtenus par comptage cellulaire des HMEC-1 traitées par la désipramine 50 μ M (histogrammes pleins), par la FB1 1 μ M (hachurés) ou par le contrôle (vide) 24 h après une exposition à 15 Gy. Les valeurs représentent la moyenne \pm ET de 2 expériences indépendantes réalisées en triplicate; * $P < 0,005$.

Ces résultats ont été confirmés par marquage Apo2.7 (Figure 34).

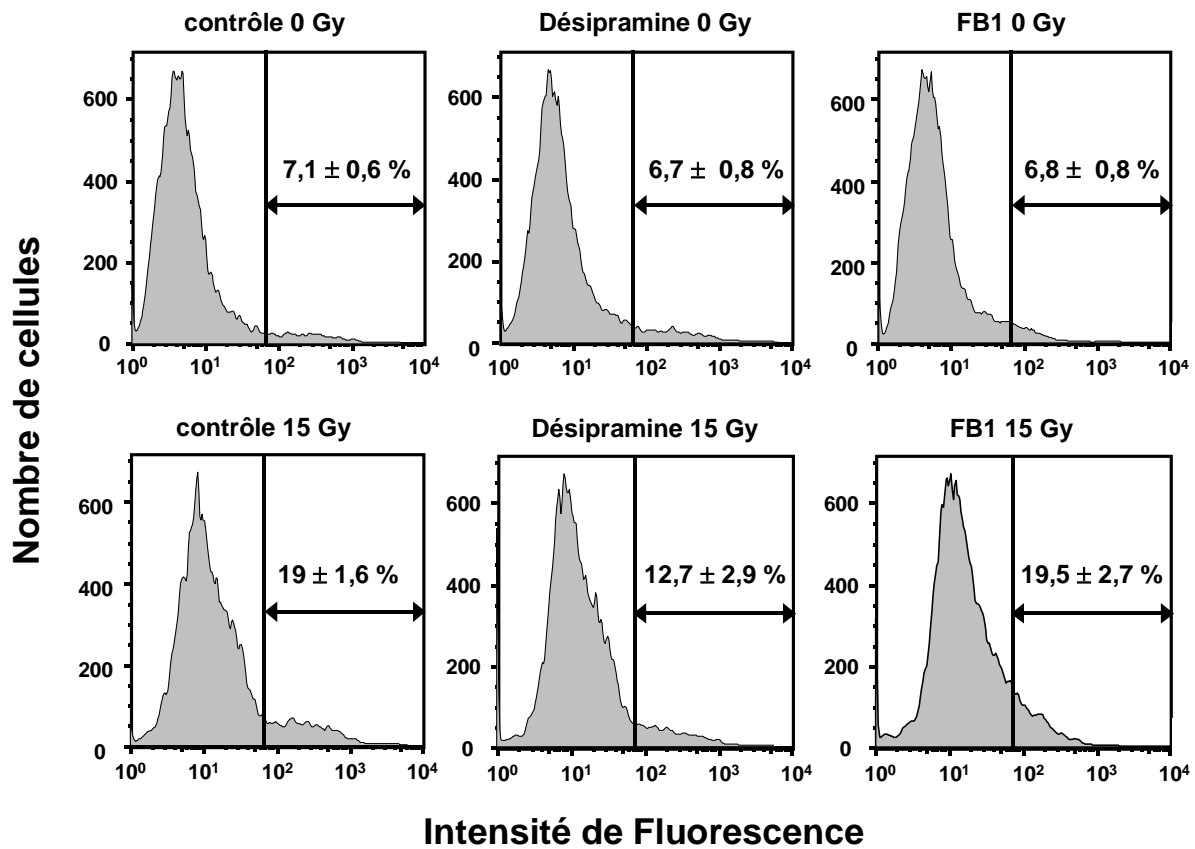


Figure 34: Détermination de la mort apoptotique par marquage Apo2.7 des HMEC-1 traitées par la désipramine ou la FB1 24 h après une irradiation à 15 Gy. Les images d'une expérience représentative parmi 3 expériences réalisées en duplicates sont figurées. Les valeurs représentent les moyennes \pm ET.

Le marquage par l'Ac Apo2.7 met en évidence une diminution de 33,2 % de l'apoptose radioinduite 24 h après une irradiation à 15 Gy lorsque les cellules sont prétraitées à la désipramine (contrôle 15 Gy : $19 \pm 1,6$ % ; condition désipramine 15 Gy : $12,7 \pm 2,9$ %). Tout comme pour le test de comptage cellulaire, le marquage Apo2.7 montre que le traitement des HMEC-1 avec la FB1 ne fait pas varier le taux d'apoptose radioinduite. On obtient en effet $19,5 \pm 2,7$ % de cellules apoptotiques pour la condition FB1.

Ainsi, le fait que la désipramine lève l'apoptose radioinduite des HMEC-1 24 h après irradiation, et que la FB1 n'a aucun effet sur cette mort radioinduite montre que le couple aSMase/céramide à un rôle majeur dans l'induction de l'apoptose précoce après 15 Gy observée dans les cellules endothéliales.

II.1.2. La S1P bloque l'apoptose précoce des HMEC-1

A cause du modèle du rhéostat S1P/céramide mis en évidence dans la protection des ovocytes par la S1P contre l'apoptose radioinduite médiée par le céramide [Lee *et al.*, 1999; Morita *et al.*, 2000; Paris *et al.*, 2002], nous avons étudié l'impact de la S1P sur la mort radioinduite des HMEC-1 par test de comptage cellulaire (Figure 35).

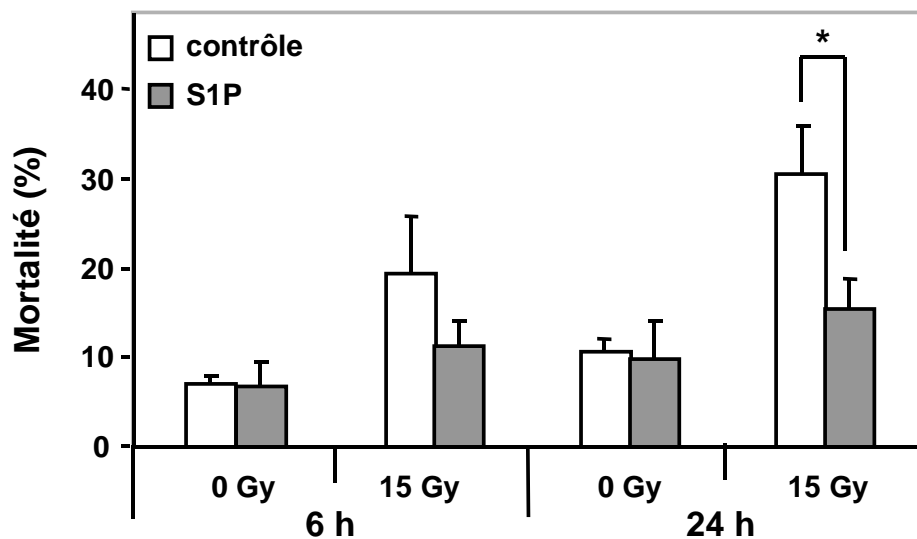


Figure 35: Pourcentages de cellules apoptotiques obtenus par comptage cellulaire des HMEC-1 traitées par 1 μ M de S1P (histogrammes pleins) ou par le contrôle (vides) 6 h ou 24 h après une irradiation à 15 Gy. Les valeurs représentent la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes ; * $P < 0,05$.

Deux heures de prétraitement avec 1 μM de S1P semblent diminuer l'apoptose des HMEC-1 dès 6 h après irradiation (contrôle 15 Gy: $19,2 \pm 6,6 \%$; condition S1P 15 Gy: $11,3 \pm 2,7 \%$). Cependant, à 6 h la différence observée entre le contrôle et la condition S1P n'est pas significative ($P = 0,127$) (Figure 35). Vingt-quatre heures après une exposition à 15 Gy, deux heures de prétraitement avec 1 μM de S1P diminuent d'un facteur 2 le pourcentage de cellules apoptotiques (contrôle 15 Gy : $30,5 \pm 3,4 \%$; condition S1P 15 Gy: $15,3 \pm 3,4 \%$; $P = 0,013$).

Ces résultats ont été confirmés par des analyses en cytométrie en flux en utilisant le marqueur apoptotique Apo2.7 qui met en évidence une diminution significative de 33,3 % de l'apoptose radioinduite lorsque les HMEC-1 sont prétraitées à la S1P (Figure 36).

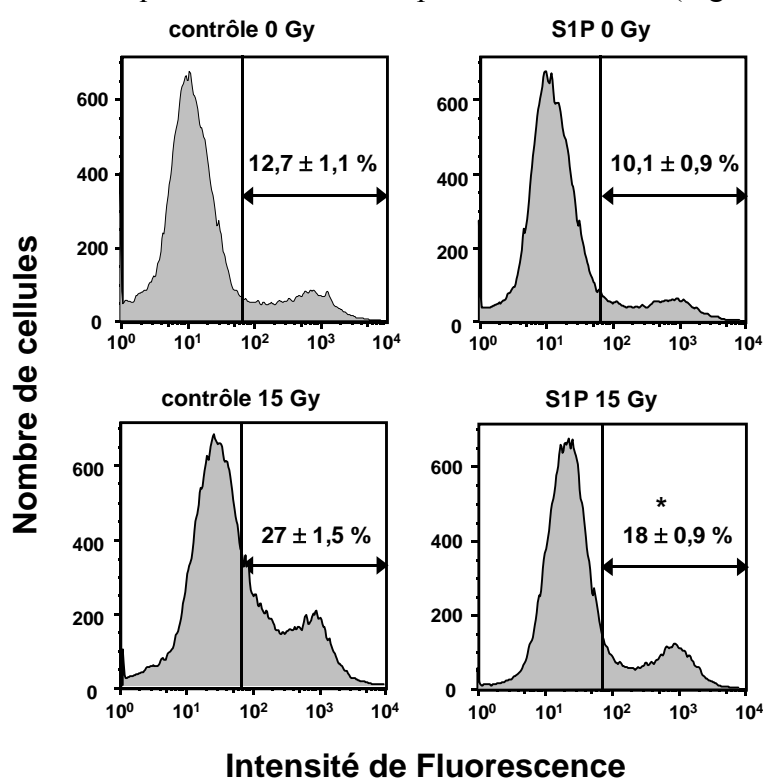


Figure 36: Détermination du nombre de cellules apoptotiques réalisé par cytométrie en flux en utilisant le marqueur apoptotique Apo2.7 des HMEC-1 24 h après une irradiation à 15 Gy. Les résultats d'une expérience représentative sont figurées. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM 3 expériences indépendantes réalisées en duplicate; * $P \leq 0,001$.

On observe en effet $27 \pm 1,5 \%$ pour le contrôle contre $18 \pm 0,9 \%$ pour les cellules traitées à la S1P ($P \leq 0,001$) (Figure 36).

Le test TUNEL a aussi été utilisé. Ce test utilise la capacité d'une enzyme, la terminal déoxynucléotidyl Transférase, à marquer les extrémités 3'OH libres de l'ADN générées au cours de l'apoptose. Il met en évidence une diminution significative de 28 % de l'apoptose

radioinduite des HMEC-1 à 24 h lorsque les cellules sont prétraitées à la S1P. On observe en effet $2,5 \pm 0,2$ fois plus de cellules apoptotiques pour le contrôle 15 Gy par rapport au témoin non irradié, et $1,8 \pm 0,2$ fois plus pour la condition S1P 15 Gy ($P \leq 0,05$). (Figure 37).

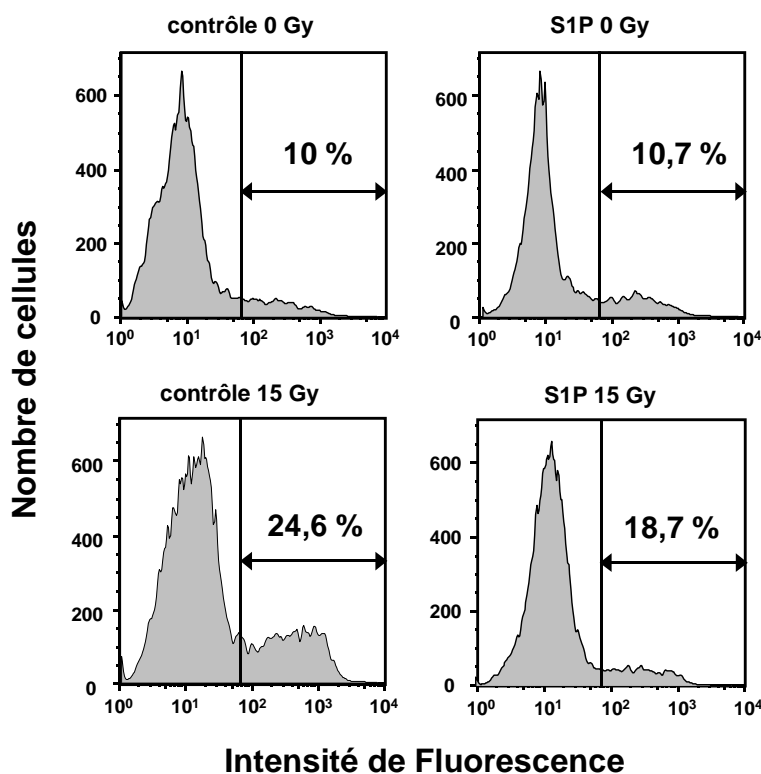


Figure 37: Détermination du nombre de cellules apoptotiques des HMEC-1 24 h après une irradiation à 15 Gy réalisée par cytométrie en flux en utilisant le test TUNEL. Les images d'une expérience représentative parmi 3 expériences indépendantes sont figurées.

On observe que les taux protection médiée par la S1P contre l'apoptose radioinduite par rapport aux contrôles 15 Gy sont différents selon les tests d'apoptose utilisés (Tableau 7).

Comptage cellulaire	Marquage Apo2.7	Marquage TUNEL
50,2 %	33,3 %	28 %

Tableau 7: Comparatif des taux de protection médiée par la S1P contre l'apoptose radioinduite à 15 Gy selon les tests utilisés.

Ceci peut s'expliquer par le stade de l'apoptose mis en évidence par chacun des marquages. Le test Apo2.7 qui met en évidence l'externalisation de l'antigène 7A6 sur la membrane mitochondriale lorsque la cellule entre en apoptose est un test utilisant un marqueur précoce de l'apoptose. En ce qui concerne le marquage TUNEL, qui met en évidence la fragmentation de l'ADN en séquences de 200 paires de bases, il est révélateur d'un évènement plus tardif de l'apoptose. Notre test de comptage cellulaire met en évidence les cellules apoptotiques précoces (cellules décollées à l'aide des lavages en PBS-EDTA)

ainsi que les cellules apoptotiques tardives, c'est à dire corps apoptotiques flottants dans le milieu de culture. Ceci explique les taux supérieurs obtenus en comptage cellulaire par rapport aux marquages Apo2.7 et TUNEL.

II.1.3. L'inhibition de l'apoptose précoce radioinduite médiée par le céramide est spécifique de la S1P

Afin de vérifier que l'inhibition de l'apoptose est bien spécifique de la S1P et non des sphingolipides en général, nous avons utilisé la dhS1P, qui est un analogue de la S1P, ainsi que le LPA qui interagit avec des membres de la famille des récepteurs S1Ps.

Nous avons montré par comptage cellulaire qu'un prétraitement par 1 μ M de dhS1P ou de LPA ne lève pas l'apoptose radioinduite des HMEC-1 24 h après une exposition à 15 Gy (contrôle: $23,1 \pm 3,5$ % versus cellules traitées respectivement avec la dhS1P et le LPA : $22,8 \pm 3,4$ % et $21 \pm 4,6$ %) (Figure 38).

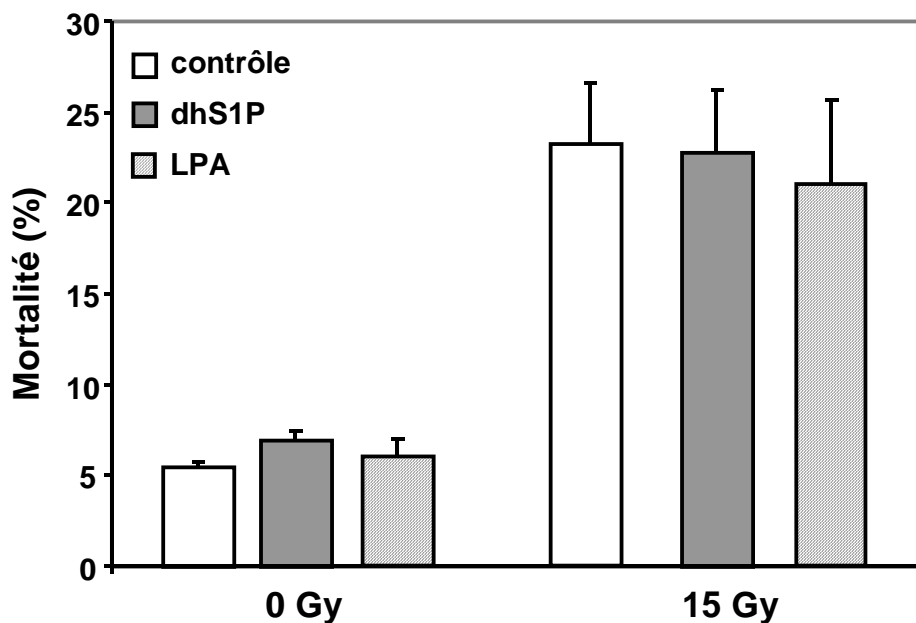


Figure 38: Pourcentages de cellules apoptotiques obtenus par comptage cellulaire des HMEC-1 traitées par 1 μ M de dhS1P (histogrammes pleins), de LPA (hachurés) ou par le contrôle (vides) 24 h après une irradiation à 15 Gy. Les valeurs représentent la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.

II.2. La phase de mort radioinduite tardive est indépendante de la génération du céramide

II.2.1. L'inhibition de la voie du céramide ne lève pas la mort tardive radioinduite

Etant donné l'implication du couple aSMase/céramide dans l'induction de l'apoptose précoce radioinduite, nous avons voulu vérifier si la génération de céramide était aussi impliquée dans la vague de mort tardive après irradiation. Un traitement par 50 μM de désipramine n'inhibe pas la deuxième vague de mort observée 72 h après irradiation (contrôle 15 Gy : $39,4 \pm 1,4$ % ; condition désipramine 15 Gy : $42,5 \pm 1,4$; $P = 0,141$) (Figure 39). De la même façon, la CS n'intervient pas dans la deuxième vague de mort tardive après irradiation, puisqu'à 72 h on observe $40,9 \pm 9,5$ % pour les cellules traitées avec la FB1 ($P = 0,870$) (Figure 39).

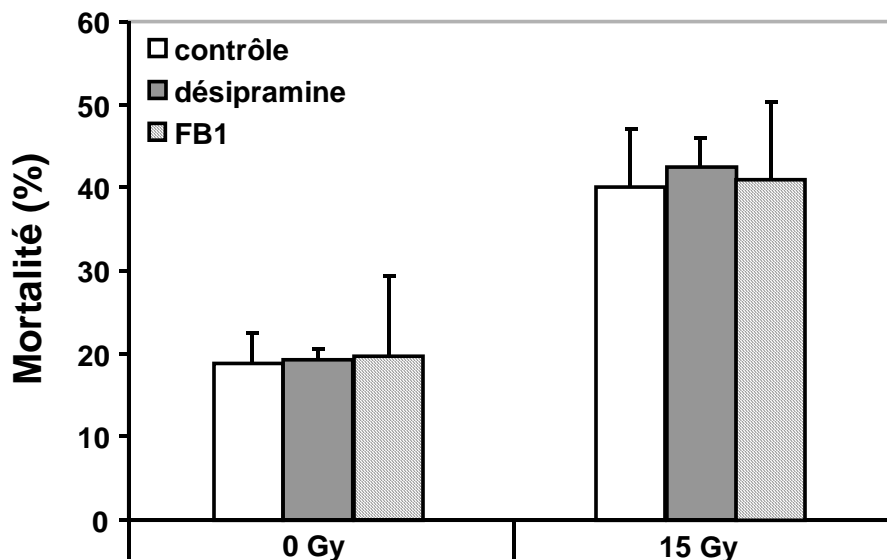


Figure 39: Pourcentages de cellules apoptotiques obtenus par comptage cellulaire des HMEC-1 traitées par la désipramine 50 μM (histogrammes pleins), par la FB1 1 μM (hachurés) ou par le contrôle (vide) 72 h après une exposition à 15 Gy. Les valeurs représentent la moyenne \pm ET de 2 expériences indépendantes réalisées en triplicat.

Les résultats obtenus en test de comptage cellulaire ont été confirmés par marquage Apo2.7 (Figure 40). Le marquage Apo2.7 valide le fait que la désipramine ne diminue pas l'apoptose radioinduite des HMEC-1 72 h après une irradiation à 15 Gy. (Figure 40). On observe en effet $42,9 \pm 0,9$ % pour le contrôle 15 Gy, et $46,7 \pm 3,1$ % pour la condition désipramine (Figure 40).

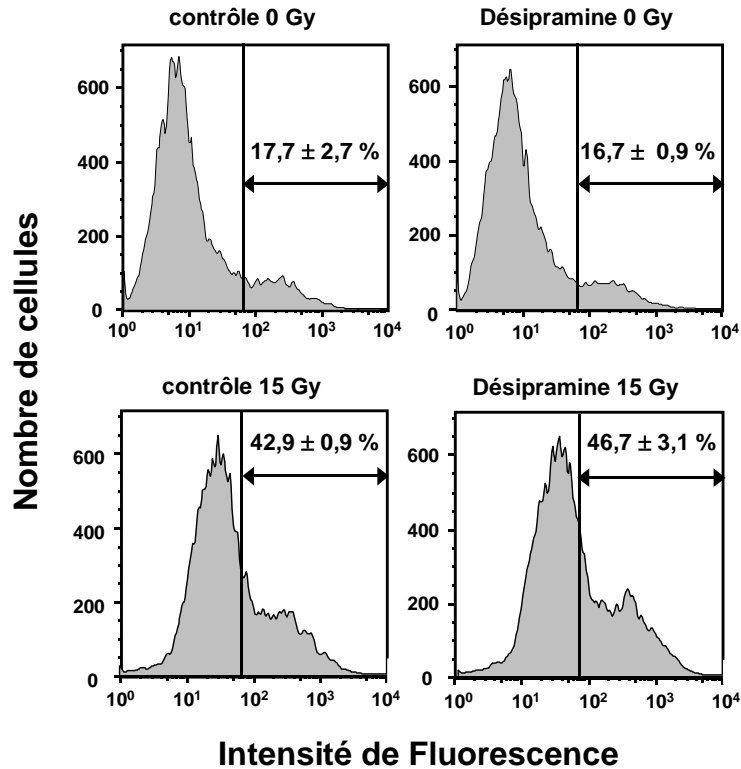


Figure 40: Détermination de la mort apoptotique par marquage Apo2.7 des HMEC-1 traitées par la désipramine 72 h après une irradiation à 15 Gy. Les images d'une expérience représentative parmi 3 expériences réalisées en duplicates sont figurées. Les valeurs représentent les moyennes \pm ET.

De la même façon, nous avons validé les résultats obtenus en comptage cellulaire par marquage Apo2.7 pour le traitement par la FB1 (Figure 41). La FB1 ne diminue pas l'apoptose radioinduite des HMEC-1 72 h après une irradiation à 15 Gy (contrôle 15 Gy : $43,2 \pm 1 \%$; condition FB1 15 Gy : $43,9 \pm 2,2 \%$) (Figure 41).

Ainsi, aucune implication des couples aSMase/céramide et/ou CS/céramide n'a été mise en évidence dans la vague de mort tardive observée après irradiation dans les cellules HMEC-1.

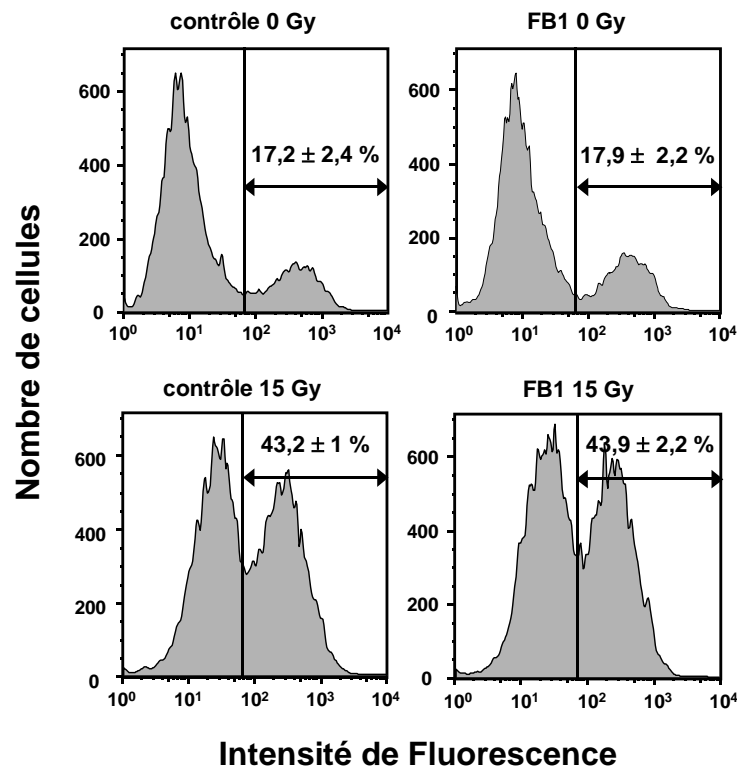


Figure 41: Détermination de la mort apoptotique par marquage Apo2.7 des HMEC-1 traitées par la FB1 72 h après une irradiation à 15 Gy. Les images d'une expérience représentative parmi 3 expériences réalisées en duplicates sont figurées. Les valeurs représentent les moyennes \pm ET.

II.2.2. La S1P ne protège pas les HMEC-1 de la mort tardive

En dépit de la radioprotection médiée par la S1P contre l'apoptose radioinduite des HMEC-1 24 h après irradiation, la protection par la S1P n'est pas efficace en ce qui concerne la deuxième vague de mort radioinduite. En effet, aucune différence statistique n'est observée entre le nombre de cellules flottantes 72 h après 15 Gy des cellules traitées à la S1P ou du contrôle 15 Gy seul. Par test de comptage cellulaire, on obtient en effet $36,9 \pm 12,8$ % de cellules apoptotiques pour les cellules HMEC-1 traitées à la S1P et $42,7 \pm 8,5$ % pour le contrôle 15 Gy ($P = 0,531$) (Figure 42).

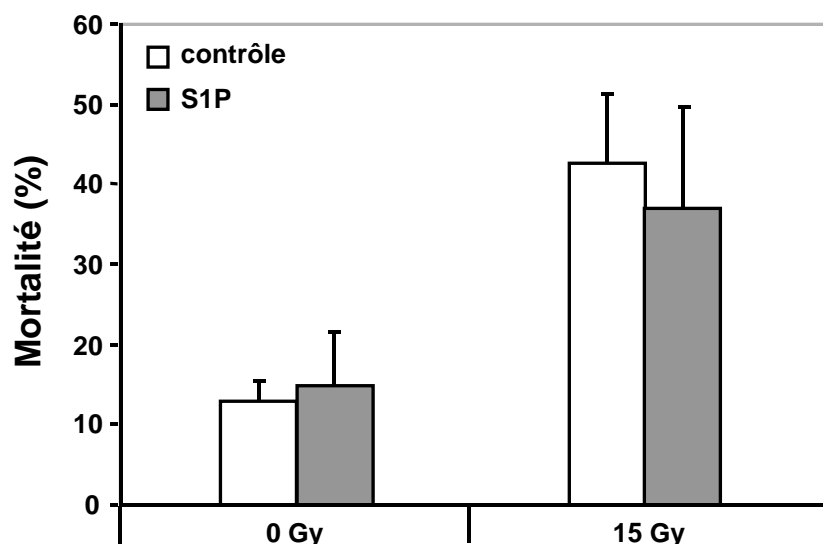


Figure 42: Pourcentage de cellules apoptotiques obtenus par comptage cellulaire des HMEC-1 traitées par 1 μ M de S1P (histogrammes pleins) ou par le contrôle (vides) 72 h après une irradiation à 15 Gy. Les valeurs représentent la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.

Ces résultats ont été confirmés par marquage Apo2.7 (Figure 43). Après une exposition à 15 Gy, on observe $44,1 \pm 0,3$ % de mort pour le contrôle, et $42,4 \pm 0,1$ % pour les cellules traitées à la S1P. La S1P ne permet donc pas d’inhiber la mort radioinduite des HMEC-1 dans les temps tardifs après irradiation, soit à 72 h.

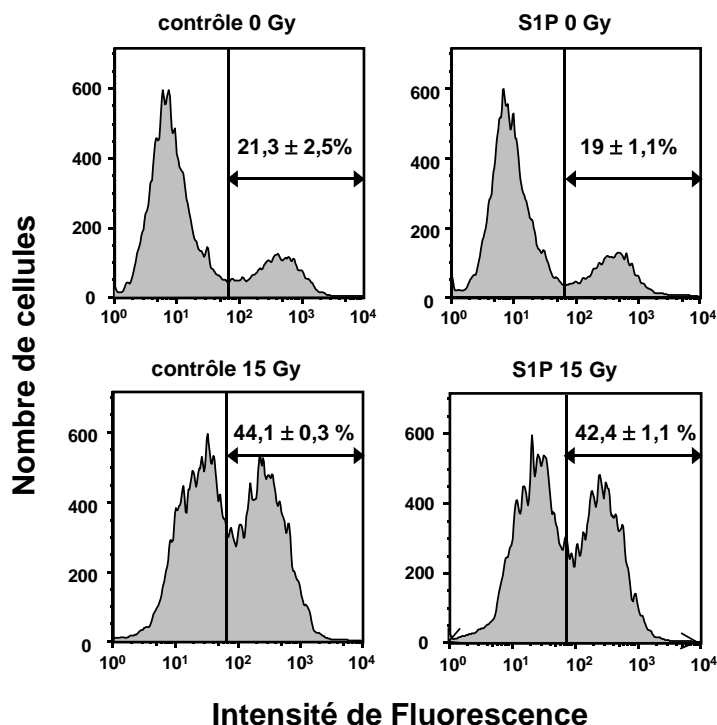


Figure 43: Détermination du nombre de cellules apoptotiques réalisé par cytométrie en flux en utilisant le marqueur apoptotique Apo2.7 des HMEC-1 72 h après une irradiation à 15 Gy. Les images d’une expérience représentative parmi 3 expériences réalisées en duplicates sont figurées. Les valeurs sont la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes.

II.3. La mort tardive radioinduite des HMEC-1 est une mort mitotique

II.3.1. La S1P ne protège pas les HMEC-1 des dommages de l'ADN

Le fait que la désipramine ou la FB1 n'aient pas d'action sur la mort tardive montre que la deuxième vague de mort semble être indépendante de la génération du céramide et de la signalisation membranaire. Les dommages de l'ADN constituent une voie majeure d'induction de mort après une irradiation [Valerie and Povirk, 2003]. Ainsi, nous avons cherché à comprendre si la deuxième vague de mort est dépendante des dommages de l'ADN.

L'étude de la phosphorylation de l'histone H2AX (γ H2AX) permet de mettre en évidence les DSBs. En effet, il a été montré qu'un foyer γ H2AX représente une cassure double brin de l'ADN [Sedelnikova *et al.*, 2002]. Les cellules contenant des foyers γ H2AX ont été quantifiées par cytométrie en flux en fonction du temps, de l'irradiation et du traitement à la S1P. La phosphorylation de l'histone H2AX est un phénomène observé très rapidement après irradiation (Figure 44).

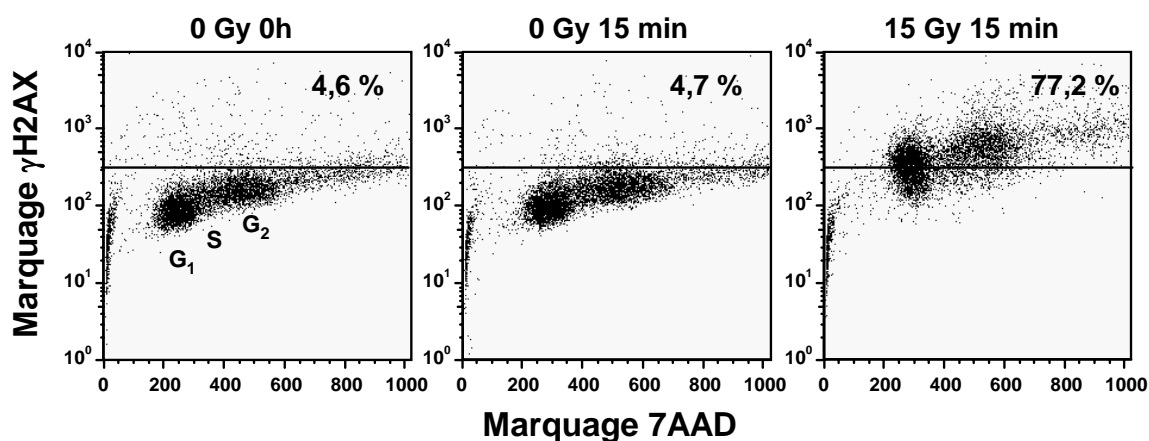


Figure 44: Dot plot représentant la phosphorylation rapide de l'histone H2AX après irradiation. Les dot plots d'une expérience parmi 4 expériences indépendantes réalisées en duplicates ou en triplicates sont figurés.

A 0 Gy le taux de cellules contenant des foyers γ H2AX est de $6,3 \pm 1,8$ % et 15 min après une exposition à 15 Gy on observe $73,7 \pm 5,2$ % de cellules positives pour γ H2AX. En 15 min le nombre de cellules positives pour γ H2AX est 11,7 fois supérieur qu'au moment de l'irradiation (Figure 45). Le maximum de cellules positives pour γ H2AX est observé dans une fenêtre de temps comprise entre 30 min et 1 h post-irradiation à 15 Gy. Trente minutes post-irradiation il y a $83,2 \pm 6,7$ % de cellules positives pour γ H2AX dans la condition contrôle, et $74,3 \pm 11,2$ pour la condition S1P; $P > 0,5$.

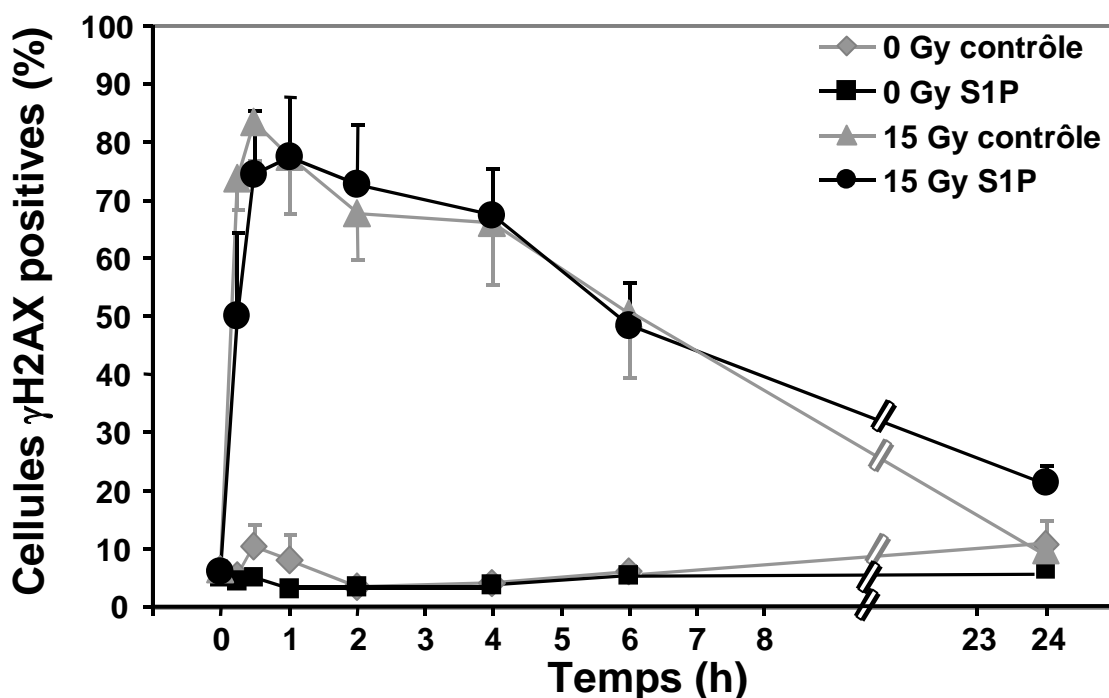


Figure 45: Marquage des dommages de l'ADN avec l'Ac anti- γ H2AX des HMEC-1 traitées par $1 \mu\text{M}$ de S1P (●) ou par le contrôle (▲) 0, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6 ou 24 h après une irradiation à 15 Gy. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en duplicates ou en triplicates.

Les profils des cinétiques d'induction des DSBs ainsi que ceux de leur réparation, représentés respectivement par l'augmentation et la diminution du nombre de cellules positives pour γ H2AX sont similaires, que les cellules HMEC-1 soient traitées ou non par la S1P avant irradiation.

Il est établi qu'une cellule peut exprimer un ou plusieurs foyers γ H2AX selon qu'elle possède un ou plusieurs DSBs. Nous avons donc étudié le marquage γ H2AX en fonction du pourcentage de cellules positives, mais aussi en fonction de la moyenne de fluorescence observée pour chaque condition. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les moyennes de fluorescence de la condition contrôle et de la condition S1P (Tableau 8).

		0 h	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
0 Gy	Témoin	718	669	752	714	801	918	700	813
	S1P	766	801	837	859	737	797	773	849
15 Gy	Témoin		934	1200	1306	1236	879	609	805
	S1P		1004	1156	1266	997	722	600	848

Tableau 8: Moyennes de fluorescence des cellules marquées avec l'Ac anti- γ H2AX après traitement par la S1P ou par le contrôle et irradiation. Les valeurs données sont issues d'une expérience représentative parmi 4 expériences indépendantes réalisées en duplicates ou en triplicates.

On observe que les moyennes de fluorescence, que ce soit pour le contrôle ou pour les cellules traitées avec la S1P oscillent entre 700 et 800 lorsque les cellules ne sont pas irradiées. Après une irradiation à 15 Gy, la moyenne de fluorescence augmente dès 15 min post-irradiation pour atteindre des valeurs d'environ 1200 à 1300 jusqu'à 2 h post-irradiation. La fluorescence diminue à partir de 4 h pour retrouver son taux de base.

La S1P ne semble donc pas avoir d'impact au niveau de la formation et/ou de la réparation des DSBs radioinduits dans les cellules endothéliales HMEC-1 après une irradiation à dose unique de 15 Gy.

II.3.2. La S1P ne protège pas les HMEC-1 des dommages chromosomiques

Les dommages radioinduits de l'ADN conduisent après amplification au cours de la mitose à des dommages chromosomiques, pouvant induire une catastrophe mitotique et la mort cellulaire. Nous avons donc étudié les dommages chromosomiques radioinduits, quantifiés par le nombre de cassures par métaphase 24 h après une gamme de dose d'irradiation de 0, 2, 5, 10 et 15 Gy avec ou sans S1P.

Vingt-quatre heures après irradiation, les cellules sont lysées et les noyaux sont étalés sur lames avant d'être marqués pour mettre en évidence les centromères et les télomères des noyaux en métaphase. Cette technique permet de mettre en évidence les cassures et les remaniements chromosomiques. Pour les contrôle non irradiés, on remarque un certain remaniement de base par la présence d'un ou deux chromosomes dicentriques par métaphase, que ce soit pour les HMEC-1 prétraitées par la S1P ou par le contrôle (Figure 46). Après irradiation, nous observons un très fort remaniement chromosomique, que ce soit avec ou sans S1P (Figure 46). On note la présence de nombreux chromosomes dicentriques, acentriques, ou encore de minutes.

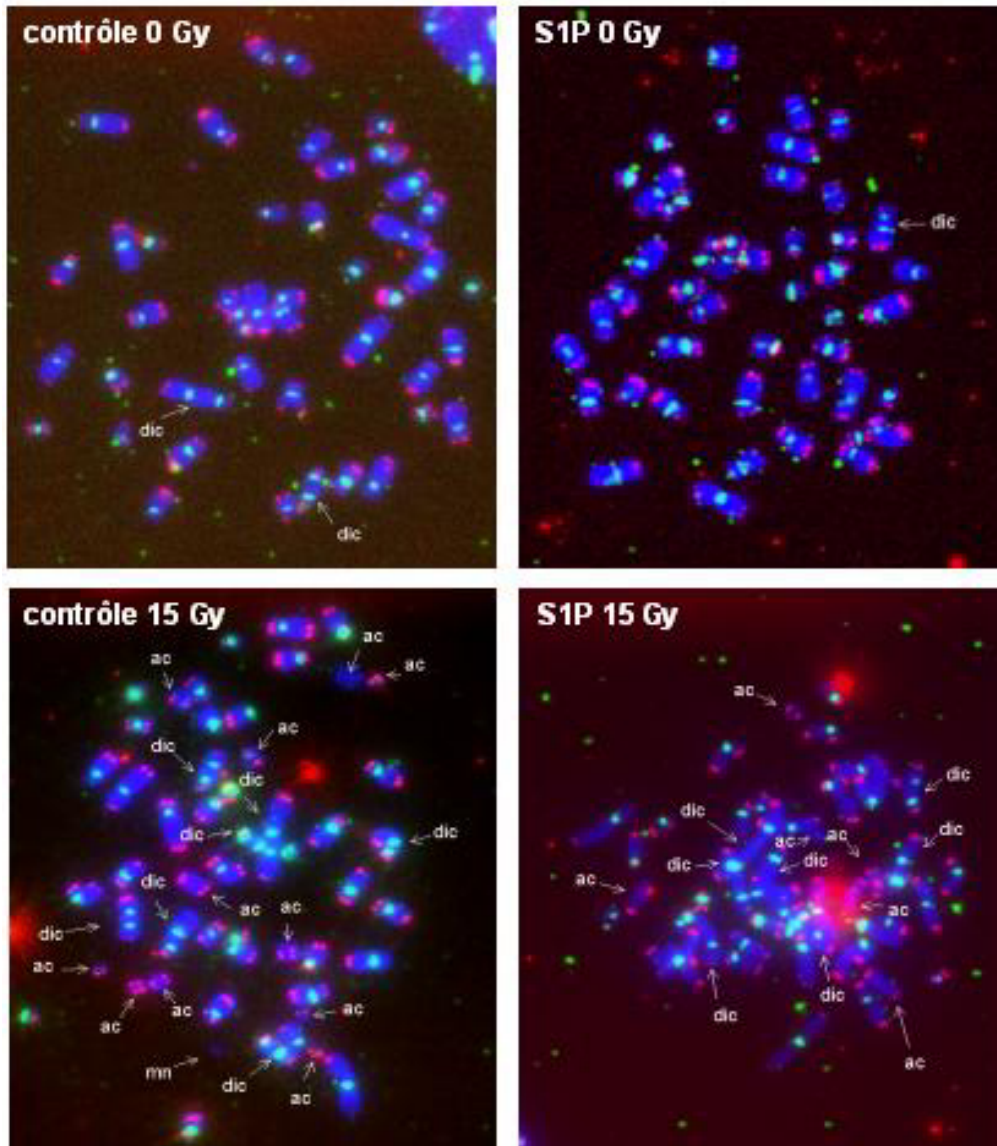


Figure 46: Photographie de métaphases marquées par la technique FPG (Fluorochrome Plus GIEMSA) avec ou sans prétraitement par la S1P et avec ou sans irradiation ($\times 630$ en immersion).

Du fait de l'importance de la mort cellulaire après une irradiation à 10 ou 15 Gy, ainsi que du peu de métaphases observées après une telle irradiation, les données obtenus pour les doses de 10 et 15 Gy ne sont pas statistiquement pertinentes. Les études des dommages chromosomiques ont donc été effectuées à 0, 2 et 5 Gy (Figure 47). Tout d'abord, on observe que le nombre de cassures par métaphases augmente de façon dose-dépendante. On compte $1,1 \pm 0,1$, $2,6 \pm 0,3$ et $5,7 \pm 0,6$ cassures par métaphase respectivement pour les doses de 0, 2 et 5 Gy. Le traitement à la S1P n'induit pas de changement dans le nombre de cassures par métaphases. On compte en effet $0,9 \pm 0,2$, $3 \pm 0,3$ et $5,6 \pm 0,4$ cassures pour les doses de 0, 2 et 5 Gy (0 Gy : $P = 0,5$; 2 Gy : $P > 0,3$; 5 Gy $P > 0,5$).

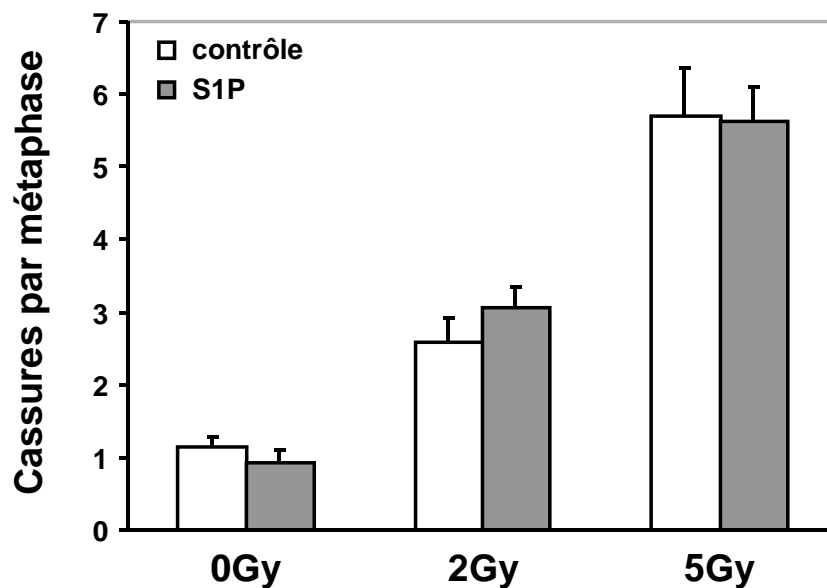


Figure 47: Nombre de cassures chromosomiques par métaphase pour les cellules HMEC-1 contrôles (histogrammes vides) ou traitées par 1 μ M de S1P (pleins) 24 h après irradiation. Les cellules sont bloquées en métaphase par un traitement à la colchicine. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 100 métaphases analysées par condition.

De plus, nous n'avons pas observé de différence dans la qualité des cassures, comme les multicentriques, les acentriques ou encore les minutes observées dans les conditions irradiées, avec ou sans prétraitement avec la S1P (Tableau 9).

		Rien	dic	tric	quadric	ac	min	anneau
0 Gy	témoin	59,42	37,68	2,9	0	1,45	0	0
	S1P	59,74	37,66	1,3	0	2,6	0	2,6
2 Gy	témoin	26,83	58,54	4,88	2,44	24,39	7,32	2,44
	S1P	10,71	57,14	7,14	0	32,14	7,14	7,14
5 Gy	témoin	0	85	15	0	40	25	0
	S1P	0	78,05	19,51	2,44	39,02	4,88	4,88

Tableau 9: Pourcentage de cassures par type de cassures observées après irradiation à 0, 2 ou 5 Gy pour les cellules irradiées contrôle ou traitées par la S1P. Dic = dicentrique ; tric= tricentrique ; quadric = quadricentrique ; ac = acentrique ; min = minute.

Les expériences menées après irradiation à 10 et 15 Gy montrent les même tendances au niveau induction et type de cassures par métaphases quand les HMEC-1 sont irradiées et traitées avec la S1P ou son contrôle. Cependant, le nombre de métaphases observé est trop faible pour obtenir une distribution statistique suffisante.

Les dommages chromosomiques conduisent à une mauvaise ségrégation des chromosomes au cours de la mitose, ce qui peut conduire à une polyploïdie cellulaire, ou encore à l'exclusion de micronoyaux, induisant la mort mitotique [Roninson *et al.*, 2001]. Afin de déterminer le mécanisme de mort impliqué dans la seconde vague post-irradiation, la formation des micronoyaux a été quantifiée 48 h après une exposition à 15 Gy. L'observation microscopique a mis en évidence que les cellules HMEC-1 possèdent des micronoyaux après une irradiation à 15 Gy (Figure 48).

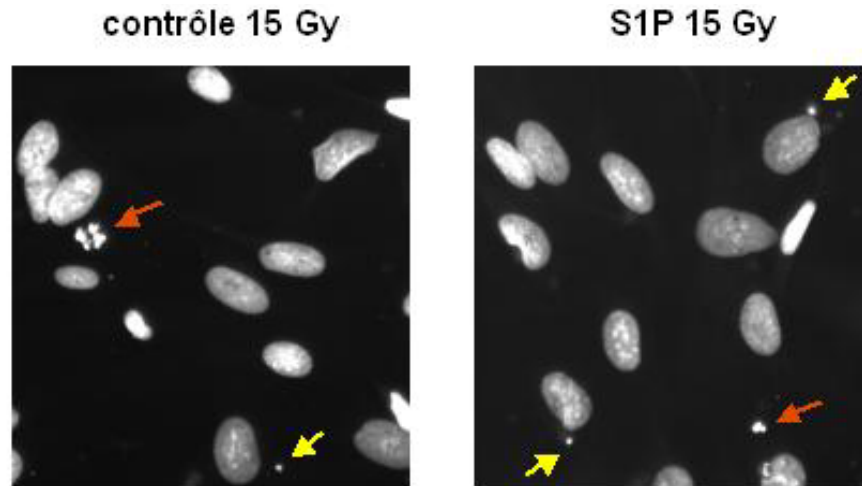


Figure 48: Observation au microscope à fluorescence après marquage à l'IP des micronoyaux des HMEC-1 48 h après traitement par la S1P et irradiation à 15 Gy. Les flèches jaunes mettent en évidence des micronoyaux, les flèches rouges des corps apoptotiques.

Le nombre de cellules avec un ou plusieurs micronoyaux augmente d'un facteur 3,3 après une irradiation à 15 Gy par rapport aux cellules non irradiées (Figure 49). Le prétraitement par la S1P n'inhibe pas le taux de cellules HMEC-1 exprimant un ou plusieurs micronoyaux après irradiation. Ainsi on observe $28,8 \pm 2,1$ % cellules HMEC-1 avec un ou plusieurs micronoyaux lorsqu'elles sont traitées à la S1P avant une irradiation à 15 Gy, et $28,7 \pm 2,7$ % pour les cellules irradiées contrôle; $P > 0,9$ (Figure 49). L'observation de dommages de l'ADN amplifiés en micronoyaux mettent en évidence que lors de cette deuxième vague de mort les HMEC-1 possèdent les caractéristiques d'une mort mitotique. Nos études de l'impact de la S1P montrent qu'elle n'intervient pas dans les mécanismes d'induction de cette mort mitotique.

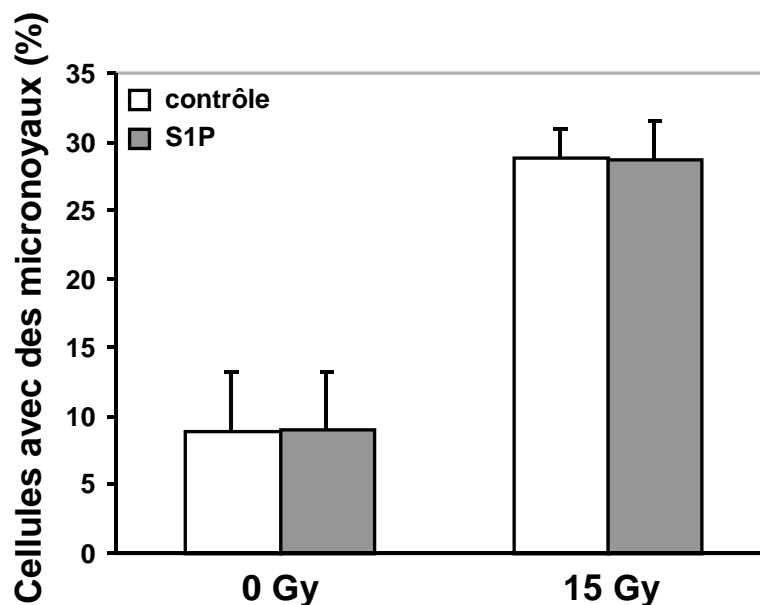


Figure 49: Quantification par observation microscopique après marquage à l'IP du nombre de cellules HMEC-1 possédant un ou plusieurs micronoyaux 48 h après une irradiation à 15 Gy pour les cellules contrôles (histogrammes vide) ou traitées par 1 μ M de S1P (plein). Les valeurs représentent la moyenne \pm ET de 4 expériences indépendantes avec 200 noyaux comptés par condition.

II.3.3. La S1P ne module pas l'arrêt du cycle cellulaire impliqué dans la mort mitotique

La mort mitotique est considérée comme étant un processus lent pouvant avoir lieu un ou plusieurs cycles cellulaires après l'induction de dommages de l'ADN [Ross, 1999]. Afin de confirmer que la S1P n'interagit pas avec les mécanismes de régulation de la vague de mort mitotique radioinduite, la prolifération et la régulation du cycle cellulaire ont été étudiées après irradiation.

Tout d'abord, nous avons vérifié que la protection par la S1P pendant la première vague de mort apoptotique n'est pas due à une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales HMEC-1 induite par la S1P. Pour cela nous avons réalisé un test d'incorporation de 3 H-thymidine. Dans les cellules HMEC-1 non irradiées, 24 h après un prétraitement à la S1P, la prolifération est supérieure de $21,9 \pm 3,1$ % comparé aux cellules non traitées (Figure 50). Ceci confirme l'action pro-angiogénique de la S1P [Licht *et al.*, 2003]. Cependant, après une irradiation à 15 Gy, la prolifération diminue respectivement de 86,4 % et 88,8 % pour les cellules contrôle ou les cellules traitées à la S1P, et aucune

différence n'est observée dans la prolifération des cellules en condition contrôle ou celles traitées avec la S1P après 15 Gy ($P > 0,8$) (Figure 50).

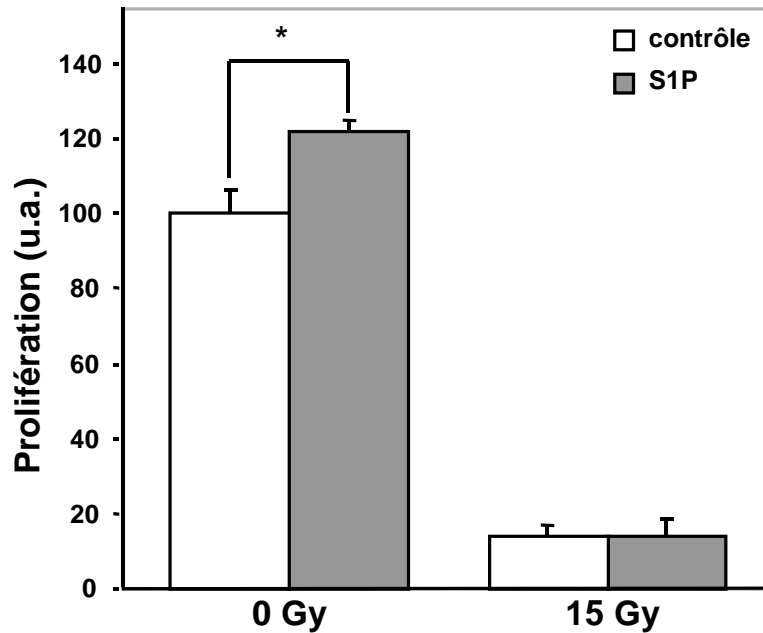


Figure 50: Etude de la prolifération des cellules HMEC-1 contrôles (histogramme vide) ou traitées par la S1P (plein) réalisée par incorporation de ^3H -Thymidine. Les valeurs représentent la moyenne \pm ET de 5 expériences indépendantes; * $P \leq 0,001$.

Ces résultats ont été confirmés par l'analyse des indices mitotiques. Il s'agit du pourcentage de cellules en mitose par rapport à la population cellulaire totale, reflétant ainsi le pouvoir prolifératif des cellules. Vingt-quatre heures après une gamme de dose d'irradiation de 2 à 15 Gy, l'indice mitotique diminue de façon dose-dépendante (Figure 51).

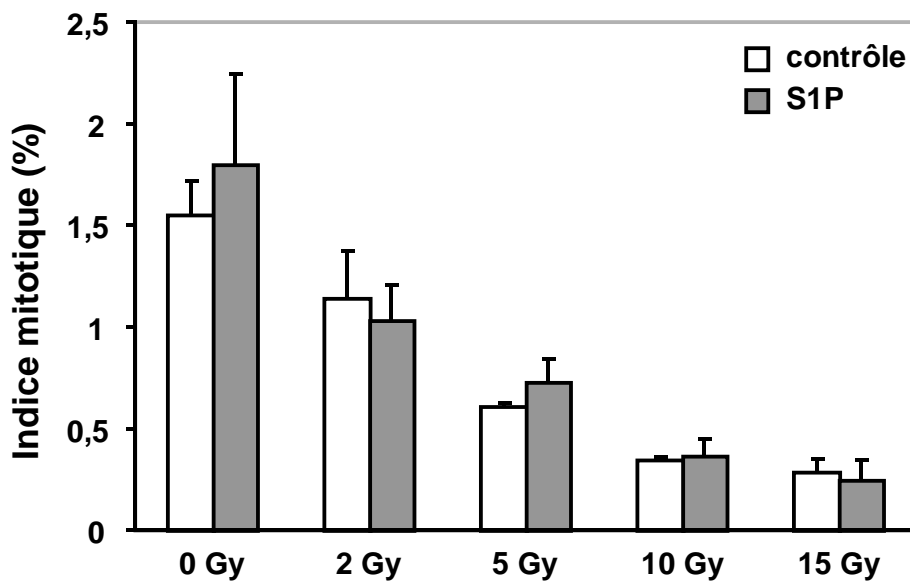


Figure 51: Indice mitotique des cellules HMEC-1 contrôles (histogrammes vide) ou traitées avec la S1P (plein) après une gamme de dose de 0, 2, 5, 10 et 15 Gy. Les valeurs représentent la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes avec 1000 noyaux comptés par expérience.

A 0 Gy l'indice mitotique est de $1,5 \pm 0,2$ pour le contrôle, et de $1,8 \pm 0,4$ pour les HMEC-1 traitées à la S1P. Après une irradiation à 15 Gy l'indice mitotique diminue respectivement d'un facteur 5 et 6 pour les cellules contrôles ou celles traitées avec la S1P (contrôle 15 Gy : $0,3 \pm 0,06$; condition S1P 15 Gy : $0,3 \pm 0,09$). Pour chaque dose d'irradiation étudiée, il n'y a pas de différence statistique entre le contrôle ou la condition S1P (0 Gy: $P > 0,4$; 2 Gy: $P > 0,5$; 5 Gy: $P > 0,1$; 10 Gy: $P > 0,8$; 15 Gy: $P > 0,7$).

La distribution des cellules HMEC-1 dans les différentes phases du cycle cellulaire 24 h après irradiation a été étudiée en cytométrie en flux par incorporation d'IP. Les cellules HMEC-1 non irradiées présentent une distribution typique d'une population non synchronisée. En phase G₁, on observe $41 \pm 6,8$ % pour le contrôle et $43,4 \pm 4,6$ % pour la S1P. En phase S on compte $15,8 \pm 8$ % pour le contrôle et $18,4 \pm 6,1$ % pour la S1P. Enfin en phase G₂ on observe $23,1 \pm 11,2$ % pour le contrôle et $19,6 \pm 4,8$ % pour la S1P (Figure 52). Comme il a déjà été montré, on observe un blocage en G₂/M après irradiation. De plus, la S1P ne modifie pas l'efficacité et/ou la cinétique du blocage en G₂/M radioinduit. Vingt-quatre heures après une exposition à 15 Gy, $48,2 \pm 8,2$ % des cellules contrôle sont arrêtées en G₂/M versus $50 \pm 5,5$ % pour les cellules traitées à la S1P (Figure 52).

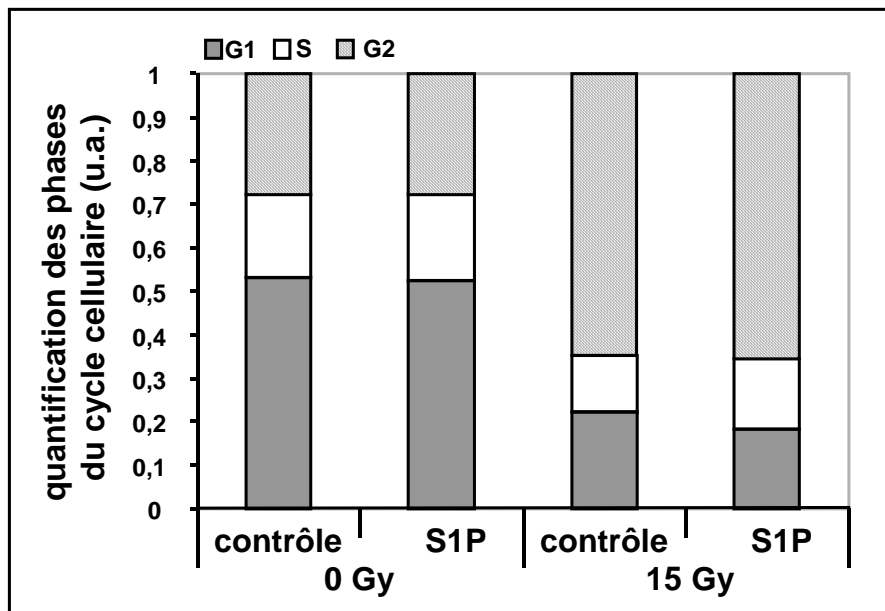


Figure 52: Analyse du cycle cellulaire par le logiciel Flow Jo après marquage IP des cellules HMEC-1 après traitement ou non par 1 μ M de S1P et irradiation à 15 Gy. Les valeurs représentent la moyenne de 4 expériences réalisées en duplicate.

II.4. La combinaison des traitements S1P et nocodazole protège les HMEC-1 en inhibant respectivement la voie apoptotique membranaire et la voie de mort mitotique radioinduites

Puisque le cycle cellulaire doit reprendre afin que la mort mitotique puisse avoir lieu, nous avons utilisé le nocodazole qui inhibe la formation des microtubules pendant la mitose afin de bloquer ou de retarder la mort mitotique. Nous avons tout d'abord évalué l'arrêt en phase G₂/M des HMEC-1 avec ou sans irradiation lorsqu'elles sont traitées au nocodazole (Figure 53). Nos résultats montrent qu'un traitement avec 0,1 µg/ml de nocodazole pendant 24 h bloque les HMEC-1 en phase G₂/M du cycle cellulaire, que ce soit avec ou sans traitement avec la S1P lorsque les cellules ne sont pas irradiées (Figure 53). De plus, lorsque les cellules sont irradiées à 15 Gy, le traitement au nocodazole ne perturbe pas le blocage en G₂/M induit par les radiations, que ce soit pour les conditions contrôle ou S1P (Figure 53).

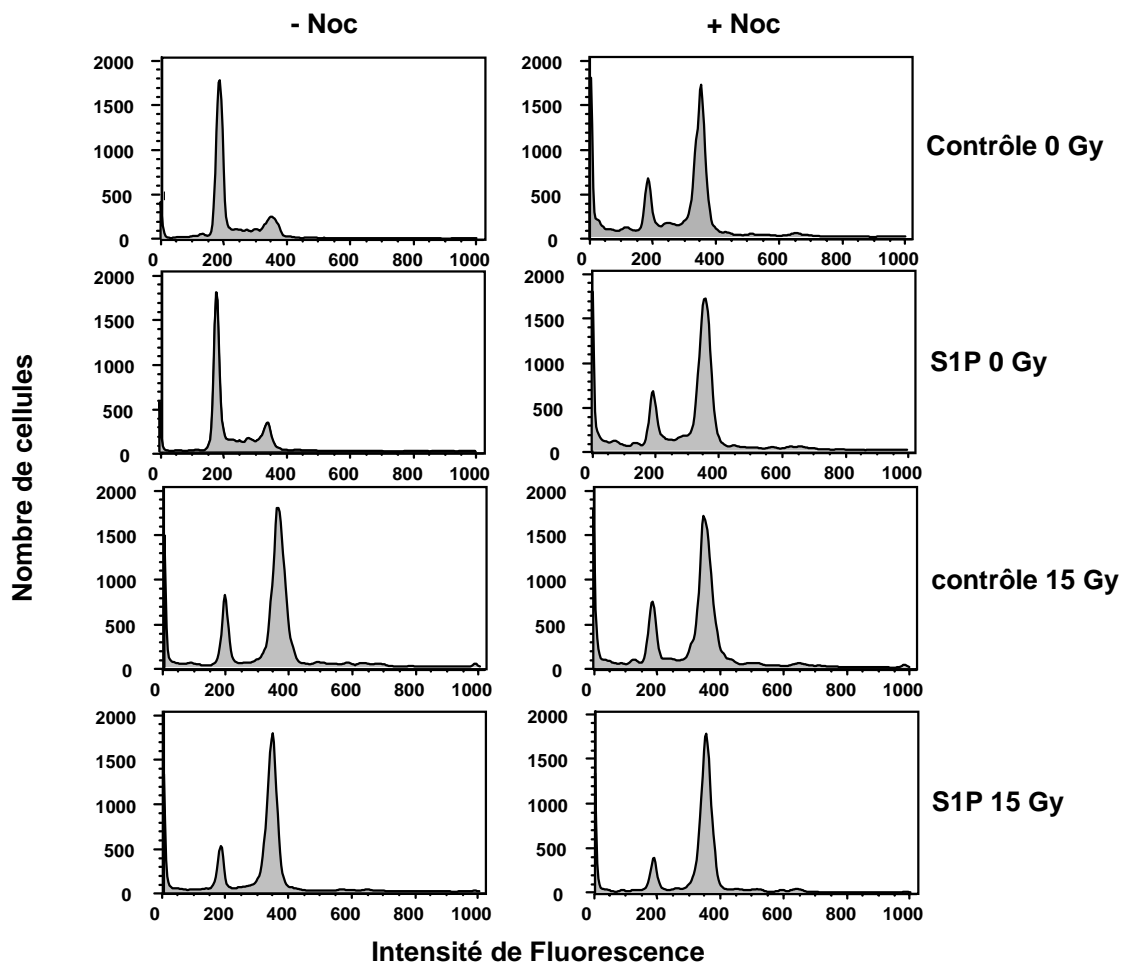


Figure 53: Régulation du cycle cellulaire mise en évidence par marquage IP 24 h après irradiation à 15 Gy, avec ou sans traitement par le nocodazole 0.1 µg/ml. Les images d'une expérience représentative parmi 3 expériences réalisées en duplicates ou en triplicates sont représentées.

Quarante-huit heures après une irradiation à 15 Gy et un traitement par le nocodazole, une diminution de 30,6 % de la mort cellulaire est observée par rapport au contrôle irradié seul (Figure 54). Le traitement avec la S1P n'a pas d'effet sur la mort cellulaire ($P > 0,2$), ce qui confirme les résultats obtenus par comptage cellulaire et par marquage Apo2.7 des figures 42 et 43 (Figure 54). Afin de valider le fait que la mort radioinduite des HMEC-1 implique deux mécanismes différents, soit l'apoptose médiée par le céramide et la mort mitotique induite par les dommages de l'ADN, nous avons traité les HMEC-1 tout d'abord par la S1P avant l'irradiation, puis par le nocodazole 24 h après l'exposition à 15 Gy. Une augmentation de la radioprotection est observée quand les HMEC-1 irradiées ont été traitées par le nocodazole seul ou par S1P + nocodazole. (Figure 54). On observe en effet une diminution de 30,6 % de mort cellulaire lorsque les cellules irradiées sont traitées au nocodazole par rapport aux 100 % des cellules irradiées seules ($P \leq 0,001$), tandis que lorsque les cellules reçoivent la combinaison S1P + nocodazole le marquage Apo2.7 met en évidence une diminution de 40,7 % de mort cellulaire par rapport aux 100 % du contrôle ($P \leq 0,001$).

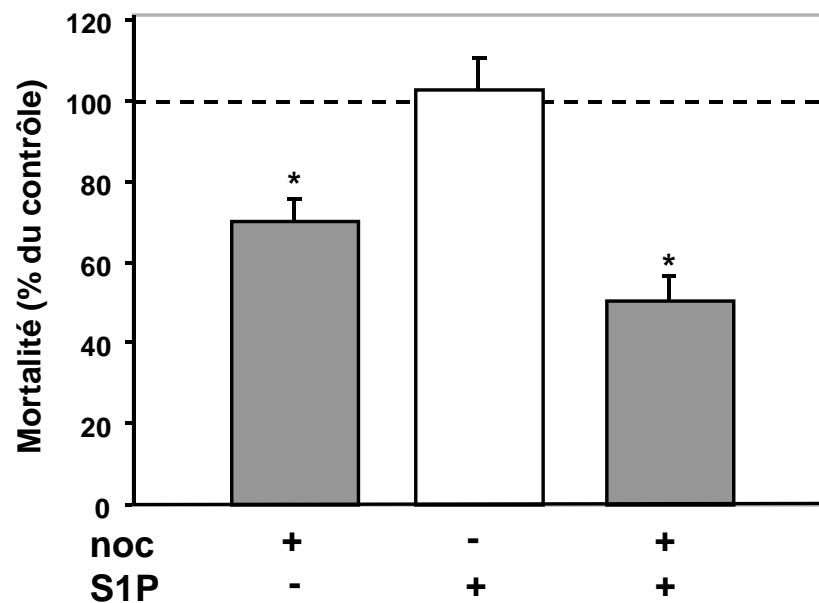


Figure 54: Mort radioinduite des cellules HMEC-1 irradiées à 15 Gy et traitées 2 h avant par 1 μ M de S1P et par 0,1 μ g/ml de nocodazole pendant 24 h post-irradiation. Les cellules ont été marquées 48 h après irradiation par l'Ac Apo2.7. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes en duplicates ou en triplicates ; * $P \leq 0,001$.

A cause de leur implication dans la mort mitotique, l'incidence de la formation des micronoyaux a été déterminée dans les cellules HMEC-1 irradiées afin de valider la protection induite par le double traitement S1P et nocodazole (Figure 55). Tout d'abord comme nous l'ont confirmé les expériences sur les dommages de l'ADN et les cassures chromosomiques

(Figures 46 et 47), la S1P n'a pas d'effet sur la formation des micronoyaux après irradiation ($P > 0,9$, Figure 55). Une diminution de 40,5 % pour les cellules traitées au nocodazole possédant un ou plusieurs micronoyaux par rapport au contrôle irradié seul est observée ($P = 0,004$; Figure 55). Une meilleure radioprotection est observée lorsque les cellules sont traitées par la S1P et le nocodazole. Ainsi, on observe une diminution de 62,5 % du nombre de cellules possédant un ou plusieurs micronoyaux par rapport au contrôle irradié seul ($P \leq 0,001$; Figure 55).

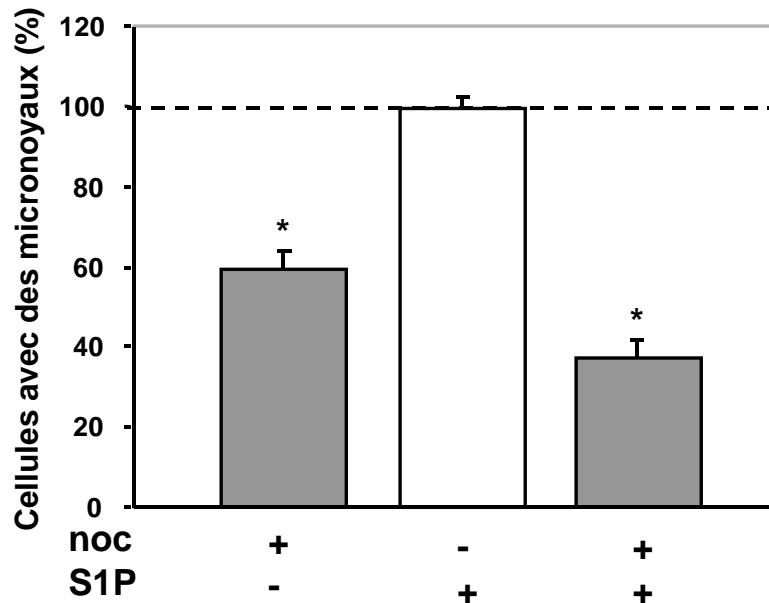


Figure 55: Quantification par observation microscopique après marquage à l'IP du nombre de cellules HMEC-1 possédant un ou plusieurs micronoyaux 48 h après une irradiation à 15 Gy pour les cellules traitées 2 h avant par 1 μ M de S1P et par 0,1 μ g/ml de nocodazole pendant 24 h post-irradiation. Les valeurs représentent la moyenne \pm ET de 4 expériences indépendantes avec 200 noyaux comptés par condition ; * $P \leq 0,005$.

II.5. Conclusion

L'impact de la radiosensibilité des cellules endothéliales dans les dommages tissulaires et la régression tumorale après de fortes doses d'irradiation a été décrit précédemment [Cho *et al.*, 2004; Garcia-Barros *et al.*, 2003; Paris *et al.*, 2001]. Il a été montré que les cellules endothéliales confluentes meurent après irradiation par une voie induite par la génération du facteur pro-apoptotique céramide [Haimovitz-Friedman *et al.*, 1994b]. Cependant, si la mort mitotique représente la voie de signalisation majoritaire après irradiation pour la plupart des cellules eucaryotes en division, l'implication de la mort mitotique dans la radiosensibilité des cellules endothéliales n'a pas été clairement démontrée. Ainsi nous prouvons par nos études que les cellules endothéliales en prolifération subissent

une mort radioinduite de type mort mitotique si la voie apoptotique médiée par le céramide est inhibée par la S1P.

Ainsi, la radiosensibilité des HMEC-1 irradiées est composée de 2 vagues :

- la première vague qui apparaît entre 0 et 24 h post-irradiation est dépendante de l'activation de l'aSMase et de la génération du céramide, puisqu'un traitement à la désipramine ou à la S1P est capable d'inhiber cette apoptose radioinduite
- la seconde vague de mort qui apparaît après 24 h post-irradiation est insensible à la désipramine, et est donc indépendante de la voie apoptotique médiée par le couple aSMase/céramide. L'étude des aberrations chromosomiques et de la formation des micronoyaux corréle la seconde mort à la génération de dommages de l'ADN et à une mort mitotique. Cette implication de la mort mitotique a été prouvée par l'inhibition de la seconde vague de mort par le nocodazole, un inhibiteur de mitose.

III ETUDE DE LA RADIOSENSIBILITE DES CELLULES ENDOTHELIALES *IN VIVO* SUR UN MODELE DE SYNDROME GASTRO-INTESTINAL

III.1. La S1P retarde la mort des souris induite par le SGI

Afin de valider *in vivo* nos observations réalisées *in vitro* sur notre modèle de cellules endothéliales humaines de microvaisseaux, nous avons cherché à protéger par la S1P les cellules endothéliales et l'intestin de la mort radioinduite. Pour cela nous avons utilisé un modèle de souris C57Bl/6 âgées de 8 à 12 semaines irradiées corps entier avec une dose totale de 15 Gy. Ces souris développent un SGI comme décrit précédemment [Paris *et al.*, 2001]. Dans ce modèle, il a été montré au niveau intestinal que les cellules endothéliales sont les premières cibles des radiations et sont responsables de la perte de l'intégrité de l'intestin [Paris *et al.*, 2001].

Lorsque les souris sont traitées à une dose corporelle totale de 15 Gy, 100 % des souris meurent en 7 jours, et la médiane de survie est de 5 jours (Figure 56).

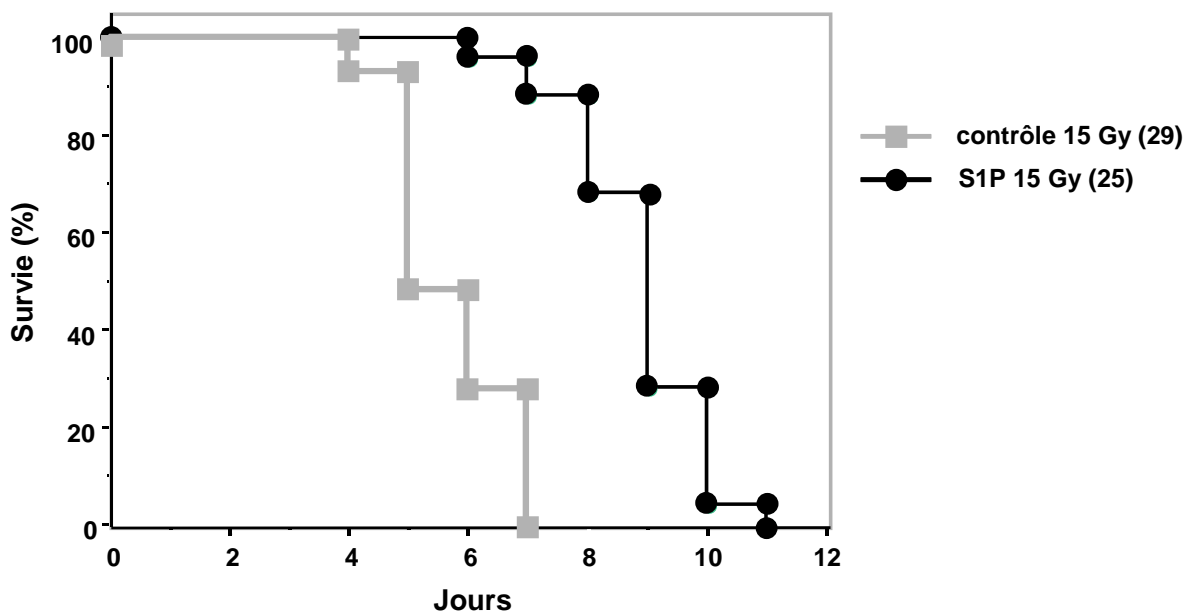


Figure 56: Courbes de survie des souris C57Bl/6 après une irradiation corporelle totale de 15 Gy. Les souris sont injectées au niveau rétro-orbitale 30 min avant et 5 min après irradiation avec 100 µg/injection de S1P ou de véhicule.

Nous avons ensuite évalué la capacité de la S1P à inhiber la mort des souris irradiées. Pour cela nous avons procédé à une injection de S1P 30 min avant l'irradiation à 15 Gy, et 5 min après. Dans ces conditions, 100 % des souris meurent en 11 jours, et la médiane de survie

est de 9 jours (Figure 56). La S1P permet donc de retarder la mort des souris C57Bl/6 provoquée par le SGI radioinduit de 4 jours. Au jour 7 après irradiation, alors que toutes les souris témoins sont mortes, 95 % des souris traitées à la S1P survivent.

Nous avons euthanasié par asphyxie les animaux présentant un état moribond et montrant des signes de SGI tels que des diarrhées, un amaigrissement, et nous avons procédé à des coupes histologiques du jéjunum proximal et du fémur afin de déterminer la cause de leur mort. Nos observations histologiques nous ont permis de mettre en évidence que ces animaux présentent une dénudation des cryptes intestinales et une destruction partielle de la moelle osseuse (Figure 57). Ces résultats indiquent que les souris meurent du SGI radioinduit. Ainsi, l'irradiation corporelle totale des souris à la dose de 15 Gy dans notre laboratoire reproduit le modèle de SGI déjà observé sur ces souris [Paris *et al.*, 2001].

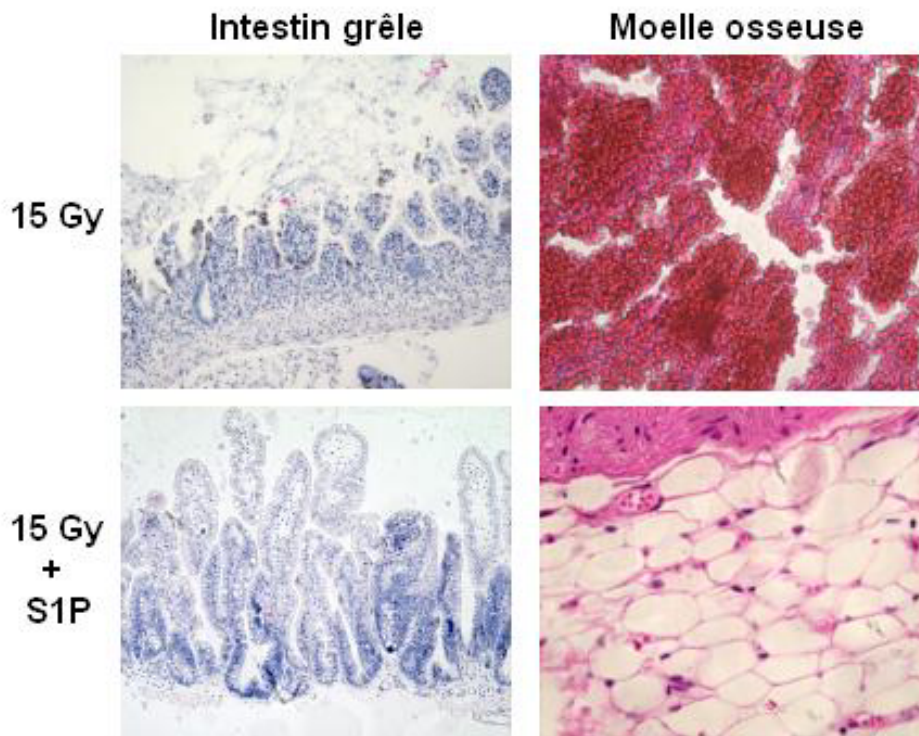


Figure 57: Coupes histologiques du jéjunum proximal et du fémur marquées à l'hématoxyline/éosine d'animaux injectés ou non avec la S1P 30 min avant et 5 min après une irradiation à 15 Gy (grossissement $\times 400$).

Lorsque les souris sont traitées par la S1P, la muqueuse de l'intestin grêle est préservée. En effet, on n'observe pas de destruction des villosités et cryptes intestinales comme pour les animaux contrôles irradiés seul (Figure 57). Par contre, la moelle osseuse du fémur est totalement dénudée, alors que pour les animaux contrôle 15 Gy la moelle osseuse présente des dommages partiels (Figure 57). Ces résultats montrent que lorsque les souris sont

traitées par injection de S1P avant et après l'irradiation, elles ne meurent pas du SGI puisque la muqueuse intestinale n'est pas altérée, mais elles meurent d'aplasie médullaire, comme nous le montrent les coupes histologiques du fémur.

Afin de vérifier que la mort des souris par le SGI est bien due à la mort des cellules endothéliales des cryptes intestinales, nous avons procédé à un marquage des cellules endothéliales de la lamina propria des villosités intestinales par le marqueur apoptotique TUNEL (Figure 58). Les cellules dont le noyau est marqué en marron par le marquage TUNEL représentent des cellules en apoptose.

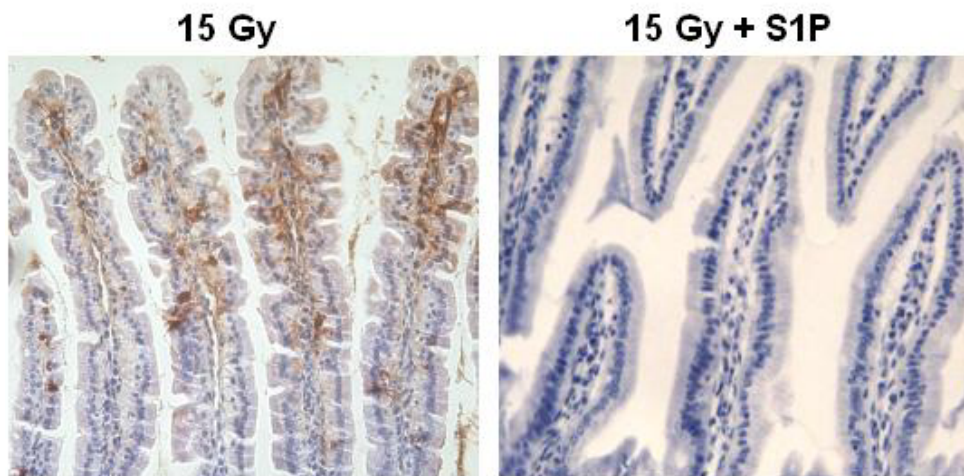


Figure 58: Double marquage TUNEL et hématoxyline des cellules endothéliales de la lamina propria du jéjunum proximal 4 h après une irradiation corporelle totale à 15 Gy pour les souris contrôles, et pour les souris ayant reçu une injection de S1P avant et après l'irradiation (grossissement $\times 400$).

Les cellules endothéliales intestinales subissent une apoptose radioinduite dès 4 h après l'irradiation (Figure 58). D'autres travaux avaient déjà montré le pic de mort des cellules endothéliales intestinales 4 h post-irradiation [Paris *et al.*, 2001]. Ces résultats confirment que dans notre modèle de SGI, les souris meurent suite à l'apoptose des cellules endothéliales de l'intestin, entraînant ainsi un dysfonctionnement intestinal et une déshydratation suivie de la mort de l'animal. Pour les souris traitées avec la S1P, on n'observe pas de cellules positives pour le marquage apoptotique TUNEL (Figure 58). Ces résultats confirment le fait que la S1P, tout comme dans notre modèle *in vitro* de HMEC-1, protège les cellules endothéliales de la mort radioinduite *in vivo*.

III.2. La protection des cellules endothéliales de la mort radioinduite *in vivo* est spécifique de la S1P

Nous avons voulu vérifier si la protection de la mort des cellules endothéliales radioinduite *in vivo* est spécifique de la S1P. Pour cela nous avons utilisé la dhS1P, un analogue de la S1P, mais aussi le LPA, qui se lie à des récepteurs de la famille des S1Ps. Tout comme pour la S1P, nous avons procédé à deux injections de dhS1P ou de LPA, 30 min avant et 5 min après l'irradiation corporelle totale, et 5 min après. Ni la dhS1P, ni le LPA ne permettent de retarder la mort radioinduite des souris C57Bl/6 (Figure 59).

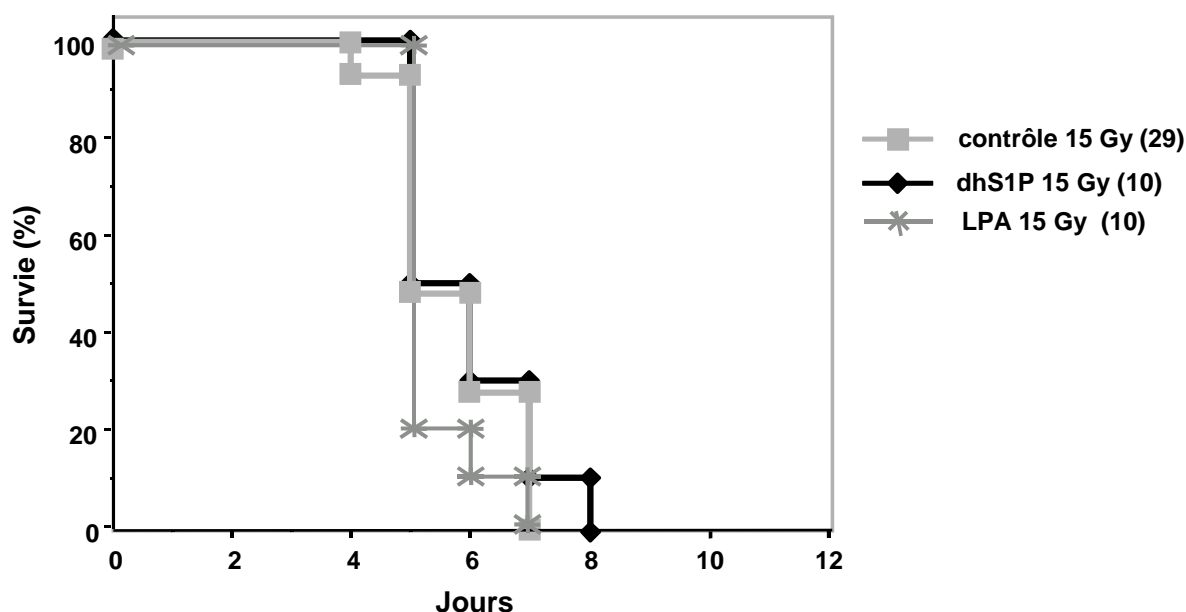


Figure 59: Courbes de survie des souris C57Bl/6 après une irradiation corporelle totale. Les souris sont injectées au niveau rétro-orbitale 30 min avant et 5 min après irradiation avec 100 µg/injection pour la dhS1P, et 63 µg/injection pour le LPA ou par le véhicule.

Pour les souris traitées par la dhS1P, la totalité des animaux meurt au bout de 8 jours, avec une médiane de survie à 5 jours, et pour les animaux traités avec le LPA, 100 % meurent en 7 jours, avec une médiane de survie à 5 jours. Ainsi, les traitements des souris avec la dhS1P ou le LPA ne permettent pas de retarder la mort des souris due au SGI radioinduit (Figure 59). La protection médiée par la S1P contre l'apoptose radioinduite des cellules endothéliales *in vivo* est donc bien spécifique de la S1P, et non des sphingolipides en général.

III.3. Le traitement à la S1P et la greffe de moelle osseuse protègent les souris de la mort radioinduite

L'observation des coupes histologiques réalisées sur les animaux agonisants après irradiation montrent que lorsqu'elles sont traitées à la S1P les souris C57Bl/6 ne meurent pas du SGI dans les 7 jours post-irradiation, mais meurent plus tardivement d'aplasie médullaire. Nous avons voulu valider ces résultats en procédant à une greffe de moelle osseuse autologue de souris 16 h après l'irradiation corporelle totale. Nos observations montrent qu'une greffe de moelle osseuse ne change pas la courbe de survie des souris lorsqu'elles sont irradiées à 15 Gy (Figure 60).

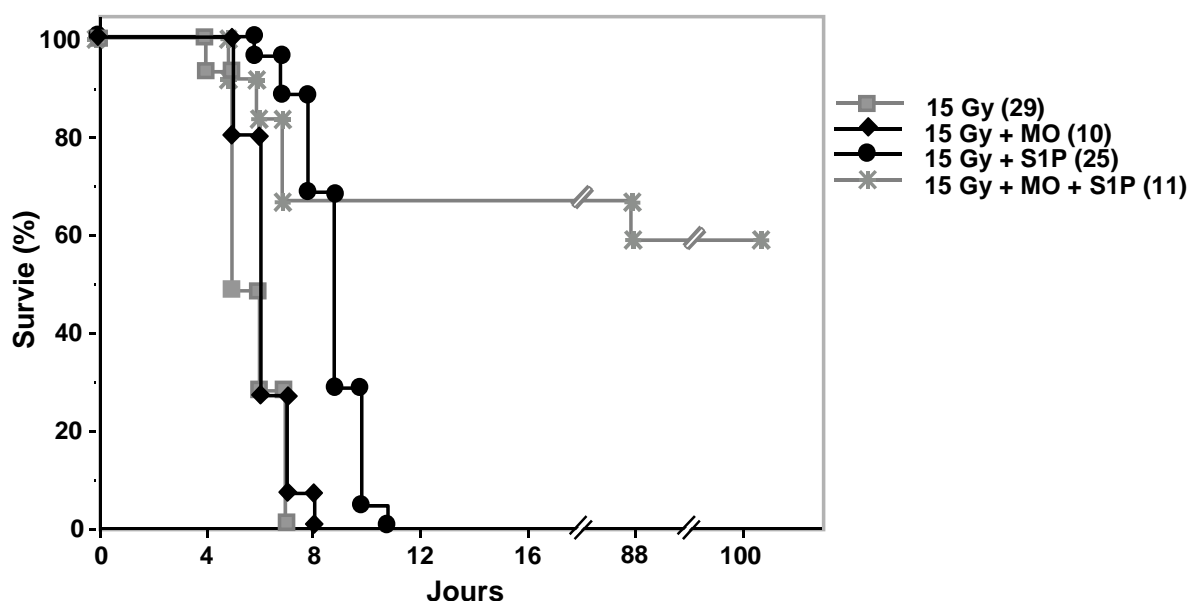


Figure 60: Courbes de survie des souris C57Bl/6 après une irradiation corporelle totale. Les souris sont injectées au niveau rétro-orbitale 30 min avant et 5 min après irradiation avec 100 μg /injection de S1P, et/ou reçoivent 10^7 cellules de moelle osseuse issue de souris donneuses non irradiées 16 h post-irradiation.

En effet, pour les souris 15 Gy, ou les souris 15 Gy + moelle osseuse, la médiane de survie est de 5 et 6 jours, et toutes les souris meurent respectivement à 7 ou 8 jours. Par contre, lorsque les souris sont traitées avec la S1P et reçoivent une greffe de moelle osseuse, elles sont sauvées de la mort radioinduite. En effet, tandis que les souris traitées à la S1P seule ont une médiane de survie de 9 jours et meurent au 11^{ème} jour post-irradiation, celles qui reçoivent en plus une greffe de moelle osseuse ont une survie de 60 % plus de 100 jours après l'irradiation. Ces souris ne présentent aucun signe de dysfonctionnement et se portent comme les souris contrôles non irradiées, mis à part le fait que leur pelage subit une dépigmentation (Figure 61). Cependant, elles meurent subitement vers 4 mois après irradiation.

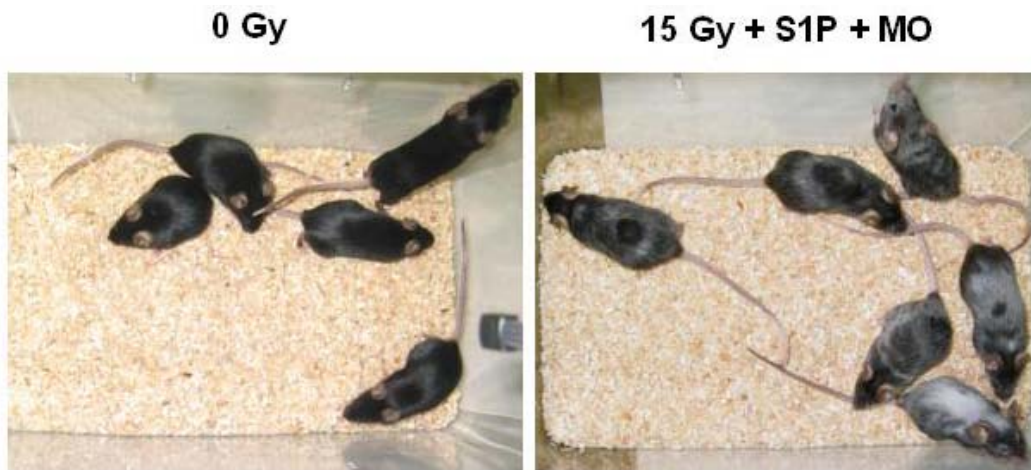


Figure 61: Photographie des souris contrôles 0 Gy ou des souris traitées à la S1P, irradiées à 15 Gy et greffées par de la moelle osseuse, 3 mois après traitements.

III.4. Conclusion

Nous avons montré sur un modèle d'irradiation corporelle totale à 15 Gy de souris C57Bl/6 qu'une injection de S1P 30 min avant et 5 min après l'irradiation retarde la mort des souris (médiane de survie à 9 jours) par rapport au contrôle irradié seul (médiane de survie à 5 jours), et que ce retard de mort est bien spécifique de la S1P. Nos études sur coupes histologiques montrent que ce retard dans la mort est dû à une inhibition de la mort des cellules endothéliales des villosités intestinales, ce qui empêche les souris de mourir des suites du SGI. Cependant les souris meurent plus tardivement d'aplasie médullaire due à la déplétion complète de la moelle osseuse suite à l'irradiation. Ainsi, nous avons montré que la combinaison d'un traitement par la S1P et d'une greffe de moelle osseuse empêche la mort des souris dépendante du SGI (mort précoce) ou d'une aplasie médullaire (mort plus tardive) lorsque les souris sont irradiées. Cependant, les souris meurent tardivement par un processus non défini.

Le fait que l'addition exogène de S1P lève la radiosensibilité des cellules endothéliales *in vivo* nous permet de penser que ce sphingolipide pourrait être utilisé à des fins cliniques en radioprotection des tissus sains au cours de traitement radiothérapeutique.

IV MODALITE DE L’ACTION PHARMACOLOGIQUE DE LA S1P LORS DE LA RADIOPROTECTION DES CELLULES ENDOTHELIALES

IV.1. Etudes *in vitro*

La S1P est connue pour avoir une signalisation médiée intracellulairement en tant que second messenger, ou bien extracellulairement par l’activation de récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G, les récepteurs S1Ps.

Il nous a semblé intéressant de chercher à mettre en évidence par quelle voie est médiée la radioprotection pharmacologique par la S1P des cellules endothéliales HMEC-1 contre l’apoptose prémitotique radioinduite. En effet ceci pourrait permettre d’optimiser la réponse à la S1P au niveau des cellules endothéliales des tissus sains.

IV.1.1. Les HMEC-1 expriment les S1Ps

Une des façons de mettre en évidence la voie de signalisation induite par la S1P est de bloquer la signalisation induite par ses récepteurs. Nous avons donc tout d’abord vérifié que les cellules HMEC-1 expriment bien les récepteurs S1Ps, que ce soit au niveau moléculaire et protéique. Pour cela nous avons extrait l’ARN total des cellules que nous avons amplifié sous la forme d’ADNc. Nous avons ensuite réalisé une PCR (Polymerase Chain reaction) à partir de cet ADNc total afin de savoir si les HMEC-1 expriment les ARNm codant pour un ou plusieurs des récepteurs S1Ps (Figure 62).

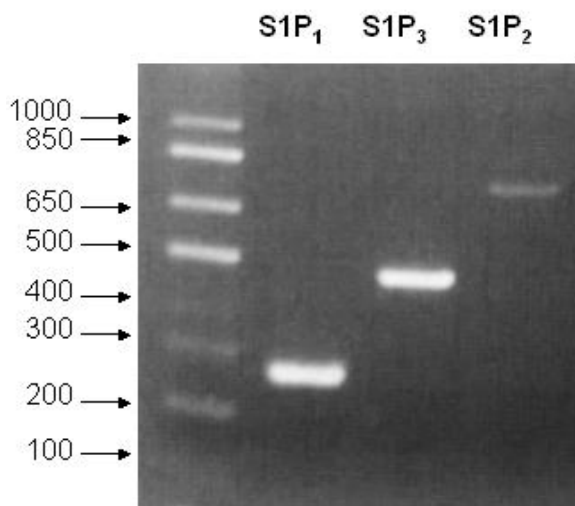


Figure 62: Gel d’électrophorèse d’ADN montrant l’amplification par PCR à partir de l’ADNc total des HMEC-1 de séquences codant pour les récepteurs S1P₁, S1P₂ et S1P₃.

Nos résultats montrent que les HMEC-1 expriment l'ARNm des récepteurs S1P₁, S1P₂ et S1P₃.

Nous avons ensuite vérifié que les HMEC-1 traduisent ces ARNm en récepteurs protéiques. Pour cela, nous avons utilisé la technique du Western-Blot, qui nous a permis de mettre en évidence que les HMEC-1 expriment bien ces trois récepteurs S1P₁, S1P₂ et S1P₃ au niveau protéique (Figure 63).

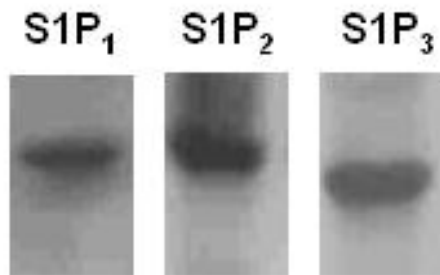


Figure 63: Autoradiographie des Western Blot S1P₁, S1P₂ et S1P₃ réalisés à partir d'extraits protéiques totaux de HMEC-1.

Nous avons détecté des bandes correspondant aux tailles données par les fournisseurs, soit 38 kDa pour S1P₁, 45 kDa pour S1P₂ et 39 kDa pour S1P₃. Nos résultats montrent que les cellules HMEC-1 expriment les récepteurs S1P₁, S1P₂ et S1P₃ au niveau protéique, laissant suggérer que la radioprotection des cellules endothéliales induite par la S1P pourrait s'initier au niveau de ses récepteurs membranaires.

IV.1.2. La Toxine Pertussique lève la radio-protection médiée par la S1P

Afin de mettre en évidence la signalisation induite par la S1P, nous avons utilisé la TP qui en découplant les protéines G_i, inhibe la signalisation induite par les récepteurs S1Ps. Pour cela nous avons traité les HMEC-1 avec 100 ng/ml de TP 2 h 30 avant l'irradiation, suivi ou non d'un traitement de 2 h avec 1 μM de S1P et d'une irradiation à 15 Gy. Nous avons quantifié les résultats par test de comptage cellulaire (Figure 64). On observe que le prétraitement à la TP ne fait pas varier le taux d'apoptose induit par les radiations comparé au contrôle. Il y a en effet $32,7 \pm 12,7$ % de mort apoptotique après 15 Gy pour le contrôle et $28,6 \pm 10,8$ % lorsque les cellules sont prétraitées à la TP ($P = 0,7$) (Figure 64). Un prétraitement à la S1P diminue l'apoptose radioinduite des cellules endothéliales d'un facteur 2,4. On compte en effet $13,4 \pm 4,1$ % de mort apoptotique après 15 Gy lorsque les cellules sont prétraitées avec la S1P ($P < 0,05$) (Figure 64).

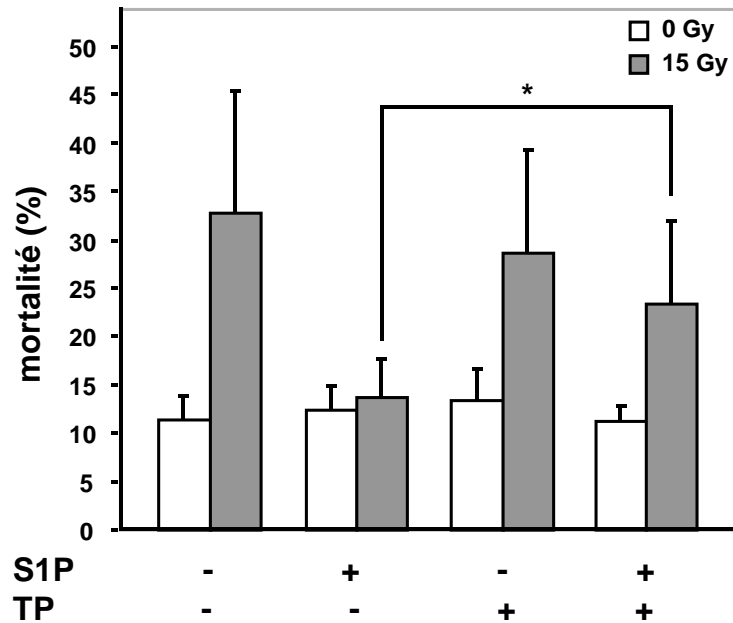


Figure 64: Pourcentages de cellules apoptotiques obtenus par comptage cellulaire des HMEC-1 24 h après un traitement soit par la TP 100 ng/ml, par la S1P 1 μ M, les deux ou le contrôle, suivi d'une exposition à 15 Gy. Les valeurs représentent la moyenne \pm ET de 3 expériences indépendantes; * $P < 0,01$.

Par contre, lorsque les cellules endothéliales reçoivent la TP puis la S1P en prétraitement, la radio-protection induite par la S1P est levée. On observe en effet $28,1 \pm 4,3$ % de mort apoptotique, soit 2,1 fois plus d'apoptose que lorsque les cellules sont traitées à la S1P seule ($P = 0,006$) (Figure 64).

Ces résultats obtenus par test de comptage cellulaire ont été confirmés par marquage TUNEL (Figure 65). On observe que la S1P induit une protection de 24 % puisque le marquage met en évidence un taux d'apoptose de $75,6 \pm 8,2$ % par rapport au contrôle 15 Gy. Par contre, lorsque les cellules sont traitées avec la TP et la S1P la radioprotection induite par la S1P est levée, puisqu'on observe un taux d'apoptose de $96,8 \pm 8,8$ % par rapport au contrôle 15 Gy (Figure 65).

Ces résultats obtenus par test de comptage cellulaire et par marquage TUNEL montrent que la radio-protection induite par la S1P semble passer par les récepteurs S1Ps, puisque l'utilisation de la TP lève cette protection.

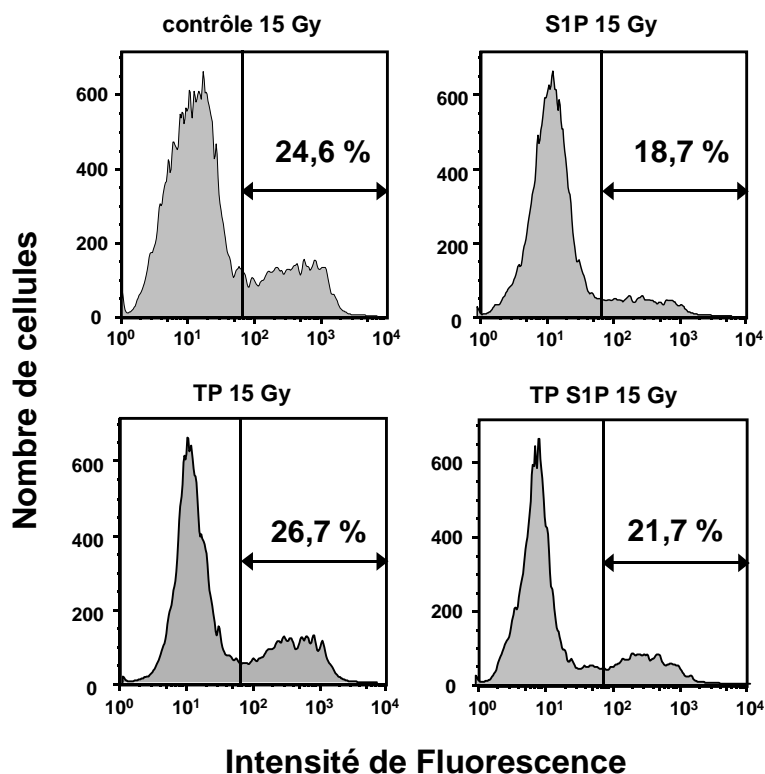


Figure 65: Détermination du nombre de cellules apoptotiques réalisée par cytométrie en flux en utilisant le test TUNEL 24 h après une irradiation à 15 Gy. Les HMEC-1 ont été traitées soit par la TP 100 ng/ml, la S1P 1 μ M, les deux ou le contrôle. Les images d'une expérience représentative parmi 4 expériences indépendantes sont figurées.

IV.2. Etudes *in vivo*

Tout comme pour nos études *in vitro* sur le modèle cellulaire HMEC-1, nous avons voulu vérifier que la protection de la mort radioinduite des cellules endothéliales médiée par la S1P sur notre modèle *in vivo* passe elle aussi par les récepteurs S1Ps. Pour cela, nous avons injecté les souris C57Bl/6 au niveau du péritoine avec 1 μ g/injection de TP, 2 h et 30 min avant l'irradiation corporelle totale, et 5 min et 2 h après (Figure 66).

L'observation des courbes de survie des souris après irradiation corporelle totale à 15 Gy montre que le traitement à la TP ne change pas la mortalité des souris par rapport au contrôle. Comme nous l'avions déjà observé auparavant, la totalité des souris irradiées à 15 Gy meurent en 7 jours, avec une médiane de survie à 6 jours. Pour les souris traitées à la TP 100 % meurent en 7 jours avec une médiane de survie à 5 jours (Figure 66). Les souris traitées avec la S1P voient leur médiane de survie retardée de 2 jours, elle est en effet à 8 jours, et la totalité des souris meurent 10 jours après irradiation (Figure 66), ce qui confirme nos observations précédentes. Enfin lorsque les souris reçoivent les injections de TP et de S1P le

retard de la mortalité observé chez les souris injectées à la S1P seule est diminué, puisque la totalité des souris meurt au bout de 9 jours, avec une médiane de survie de 6 jours (Figure 66).

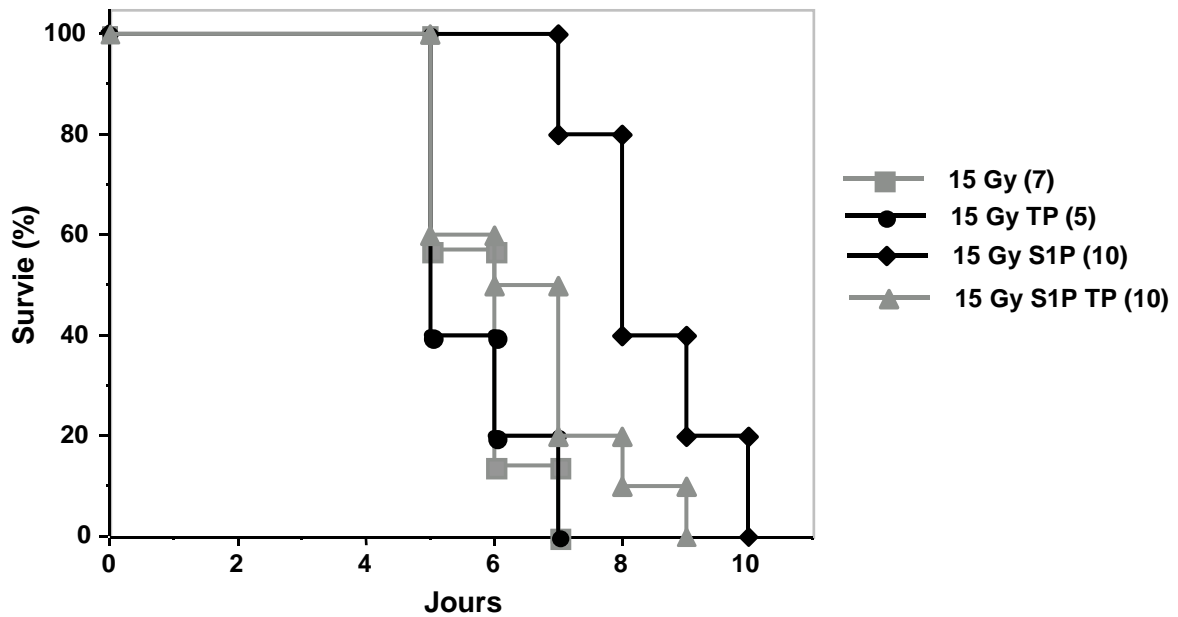


Figure 66: Courbes de survie des souris C57Bl/6 après une irradiation corporelle totale à 15 Gy. Les souris sont injectées au niveau intra-péritonéale 2 h, 30 min avant l'irradiation, et 5 min et 2 h après par 1 µg/injection de TP, ou 30 min avant et 5 min après irradiation avec 100 µg/injection pour la S1P, ou par le contrôle.

Ces résultats montrent que la protection des souris contre la mort induite par l'apoptose des cellules endothéliales intestinales semble majoritairement passer par les récepteurs à la S1P.

IV.3 Conclusion

Nous avons montré *in vitro* sur HMEC-1 et *in vivo* sur un modèle murin de souris C57Bl/6 que la S1P inhibe l'apoptose radioinduite des cellules endothéliales, et que cette protection semble médiée par la signalisation induite par les récepteurs membranaires S1Ps. En ce qui concerne les cellules HMEC-1, nous avons établi par RT-PCR (Reverse Transcription) et Western Blot que les récepteurs impliqués dans cette signalisation sont les S1P₁, S1P₂ ou S1P₃, ou une combinaison de 2 ou de 3 de ces récepteurs.

DISCUSSION

I IMPORTANCE DU MODELE D'ETUDE DE LA RADIOSENSIBILITE DES CELLULES ENDOTHELIALES

Ce projet se propose d'étudier la radiosensibilité des cellules endothéliales. Le choix des modèles d'étude s'est appuyé sur le rôle essentiel joué par les cellules endothéliales dans l'intégrité tissulaire, et dans le développement tumoral après une irradiation à forte dose unique. L'intégrité tissulaire est fortement dépendante de la microvascularisation. Les dysfonctionnements engendrés par la dérégulation radioinduite des cellules endothéliales peuvent être à l'origine de nombreuses pathologies [Gaugler, 2005; Menendez *et al.*, 1998]. De plus, des expériences réalisées *in vivo* ont montré que l'intégrité de la microvascularisation permet le maintien de la régulation du SNC ainsi que de la barrière hémato-encéphalique [Li *et al.*, 2003 ; Pena *et al.*, 2000]. L'inhibition de l'apoptose de la microvascularisation après irradiation empêche le développement de dysfonctionnements pulmonaires sévères et la mort de l'animal [Fuks *et al.*, 1994], ou le développement du SGI [Paris *et al.*, 2001]. La radiosensibilité des cellules endothéliales de microvaisseaux est différente de celle des cellules endothéliales de macrovaisseaux [Dimitrievich *et al.*, 1984]. Afin d'être le plus exhaustif possible au niveau de notre étude sur la radiosensibilité des cellules endothéliales qui induit des perturbations au niveau de l'organisme, nous avons donc développé un modèle *in vitro* de cellules endothéliales isolées à partir de microvaisseaux humains.

Dans un organisme adulte sain, le renouvellement des cellules endothéliales est un phénomène très limité, puisqu'une cellule sur mille cycle à un temps donné [Engerman *et al.*, 1967; Hobson and Denekamp, 1984]. Au contraire, en ce qui concerne les cellules endothéliales du micro-environnement tumoral, ces cellules ont un fort pouvoir prolifératif induit par des facteurs pro-angiogéniques sécrétés par la tumeur. En effet, au cours de la tumorigenèse les cellules tumorales produisent constitutivement des régulateurs positifs de l'angiogenèse qui conduisent à une croissance incontrôlée des cellules endothéliales [Folkman, 1995b]. Les radiations induisent des dysfonctionnements microvasculaires non seulement au niveau des cellules endothéliales des tissus sains [Paris *et al.*, 2001], mais aussi au niveau de la microvascularisation tumorale [Garcia-Barros *et al.*, 2003]. Ainsi, nos deux modèles ont une réelle importance dans l'étude de la radiosensibilité des cellules endothéliales en fonction de leur état physiologique. Notre modèle *in vitro* de cellules endothéliales HMEC-1 nous permet d'étudier l'impact des radiations au niveau de cellules

endothéliales en fonction de leur avancée dans le cycle cellulaire, ce qui nous permet de discriminer les événements induits avant et après mitose. Notre modèle *in vivo* murin nous permet d'étudier l'effet radioinduit au niveau des cellules endothéliales quiescentes, validant ainsi les observations réalisées sur les HMEC-1 avant mitose.

L'étude comparative de la mort radioinduite des cellules endothéliales au niveau de ces deux modèles nous permet d'avoir un aperçu représentatif de l'implication de la mort des cellules endothéliales dans la rupture de l'intégrité tissulaire, que ce soit au niveau d'un endothélium sain, et donc non prolifératif, ainsi que dans un endothélium angiogénique, comme pour l'endothélium tumoral.

L'étude de la radiosensibilité au niveau des cellules HMEC-1 a été effectuée dans deux conditions de milieu : un milieu riche complétement en sérum et en facteurs de croissance (MC), et le même milieu appauvri en sérum et en facteurs de croissance (MA). Ces études nous ont permis de mettre en évidence que la constitution du milieu de culture induit une protection différentielle des cellules endothéliales contre l'apoptose radioinduite. Ainsi, dans les six premières heures qui suivent l'irradiation, une mort par apoptose n'apparaît que lorsque les cellules sont cultivées en MA, tandis que 24 h post-irradiation, l'apoptose est mise en évidence dans les deux conditions de milieu de culture. Cependant, le taux de mort reste plus élevé en MA qu'en MC. La déprivation du milieu de culture en facteurs de croissance a déjà été utilisée afin d'étudier la radiosensibilité des cellules endothéliales. Ainsi, Langley et ses collaborateurs ont montré qu'une dose d'irradiation à 10 Gy induisait 44,3 % d'apoptose dans les cellules endothéliales de microvaisseaux bovins lorsqu'elles étaient déprivées en bFGF, tandis que 19,8 % d'apoptose étaient observés en présence de bFGF [Langley *et al.*, 1997]. De la même façon, une étude menée *in vitro* et *in vivo* a montré que le bFGF protège les cellules endothéliales de la mort programmée radioinduite [Fuks *et al.*, 1994]. En ce qui concerne notre modèle d'étude, nous avons mis en évidence que l'apoptose radioinduite des HMEC-1 est 2,5 fois plus importante 6 h après une irradiation à 15 Gy en MA qu'en MC, et que 24 h post-irradiation, elle est 1,2 fois plus importante. Il semble que cette protection soit due à l'existence de deux voies médiées par l'EGF et par les facteurs de croissance présents dans le sérum pour le temps 6 h, tandis que pour le temps 24 h cette protection serait uniquement médiée par un composant du sérum. Les processus de radioprotection observés aux deux temps sont donc différents. Le fait que l'EGF permette de diminuer la mort radioinduite à 6 h mais pas à 24 h nous laisse penser qu'il s'agit peut-être d'un retard de la mort, et non d'une inhibition à 6 h. L'EGF a en effet été montré comme étant un facteur

mitogène important pour une variété de cellules en culture d'origine ectodermique et mésodermique [Carpenter and Cohen, 1979], et son effet radio-protecteur au niveau des cellules endothéliales a été démontré. En effet, l'inhibition des récepteurs EGF par des TKI ou par des AcMo inhibe la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses en ciblant directement ces cellules, mais aussi en inhibant l'angiogenèse tumorale [Fan *et al.*, 1997; Kiyota *et al.*, 2002; Magne *et al.*, 2003; Petty *et al.*, 2004]. De plus, le sérum contient de nombreux facteurs de croissance qui peuvent être impliqués dans l'induction de voies de signalisation pro-survie, allant à l'encontre de l'effet apoptotique attendu des radiations. Ainsi, certains groupes déprivent les milieux de culture en sérum afin de pouvoir étudier la radiosensibilité des cellules endothéliales [Teichert-Kuliszewska *et al.*, 2006]. Le sérum contient entre autres des sphingolipides tels que la S1P. Afin d'étudier la modulation de l'apoptose radioinduite des cellules endothéliales par la S1P, il nous était nécessaire de dépriver le milieu de culture en sérum afin de pouvoir étudier l'impact de l'ajout de S1P dans ce milieu. En effet, la concentration de S1P dans le plasma humain est de 200 nM, et la concentration sérique atteint 500 nM [Yatomi *et al.*, 2001]. En ce qui concerne le sérum bovin que nous utilisons à 15 % dans notre milieu, il est constitué de 340 nM de S1P [Edsall and Spiegel, 1999]. La concentration en S1P du MC est donc d'environ 51 nM. Ainsi, la protection apporté par le MC contre l'apoptose radioinduite des HMEC-1 après 15 Gy peut être due entre autre à la présence de S1P dans le sérum. L'ajout de S1P à 1 μ M dans le MA permet de diminuer l'apoptose radioinduite d'un facteur 2 24 h après l'irradiation. Le taux d'apoptose observé en MA additionné de S1P est inférieur à celui observé 24 h après irradiation en MC ($15,3 \pm 3,4$ % versus $26,8 \pm 3,3$ %). Ceci peut s'expliquer par le fait que la S1P ajoutée au MA est à une concentration finale de 1 μ M, tandis que la S1P présente dans le MC est à une concentration finale d'environ 51 nM. Cependant, nous ne pouvons pas éliminer l'hypothèse que la protection apporté par le MC ne dépende pas seulement de la S1P présente dans le milieu, mais aussi d'autres cytokines pro-survie présentes dans le sérum. En effet, les voies de protection médiées par les facteurs de croissance ont des connexions étroites. Par exemple l'EGF ou le PDGF, dans certains types cellulaires, activent la SphK, induisant ainsi la synthèse de S1P [Pyne and Pyne, 2000].

Dans un organisme, les cellules endothéliales sont directement en contact avec le sang, soit avec le plasma puisqu'il constitue la partie liquide du sang qui reste après séparation des cellules sanguines. Par rapport au sérum, le plasma contient en plus des facteurs de coagulation. Le plasma constitue environ 40 % de la fraction sanguine, ce qui est plus que pour les cellules en culture puisque les HMEC-1 sont cultivées dans un milieu additionné de

15 % de sérum. Cependant, la S1P contenue dans le plasma murin ne suffit pas pour radio-protéger les cellules endothéliales intestinales puisqu'il faut deux injections de 100 µg de S1P (soit une concentration finale de 105 µM) afin d'empêcher l'apparition du SGI.

Ainsi, le fait que l'addition exogène de S1P lève la radiosensibilité des cellules endothéliales in vitro et in vivo nous permet de penser que ce sphingolipide pourrait être utilisé à des fins cliniques en radioprotection des tissus sains au cours de traitements radiothérapeutiques.

Malgré l'existence de plusieurs lignées de cellules endothéliales primaires, nous avons choisi de travailler avec les cellules HMEC-1 pour des raisons pratiques de culture cellulaire. Les HMEC-1 sont immortalisées avec l'Ag grand T du virus SV40. Cet Ag grand T inactive p53 et peut ainsi modifier l'apoptose induite par les dommages de l'ADN et l'arrêt du cycle cellulaire. Cependant des études ont mis en évidence que l'apoptose médiée par l'aSMase et le céramide impliquée dans l'endothélium microvasculaire était indépendante du statut p53. A la différence de l'inactivation du gène de l'*asmase*, l'inactivation de *p53* dans des souris ne modifie ni l'apoptose radioinduite des cellules endothéliales de la lamina propria des cryptes intestinales, ni la nécrose de l'intestin et la mort de l'animal [Paris *et al.*, 2001]. Notre première vague de mort des HMEC-1 dépend de l'activation de l'aSMase et de la génération du céramide, qui ne sont pas connus pour interférer avec l'inactivation des cellules par SV40. La mort mitotique apparaît après un blocage en G₂ du cycle cellulaire. Si p53 est connue pour réguler le cycle cellulaire après irradiation, spécialement en induisant un arrêt en phase G₁ par l'augmentation de l'expression de p21, différentes études montrent également que l'apoptose induite par les rayons X qui apparaît après un blocage en G₂ peut être indépendante de p53 [Chang and Little, 1991; Iwamoto *et al.*, 1999; Shinomiya, 2001]. Nos résultats obtenus dans les cellules HMEC-1 immortalisées par SV40 ont été validés au laboratoire en reproduisant ces expériences avec des cellules endothéliales primaires de macrovaisseaux HAEC. Ainsi, la S1P protège les cellules HAEC de la première vague de mort due à la toxicité des radiations à 24 h (25,1 ± 2 % pour les cellules contrôles contre 16,7 ± 1,5 % pour les HAEC traitées avec la S1P), mais pas de la seconde vague de mort observée à 72 h (25,1 ± 4,3 % pour les cellules contrôles contre 24,1 ± 5 % pour les HAEC traitées avec la S1P) (Figure 67).

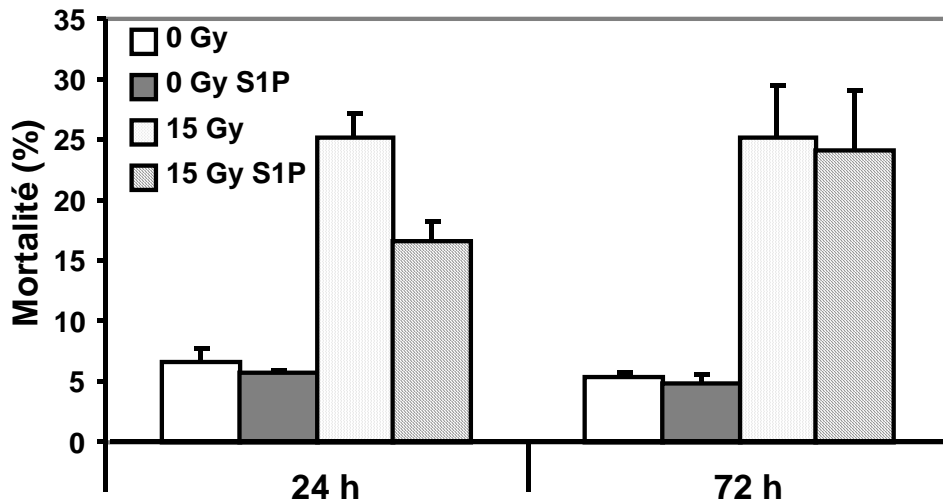


Figure 67: Pourcentages de cellules apoptotiques obtenus par comptage cellulaire des HAEC irradiées à 15 Gy contrôle (histogrammes pointillés) ou traitées avec 1 μ M de SIP (hachurés) 24 h ou 72 h après l'exposition. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM de 2 expériences indépendantes réalisées en triplicate.

Les observations réalisées dans notre modèle murin confirment ces résultats. La S1P empêche l'apparition du SGI en inhibant l'apoptose radioinduite des cellules endothéliales de l'intestin des souris de phénotype $p53^{+/+}$. Cependant, les souris meurent plus tardivement suite à une aplasie médullaire.

Ces résultats confirment que la première vague de mort dépendante de la voie aSMase/céramide n'interfère pas avec la protéine p53, puisqu'elle apparaît dans des cellules en culture invalidées pour p53, ainsi que dans l'endothélium de souris sauvages pour le gène p53.

Afin d'étudier la radiosensibilité des cellules endothéliales nous avons choisi de travailler avec une dose relativement forte (15 Gy), tant au niveau de notre modèle *in vitro* qu'*in vivo*. En ce qui concerne notre modèle de cellules endothéliales HMEC-1, ce choix s'est justifié par l'observation faite sur la différence de radiosensibilité observée à cette dose entre les cellules maintenues en MC ou en MA pendant et après l'irradiation. De plus, une telle dose avait déjà été utilisée dans d'autres modèles d'étude *in vivo* de la radiosensibilité des cellules endothéliales [Garcia-Barros *et al.*, 2003; Paris *et al.*, 2001]. Cette dose forte unique s'oppose aux plus faibles doses répétées utilisées en radiothérapie. En effet, le fractionnement de dose (1,5-3 Gy/jour) est utilisé majoritairement afin de diminuer les effets délétères sur les tissus sains. Cependant, les observations réalisées au cours de ma thèse, mais aussi celles mises en évidence par Paris, Garcia-Barros ou encore Ch'ang et collaborateurs ont une réelle

implication au niveau de la réévaluation des traitements de radiothérapie effectuée à ce jour [Ch'ang *et al.*, 2005; Garcia-Barros *et al.*, 2003; Paris *et al.*, 2001]. La technique appelée parfois « radiochirurgie », « stéréotaxie » ou encore « gamma knife » qui utilise de fortes doses (15-25 Gy) a été utilisée pour la première fois dans le cas de traitements de malformations artérioveineuses, mais aussi pour des métastases du cerveau [Andrews *et al.*, 2004]. Actuellement, ces fortes doses sont utilisées pour le traitement de tumeurs primaires des ovaires ou de la thyroïde [Hasanzadeh *et al.*, 2006], ainsi que certaines formes oligométastatiques du cerveau, de l'os ou encore du foie [Yin *et al.*, 2006].

Afin de pouvoir comprendre les implications biologiques associées à l'utilisation de fortes doses en radiothérapie, il était donc intéressant d'étudier la radiosensibilité des cellules endothéliales à 15 Gy.

II IMPORTANCE DE LA MISE EN EVIDENCE DE DIFFERENTS TYPES DE MORT RADIOINDUITE DES CELLULES ENDOTHELIALES : IMPLICATION DE LA SIP

L'impact de la radiosensibilité des cellules endothéliales dans les dommages du tissu sain et dans la régression tumorale après de fortes doses d'irradiation a été décrit [Cho *et al.*, 2004; Garcia-Barros *et al.*, 2003; Paris *et al.*, 2001]. Les cellules endothéliales confluentes meurent après irradiation d'une voie dépendante de la génération du facteur pro-apoptotique céramide [Haimovitz-Friedman *et al.*, 1994b]. Cependant, si la mort mitotique représente la voie de signalisation la plus établie après irradiation pour la plupart des cellules eucaryotes en division, l'importance de la mort mitotique dans la radiosensibilité des cellules endothéliales en prolifération n'a pas été clairement démontrée à ce jour. La seule étude publiée démontre qu'un traitement combiné angiostatine et radiation induit la mort mitotique de cellules HUVEC et HAEC en culture [Hari *et al.*, 2000]. Cependant, cette étude a été effectuée par test de clonogénicité, qui reflète plus la capacité de prolifération cellulaire que la mort cellulaire. Les tests de clonogénicité ne renseignent pas sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse aux radiations, ni sur le type de mort impliqué. Ainsi, mon travail de thèse montre que les cellules endothéliales en prolifération meurent de deux types de mort radioinduite : une apoptose précoce dépendante du céramide, ainsi qu'une mort mitotique tardive dépendante des dommages de l'ADN (Figure 68).

Le test de comptage cellulaire, ainsi que les marquages Apo2.7 et TUNEL des cellules HMEC-1 irradiées montrent que la radiosensibilité des HMEC-1 est composée de deux vagues : la première de 0 à 24 h après irradiation dépend de l'activation de l'aSMase et de la génération du céramide, puisqu'un traitement avec la désipramine est capable d'inhiber cette mort endothéliale précoce. La seconde vague de mort qui apparaît 24 h après irradiation est insensible à la désipramine, et est donc indépendante de la voie apoptotique aSMase/céramide. L'étude des aberrations chromosomiques et de la formation des micronoyaux corrèle la seconde vague de mort à la génération de dommages de l'ADN et à la mort mitotique. Cette implication a été démontrée par l'utilisation du nocodazole, qui, en empêchant les cellules de poursuivre leur mitose, retarde cette mort mitotique (Figure 68).

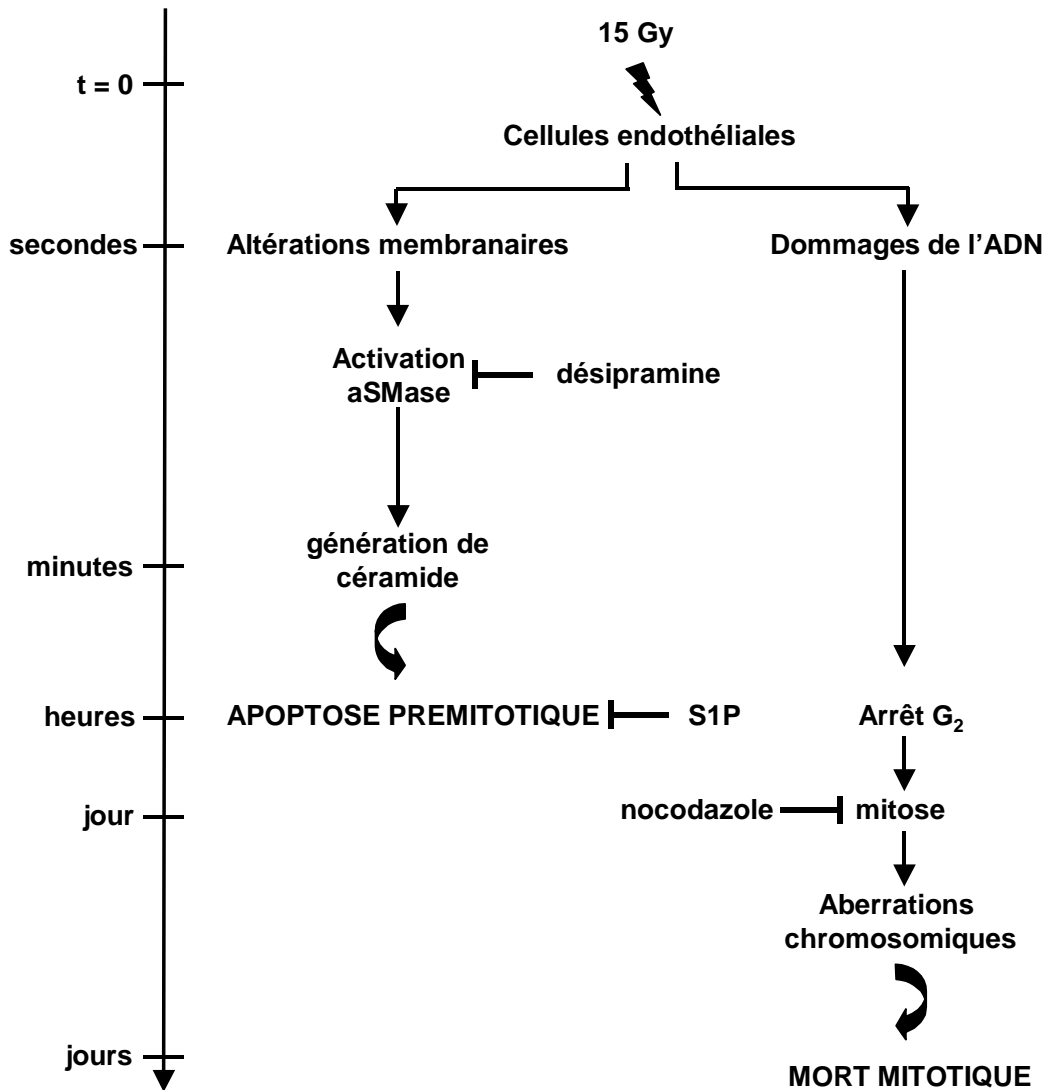


Figure 68: Schéma des événements moléculaires qui induisent l'apoptose prémitotique médiée par le céramide et la mort mitotique dépendante des dommages de l'ADN.

Le prétraitement des HMEC-1 avec la S1P protège les cellules de l'apoptose précoce dépendante de la génération du céramide induite par les radiations, mais pas de la mort mitotique tardive, dépendante des dommages de l'ADN. De plus, l'action de la S1P dans les cellules HMEC-1, mais aussi dans le modèle *in vivo*, semble spécifique non seulement des récepteurs S1Ps, mais aussi de la S1P elle-même. En effet, le LPA, ligand de certains récepteurs de la famille EDG auxquels appartiennent les récepteurs S1Ps, n'induit pas de radioprotection, ni la dhS1P qui interagit directement avec les récepteurs S1Ps (Figures 38 et 59). Une fonction clé de la S1P est de médier la croissance vasculaire en augmentant la prolifération des cellules endothéliales. Cette action proproliférative pourrait expliquer son activité radioprotectrice. Ce mécanisme de survie a déjà été montré par l'utilisation de la

lovastatine, un inhibiteur de l'hydroxyméthylglutaryl Co A réductase, une enzyme impliquée dans la biosynthèse du cholestérol. La lovastatine inhibe la radiosensibilité des HUVEC dans les temps tardifs après irradiation en induisant une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales [Nubel *et al.*, 2006]. Nos résultats utilisant l'incorporation de ³H-thymidine ou les études d'indices mitotiques montrent que la protection par la S1P n'est pas due à une augmentation de la prolifération (Figures 50 et 51). De plus, les tests de comptage cellulaire, ainsi que les marquages Apo2.7 et TUNEL qui mettent en évidence l'apoptose, confirment définitivement que la S1P induit réellement une diminution de cette apoptose radioinduite (Figures 35, 36 et 37). Nos résultats sont donc en accord avec le dogme du « rhéostat céramide/S1P » qui détermine l'état de survie ou de mort d'une cellule exposée à un stress léthal [Maceyka *et al.*, 2002]. De plus, nos résultats *in vitro* et *in vivo* sont les premiers à mettre en évidence l'implication pharmacologique de la S1P dans la modulation de l'apoptose des cellules endothéliales microvasculaires après une exposition à de fortes doses d'irradiation, et pour la première fois, nous avons procédé à des injections systémiques de S1P *in vivo*. En effet, les résultats sur la protection des ovocytes par la S1P ont été obtenus par injection localisée dans les ovaires [Hancke *et al.*, 2006 ; Morita *et al.* 2000; Paris *et al.*, 2002].

Afin de comprendre l'absence de protection par la S1P au niveau de la mort mitotique, nous nous sommes interrogés sur l'interaction de la S1P avec la voie induite par les dommages de l'ADN. Nous avons donc étudié la diminution du taux de phosphorylation de l'histone H2AX au niveau des dommages de l'ADN [MacPhail *et al.*, 2003]. Les cellules traitées ou non avec la S1P expriment le même pourcentage de cellules ayant des foyers γ H2AX, et le même taux de foyers par cellule. Ceci prouve que le traitement avec la S1P n'a pas d'impact au niveau du taux de dommages de l'ADN induits par les radiations, ni au niveau de l'induction de la machinerie de réparation des DSBs (Figure 45 et Tableau 8). Lorsque les dommages de l'ADN sont insuffisamment ou mal réparés, ces dommages peuvent conduire à des aberrations chromosomiques telles que des délétions ou des translocations [Dasika *et al.*, 1999]. Nous avons donc étudié le pourcentage de cassures chromosomiques induites par les radiations en fonction de la dose d'irradiation. Le traitement par la S1P ne modifie ni le taux ni le type de cassures induites par l'irradiation, quelle que soit la dose observée (Figure 47 et Tableau 9). Les aberrations chromosomiques, l'apparition de micronoyaux ainsi que la régulation du cycle cellulaire validés dans notre modèle HMEC-1 sont des paramètres cruciaux dans la mort mitotique [Roninson *et al.*, 2001]. De plus, la mort

mitotique nécessite un blocage transitoire en phase G₂ du cycle cellulaire ainsi qu'une période assez longue (plus de 24 h) avant que la mort cellulaire ait lieu, contrairement à l'apoptose prémitotique [Shinomiya, 2001]. Comme il a déjà été montré par Khodarev et collaborateurs pour les cellules HMEC-1 [Khodarev *et al.*, 2004], nous avons mis en évidence par marquage IP un blocage en phase G₂/M du cycle cellulaire (Figures 30 et 52). La mort mitotique est connue pour être retrouvée dans la plupart des lignées non hématopoïétiques. Ainsi, l'implication de la mort mitotique dans les cellules endothéliales en prolifération après irradiation a été très peu décrite, à l'exception de l'étude où les cellules endothéliales sont irradiées après un traitement à la lovastatine [Nubel *et al.*, 2006].

Le fait de moduler la mort précoce dépendante du céramide par la S1P et la mort tardive dépendante des dommages de l'ADN par le nocodazole montre que ces deux voies de mort sont bien distinctes. Comparé aux cellules témoins, le prétraitement des cellules HMEC-1 avec la S1P ne diminue pas le taux de micronoyaux. Ces micronoyaux sont un indicateur de la mort mitotique, ce qui explique qu'ils apparaissent dans une forte proportion 48 h après irradiation dans les 2 conditions. La différence observée dans la mort tardive et dans le taux de micronoyaux (Figures 54 et 55) entre les conditions nocodazole et nocodazole + S1P peut s'expliquer par le fait que la S1P et le nocodazole ont une protection additive, tandis que le nocodazole empêche ou retarde seulement la mort mitotique tardive des HMEC-1. D'autres études ont déjà montré que la S1P protège les cellules contre des agents génotoxiques [Cuvillier *et al.*, 1996; Morita *et al.*, 2000; Ojala *et al.*, 2004; Paris *et al.*, 2002]. Cependant, aucune de ces études n'a discriminé la protection due à une inhibition de l'apoptose médiée par le céramide, de la mort induite par les dommages de l'ADN.

De plus, le céramide est généré après irradiation dans des cellules en prolifération, comme le montrent nos études avec la désipramine sur les HMEC-1, mais aussi dans des cellules quiescentes [Li *et al.*, 2003; Paris *et al.*, 2001; Pena *et al.*, 2000; Santana *et al.*, 1996], ce qui est validé par la protection induite par la S1P au niveau de l'endothélium murin dans notre modèle. Ainsi, nos résultats montrent que le céramide est généré en réponse aux radiations dans les cellules endothéliales, quel que soit leur état prolifératif.

Nos études sur les cellules endothéliales en prolifération après irradiation sont les premières qui mettent en évidence l'intervention de deux voies de signalisation induisant deux types de mort cellulaire après irradiation. De plus, nos résultats montrent que la radioprotection médiée par la S1P est spécifique de la voie de mort induite par les dommages à la membrane. Elle ne fait pas intervenir un mécanisme impliquant une interaction avec la machinerie de réparation de l'ADN ou la modulation du cycle cellulaire.

III RELATION ENTRE LA VOIE RADIOINDUITE DU CERAMIDE ET CELLE DES DOMMAGES DE L'ADN

La mort cellulaire radioinduite résulte principalement des dommages induits au niveau de deux cibles cellulaires: l'ADN et la membrane. Cependant, les voies par lesquelles chacune de ces cibles contribue à une cytotoxicité dépendante des radiations et comment ces signaux issus des deux cibles sont intégrés au niveau moléculaire restent encore flou. Les premières études qui émettent la possibilité d'une interaction entre ces deux voies datent de 1977 [Alper, 1977] où des études sur l'oxygène mettent en évidence que les interactions entre les dommages de la membrane nucléaire et ceux de l'ADN jouent un rôle dans la réponse aux radiations. En parallèle, l'hypothèse opposée selon laquelle les dommages de l'ADN constituent le signal critique de la mort cellulaire radioinduite était confortée par des études comme celles réalisées sur la lignée CHO montrant que ces cellules sont insensibles à l'iode 125 présent dans les membranes par rapport à leur forte sensibilité lorsque l'iode 125 est associé à l'ADN [Warters *et al.*, 1978]. L'implication de la réparation des dommages de l'ADN dans la radiosensibilité cellulaire favorise la théorie de l'ADN en tant que cible primaire des radiations. La relation entre la radiosensibilité et la rapidité avec laquelle l'apoptose est induite après irradiation dans de nombreuses lignées lymphoïdes et myéloïdes humaines et murines a été rapportées [Aldridge and Radford, 1998; Radford, 1994]. L'augmentation de la radiorésistance de lignées cellulaires qui subissent une apoptose tardive semble être due à un temps plus long nécessaire dans la réparation des dommages de l'ADN avant une possible activation de l'apoptose au niveau des points de contrôle du cycle cellulaire [Radford and Murphy, 1994]. Un arrêt plus long aux points de contrôle permet une meilleure réparation des dommages de l'ADN. En plus de la réparation de l'ADN, la protéine p53 est impliquée dans la radiosensibilité cellulaire et dans la rapidité de l'induction de l'apoptose dans de nombreux types cellulaires, apportant ainsi une autre preuve de l'implication du rôle central de l'ADN en tant que cible primaire des radiations. Des études menées sur des souris invalidées pour le gène *p53* montrent que l'induction rapide par l'irradiation de l'apoptose des thymocytes, des cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal ou encore de spermatogonies [Radford, 1999] est dépendante de la présence d'une protéine p53 sauvage. Ainsi, la protéine p53 a un rôle crucial au niveau de la radiosensibilité cellulaire [El-Deiry, 2003]. La protéine DNA-PK est aussi impliquée dans la radiosensibilité cellulaire.

En effet, des cellules déficientes pour les sous-unités DNA-PKcs ou Ku sont incapables de réparer les DSBs de l'ADN par le mécanisme de NHEJ et sont donc hypersensibles aux radiations [Jackson and Jeggo, 1995]. D'autres protéines telles que ATM sont impliquées dans la radiosensibilité. ATM est une PI3K qui régule de nombreuses voies de signalisation en phosphorylant des cibles spécifiques qui régulent la progression au niveau des points de contrôle du cycle cellulaire [Shiloh, 2001]. Ainsi, ATM est impliquée dans la radiosensibilité des patients atteints de la maladie Ataxia Telangiectasia qui présentent une mutation pour la protéine.

Depuis les dix dernières années, pourtant, un grand nombre d'études appuie l'hypothèse de la membrane cellulaire en tant que cible des radiations. La plupart de ces études sont basées sur la production et la voie de transduction du signal d'un second messager, le céramide. En 1994, Haimovitz-Friedman et collaborateurs mettent en évidence que les radiations induisent une augmentation de céramide après l'irradiation de préparations membranaires, confortant l'hypothèse que cette génération est indépendante des dommages de l'ADN [Haimovitz-Friedman *et al.*, 1994b]. Ces résultats furent confirmés par le fait que la combinaison de préparations membranaires irradiées avec le cytosol et les noyaux de cellules non irradiées induit l'apoptose [Pena *et al.*, 1997]. D'autres observations furent basées sur la génération de céramide après de nombreux stress tels que TNF- α , Fas ou encore les radiations induisant l'activation de l'aSMase ou des nSMases, et une augmentation de la concentration intracellulaire de céramide [Hannun, 1996]. Ainsi, de nombreuses cibles du céramide ont été mises en évidence, régulant la différenciation, la prolifération, ou encore l'apoptose [Hannun, 1996 ; Pena *et al.*, 1997]. L'induction de l'apoptose par le céramide semble liée à la stimulation de la voie pro-apoptotique SAPK/JNK [Verheij *et al.*, 1996], et à l'inhibition de la voie anti-apoptotique PI3K/Akt [Zhou *et al.*, 1998]. Ces résultats ont conduit à l'hypothèse que les dommages de la membrane entraînent une apoptose après irradiation et que les dommages de l'ADN ne sont pas impliqués dans ce processus apoptotique [Haimovitz-Friedman *et al.*, 1997b]. Ils ont été confirmés par le fait qu'un clone sélectionné de cellules WEHI-231 qui ne voit pas sa concentration en céramide intracellulaire augmenter après irradiation a un faible taux d'apoptose par rapport à la lignée parentale [Michael *et al.*, 1997]. De nombreux travaux conduisent à la conclusion générale que les radiations entraînent une augmentation de la concentration intracellulaire en céramide dans de nombreuses lignées cellulaires avec un maximum d'augmentation d'environ 50 % entre 2 et 60 minutes post-irradiation, et que cette augmentation est transitoire [Radford, 1999].

Ainsi, tous ces résultats rendent indiscutable le fait que la membrane et l'ADN sont tous les deux impliqués dans la réponse cellulaire aux radiations. Récemment, d'autres études ont mis en évidence un lien probable entre l'implication de la membrane et de l'ADN dans la radiosensibilité. Ainsi, l'expression de la protéine E6 du virus Papilloma qui se lie à p53 et induit sa dégradation protéolytique dans des cellules de lymphome T MOLT-4 inhibe la production de céramide et l'induction de l'apoptose après une irradiation γ à une dose de 5 Gy, tandis que les cellules contrôles ont un fort taux d'apoptose et une concentration en céramide intracellulaire augmentée de 10 fois 24 h après irradiation [Dbaibo *et al.*, 1998]. Les auteurs ont conclu que l'augmentation de la concentration en céramide est une conséquence de l'activation de p53. Elle serait due à l'activation de l'aSMase ou des nSMases, ou encore de la CS par le biais de p53. Le lien entre la protéine p53 et la nSMase a été mis en évidence sur des cellules de fibrosarcome sauvages ou mutées pour la protéine p53, où un traitement à la nSMase diminue la prolifération cellulaire uniquement dans les cellules p53^{-/-} [Pruschy *et al.*, 1999]. Cette hypothèse est en accord avec l'observation du modèle biphasique de la génération du céramide selon lequel une première génération rapide est due à l'activation d'une SMase, et qu'une génération plus tardive est induite par l'activation de la CS qui serait médiée par ATM [Vit and Rosselli, 2003]. D'autres études s'opposent à cette conclusion car il a été montré sur des cellules BAEC que ATM inhibe l'apoptose induite par les dommages de l'ADN en régulant négativement la CS [Liao *et al.*, 1999]. Ch'ang et collaborateurs ont montré que lorsqu'on inhibe l'apoptose des cellules endothéliales intestinales par le bFGF ou génétiquement dans le cas de souris *asmase*^{-/-}, il y a un changement de cible cellulaire et les cellules souches intestinales deviennent alors la cible principale des radiations. En effet, des doses relativement fortes (au-delà de 18 Gy) sont létales pour les souris *asmase*^{-/-}, malgré la résistance de l'endothélium. Dans ce cas, une activation de la CS en réponse à l'irradiation est observée. Dans le cas de doses inférieures à 18 Gy, ATM régule négativement la CS favorisant ainsi la survie des cellules des cryptes intestinales [Ch'ang *et al.*, 2005].

Dans les cellules BAEC, la FB1 bloque la mort induite par les rayons X par l'inhibition de la CS, ce qui fait de la CS une molécule clé intéressante pour expliquer notre deuxième voie de mort [Liao *et al.*, 1999]. Dans notre modèle cellulaire endothélial, la dose maximale tolérée de FB1 ne permet pourtant pas de lever la seconde voie de mort, ce qui indique que l'activation de la CS ne semble pas impliquée dans la mort mitotique radioinduite des HMEC-1. La principale différence entre les études de Liao et les nôtres est le statut prolifératif des cellules endothéliales. Les études d'irradiation sur les BAEC ont été réalisées sur des cellules quiescentes, ce qui exclue la mort mitotique radioinduite, tandis que nos

expériences ont été menées sur des HMEC-1 en prolifération, impliquant ainsi la mort mitotique et ses acteurs moléculaires dans la radiosensibilité des cellules endothéliales. Ainsi, rien dans notre modèle cellulaire ne met en évidence une relation quelconque entre la production de céramide et les dommages de l'ADN impliqués dans la mort mitotique. Nous avons validé le fait que la CS et l'aSMase n'interviennent pas par l'utilisation de FB1 et de désipramine. Cependant, d'autres voies d'induction de la synthèse de céramide restent à explorer. Il pourrait en effet y avoir une activation d'autres SMases telles que la nSMase, ou encore une inhibition d'enzyme impliquée dans la dégradation du céramide. Ainsi, Taha et collaborateurs ont montré que les dommages de l'ADN induisent une inhibition de la SphK dépendante de l'activation de protéases et de p53 [Taha *et al.*, 2004].

Cependant, le fait que la SIP ne permette pas de lever cette seconde voie de mort dépendante des dommages de l'ADN nous conforte dans l'idée que, dans notre modèle d'étude, le céramide n'est pas impliqué dans l'induction de la mort mitotique radioinduite, et donc que le céramide n'interfère pas avec les dommages de l'ADN.

IV PLACE DE LA S1P DANS LE MAINTIEN DE L'INTEGRITE MICROVASCULAIRE DU TISSU SAIN ET TUMORAL

Le métabolisme de la S1P prend une place centrale dans le développement du cancer et dans son traitement [Milstien and Spiegel, 2006]. Une forte expression de SphK1, l'enzyme transformant la sphingosine en S1P dans les cellules tumorales a été corrélée à une diminution de la survie du patient [Van Brocklyn *et al.*, 2005]. En effet, la SphK1 confère une résistance à la chimiothérapie ou à la radiothérapie et active la tumorigenèse dans des souris nude [French *et al.*, 2003]. Une corrélation a été établie entre SphK1 et l'agressivité tumorale [Van Brocklyn *et al.*, 2005]. Son expression est élevée dans de nombreuses tumeurs solides et des inhibiteurs de SphK1 diminuent la croissance tumorale d'adénocarcinomes gastriques ou mammaires [French *et al.*, 2003; French *et al.*, 2006]. Ainsi, la sécrétion chronique de S1P semble jouer un rôle majeur dans la tumorigenèse en protégeant les cellules tumorales et en activant la microvascularisation induite par d'autres facteurs pro-angiogéniques clés [Milstien and Spiegel, 2006] (Figure 69).

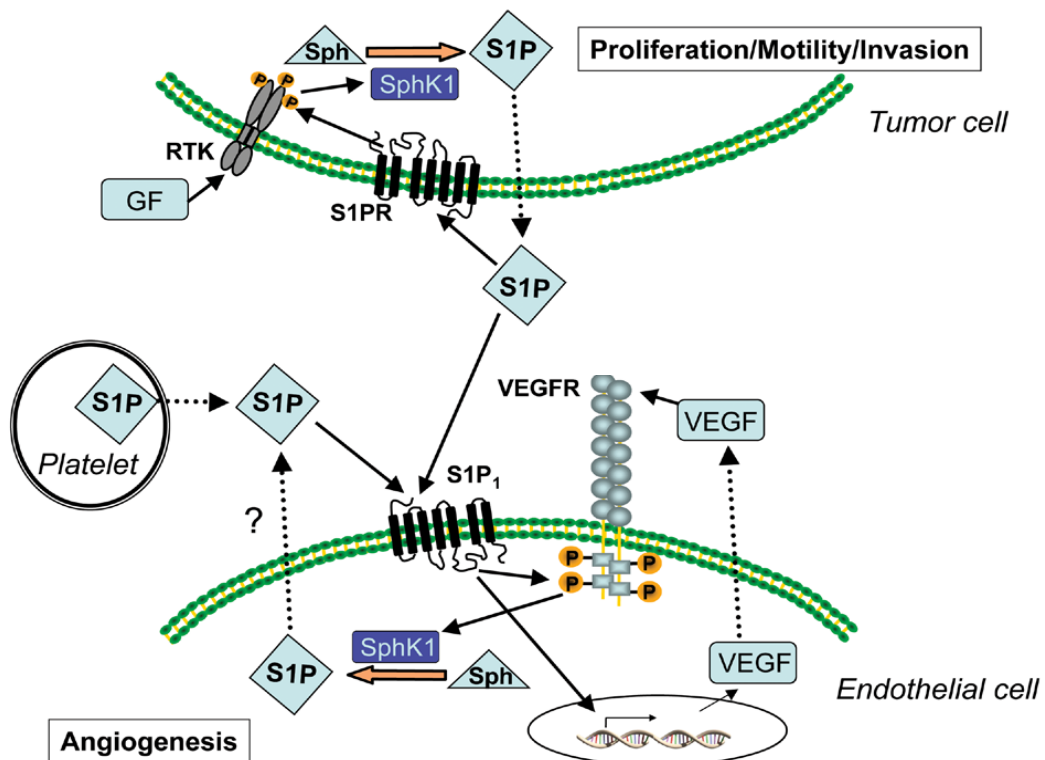


Figure 69: Schéma de l'interaction entre les récepteurs S1P et les récepteurs aux facteurs de croissance et pro-angiogéniques, pouvant conduire à une amplification de signaux importants pour la tumorigenèse et l'angiogenèse. GF: facteur de croissance [Milstien and Spiegel, 2006].

Il existe des boucles d'amplification du signal induit les récepteurs aux facteurs de croissance et la S1P. En effet, l'EGF, le PDGF ou le VEGF activent la SphK1 et permettent sa translocation à la membrane plasmique, induisant une sécrétion locale de S1P [Pitson *et al.*, 2005], et l'activation de récepteurs S1Ps [Spiegel and Milstien, 2003] tels que S1P₁ qui joue un rôle critique dans l'angiogenèse et la maturation vasculaire [Liu *et al.*, 2000b].

Le rôle du récepteur S1P₁ dans l'angiogenèse tumorale a été mis en évidence par l'inhibition de son expression au niveau des néovaisseaux tumoraux sur un modèle murin par la technique de l'interférence ARN. Le fait d'empêcher l'expression de S1P₁ diminue la stabilisation vasculaire et l'angiogenèse tumorale, induisant ainsi une diminution de la croissance tumorale *in vivo* [Chae *et al.*, 2004]. L'activation de S1P₁ par la S1P peut aussi augmenter la production de PDGF ou VEGF, conduisant à une transactivation des récepteurs aux facteurs de croissance activant ensuite le remodelage vasculaire et la mobilité cellulaire. Cependant, il a fallu attendre les travaux de Visentin et collaborateurs pour mettre réellement en évidence que la S1P joue un rôle critique au niveau de la croissance tumorale, de l'invasion métastatique et de l'angiogenèse. La neutralisation par un Ac spécifique de la S1P physiopathologique sécrétée par les cellules cancéreuses et les plaquettes du sang retarde la croissance tumorale en empêchant l'angiogenèse tumorale, mais aussi en inhibant la prolifération et la migration des cellules tumorales [Visentin *et al.*, 2006]. Ceci a été montré sur des modèles multirésistants tels que des carcinomes pulmonaires, des mélanomes ou encore des cancers ovariens. Pour des carcinomes pulmonaires inférieurs à 400 mm³, 62 et 40 % voient leur volume diminuer, et 58 % dans le cas de tumeurs entre 700 et 800 mm³. Dans le cas des cancers ovariens, 40 % des souris nude ont une disparition de la tumeur, et 60 % ont une diminution du volume de leur tumeur d'un facteur 3. Ces résultats sont similaires à ceux observés dans le cas de l'utilisation d'un Ac anti-VEGF sur le même type de tumeurs [Gossmann *et al.*, 2000], et sont partiels. Les auteurs ont conclu que le mécanisme principal joué par l'Ac anti-S1P est d'empêcher les effets pro-angiogéniques de la S1P circulante. Ils observent en effet une diminution de la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques par la tumeur tels que l'IL-8, l'IL-6 ou encore le VEGF.

Suite à ces observations, nous pouvons nous interroger sur l'impact que pourrait avoir la S1P exogène au niveau de la prolifération tumorale dans le cas d'une utilisation afin de protéger les tissus sains au cours d'un traitement de radiothérapie. Mes travaux de thèse ont mis en évidence que la radioprotection induite par la S1P est spécifique de l'apoptose des cellules endothéliales médiée par le céramide. En effet, dans le cas d'une mort mitotique médiée par les dommages de l'ADN radioinduits, la S1P ne permet pas d'inhiber cette mort

des cellules endothéliales en prolifération. Ceci semble prometteur afin de permettre l'augmentation de la radioprotection au niveau pharmacologique des tissus sains. En effet, dans un organisme adulte normal le système vasculaire est constitué de cellules endothéliales quiescentes [Hobson and Denekamp, 1984] puisqu'un équilibre se crée entre les facteurs qui induisent l'angiogenèse et ceux qui l'inhibent [Carmeliet, 2005]. A cause du statut non prolifératif des cellules endothéliales des tissus sains, la mort mitotique induite par les dommages de l'ADN suite aux radiations ne peut pas être la mort majoritairement observée, ce qui explique pourquoi les cellules endothéliales meurent exclusivement d'une apoptose médiée par la voie aSMase/céramide. En effet, des souris invalidées pour le gène *asmase* ont un endothélium qui résiste aux radiations au niveau du cerveau, des poumons et des tissus intestinaux par rapport aux souris sauvages ou bien invalidées pour des gènes codant pour des protéines senseurs des dommages de l'ADN telles que DNA-PK, ATM ou encore p53 [Ch'ang *et al.*, 2005; Paris *et al.*, 2001; Pena *et al.*, 2000]. Comme pour les injections de bFGF, le traitement avec la S1P peut moduler les voies de signalisation induites par le céramide *in vivo* et protéger les tissus normaux de la toxicité radioinduite. Cependant, les cellules endothéliales pathologiques ont la capacité de se diviser [Carmeliet, 2005]. Ce statut prolifératif permet l'apparition de la mort mitotique radioinduite que la S1P ne peut pas inhiber. Il a été montré que l'action pro-tumorale de la S1P semble jouer majoritairement au niveau de l'activation de l'angiogenèse tumorale et pas au niveau de l'activation de la prolifération tumorale [Visentin *et al.*, 2006]. De plus, les radiations inhibent la néovascularisation tumorale en induisant une angiogenèse inefficace [Tsai *et al.*, 2005]. Nos résultats ont permis de mettre en évidence l'existence d'une balance entre les effets pro-prolifératifs de la S1P, et anti-prolifératifs des radiations, et que la S1P ne permet pas d'augmenter la capacité de prolifération des cellules endothéliales lorsqu'elles ont été irradiées à 15 Gy. Cependant, cette balance peut être dose dépendante. La radiothérapie qui induit une mort mitotique, ainsi que la plupart des chimiothérapies qui sont développées, ciblent essentiellement les cellules qui ont une forte capacité à proliférer.

*Toutes ces considérations biologiques laissent penser que la S1P exogène utilisée à dose unique forte permettrait donc de protéger les cellules endothéliales des tissus sains de l'apoptose radioinduite dépendante de la voie du céramide, mais pas les cellules endothéliales tumorales en prolifération qui seraient sensibles à une mort mitotique. Nos observations nécessitent cependant des analyses plus poussées au niveau d'un modèle *in vivo* qui permettrait l'étude de l'impact de l'ajout de S1P exogène au niveau de la prolifération tumorale après une gamme de doses d'irradiation.*

Les récepteurs S1Ps sont couplés différemment via G_i , G_q , $G_{12/13}$ et Rho à de multiples systèmes effecteurs incluant l'adénylate cyclase, les phospholipases C et D, des kinases régulées par des signaux extra-cellulaires, JNK ou encore la MAPK p38, ainsi que des récepteurs non couplés à des tyrosines kinases [Pyne and Pyne, 2000]. Les protéines G_i sont sensibles à la TP qui les découple, empêchant ainsi une signalisation induite par l'activation de la protéine Ras par ses sous-unités $\beta\gamma$ afin de stimuler la phosphorylation de Erk et l'activation de la PI3K [Panetti *et al.*, 2001].

Un rôle de second messenger a été proposé la première fois pour la S1P lorsque l'observation d'un relargage de Ca^{2+} des pools intracellulaires a été faite suite à l'activation d'une voie dépendante de kinase par la sphingosine et la S1P [Ghosh *et al.*, 1990]. De plus, la synthèse d'ADN des cellules Swiss 3T3 est augmentée par la micro-injection de S1P [Van Brocklyn *et al.*, 1998]. Il a été montré que la production de S1P intracellulaire est augmentée par de nombreux facteurs mitogène [Pyne and Pyne, 2000]. Cependant, les preuves qui confirment un rôle de second messenger à la S1P ont majoritairement été basées sur la stimulation de SphK par des agonistes, l'utilisation d'inhibiteurs de SphK, et plus récemment par la transfection de SphK [Pyne and Pyne, 2000]. L'action de la S1P au niveau intracellulaire est confortée par des expériences utilisant la dhS1P qui entre en compétition avec la S1P au niveau de l'interaction avec les récepteurs S1P₁, S1P₂ et S1P₃ sans pour autant induire une action protectrice [Van Brocklyn *et al.*, 1998; Van Brocklyn *et al.*, 1999]. La S1P a été montrée comme inhibant l'apoptose, par l'inhibition de la voie JNK, dans les cellules HL60 et U937 en réponse à des agents toxiques tels que des inhibiteurs de PKC, le TNF- α , la SMase ou encore le céramide [Cuvillier *et al.*, 1998]. De la même façon, la S1P inhibe l'activité de nombreuses caspases et protège de l'apoptose induite par le céramide ou Fas [Cuvillier *et al.*, 1996; Cuvillier *et al.*, 1998]. Cependant, la voie intracellulaire ou extracellulaire de la S1P au niveau de cette protection contre l'apoptose n'a pas été étudiée. Morita et collaborateurs ont mis en évidence que la S1P préserve l'apoptose des ovocytes induite par la ménopause ou par des agents anti-cancéreux tels que les radiations ou encore la dauxorubicine [Morita *et al.*, 2000]. Cette protection semble indépendante des récepteurs S1Ps puisque la TP ne semble pas lever cette inhibition de l'apoptose. De la même façon, la S1P préserve partiellement les spermatogonies de l'apoptose radioinduite. Dans cette étude, la voie de signalisation induite par la S1P n'a pas été étudiée [Ojala *et al.*, 2004].

La voie médiée par la S1P au niveau de la protection contre l'apoptose n'est pas encore élucidée à ce jour. Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence pour la première fois que la S1P protège les cellules endothéliales de la mort radioinduite dépendante

de la génération du céramide. Nous avons effectué des tests avec la TP qui semblent mettre en évidence une action médiée par les récepteurs S1Ps couplés à des protéines G_i . Par test de comptage cellulaire, la TP lève la protection contre l'apoptose radioinduite apportée par la S1P puisque l'on compte 2,1 fois plus d'apoptose pour les cellules traitées à la TP et la S1P que pour les cellules traitées à la S1P seule. Ces résultats ont été validés par marquage TUNEL qui met en évidence $96,8 \pm 8,8$ % d'apoptose pour les cellules traitées à la TP et la S1P par rapport aux cellules contrôle 15 Gy. Cependant, avec le test de comptage cellulaire, la TP ne permet pas de lever complètement la protection induite par la S1P. En effet, on retrouve seulement 87 % de l'apoptose induite par une irradiation à 15 Gy pour la condition TP par rapport au contrôle 15 Gy. Les expériences réalisées *in vivo* nous donnent les mêmes résultats puisque la TP diminue la protection induite par la S1P (médiane de survie à 8 jours avec 100 % des animaux morts à 10 jours pour la condition S1P et médiane de survie à 7 jours avec 100 % des animaux morts à 9 jours pour la condition S1P et TP) sans pour autant la lever complètement (médiane de survie à 6 jours avec 100 % des animaux morts à 7 jours pour la condition contrôle 15 Gy). Il a été montré que dans les cellules Swiss 3T3 la stimulation de la voie ERK1/2 par la S1P exogène est partiellement inhibée (70-80 %) par la TP. Il a donc été proposé un modèle à double action dans lequel la S1P aurait une action extracellulaire et intracellulaire [Goodemote *et al.*, 1995]. Contrairement aux cellules Swiss 3T3, la stimulation de la voie EKR1/2 par la S1P dans des cellules musculaires lisses primaires de porc est complètement levée par la TP. Dans ce cas, l'action de la S1P est totalement médiée par la voie extracellulaire [Pyne and Pyne, 1996]. Ces observations nous laissent penser que la protection induite par la S1P contre l'apoptose radioinduite serait donc majoritairement médiée par les récepteurs S1Ps. On peut aussi émettre l'hypothèse que la protection puisse être médiée par plusieurs récepteurs impliquant la protéine G_i , ainsi qu'une autre protéine G insensible à la TP. Cependant, nos observations réalisées avec la dhS1P, qui ne mettent pas en évidence de protection induite par la dhS1P, semblent plus corrélées avec une action intracellulaire, selon la théorie de Van Brocklyn qui explique que la non reproduction de l'action de la S1P par la dhS1P étaye l'hypothèse d'une action intracellulaire [Van Brocklyn *et al.*, 1998; Van Brocklyn *et al.*, 1999]. Ces observations ont été validées *in vivo*. En effet, pour les souris contrôle 15 Gy et la condition 15 Gy + dhS1P la médiane de survie est de 6 jours, avec 100 % des animaux morts à 7 jours pour le contrôle et à 8 jours pour la condition dhS1P. Nos tests effectués avec la dhS1P ont été réalisés à une dose de 1 μ M *in vitro*, et 2 \times 100 μ g *in vivo*, doses utilisées pour la S1P. On sait que la dhS1P a une affinité moindre pour les récepteurs S1Ps par rapport à la S1P, c'est pourquoi il serait intéressant de reproduire ces

expériences en augmentant la concentration en dhS1P afin de voir si la protection induite par la S1P peut être obtenue à des doses plus fortes en dhS1P, ce qui appuierait notre hypothèse d'une action extracellulaire.

Mes travaux de thèse ont mis en évidence que la S1P induit une radioprotection des cellules endothéliales contre l'apoptose radioinduite médiée par le céramide. Cette protection implique les protéines G_i couplées aux récepteurs S1Ps. Cependant, il semblerait que la protection soit une combinaison de l'action de plusieurs protéines G et/ou d'une action extracellulaire combinée à une action intracellulaire.

V CONCLUSION

L'implication des cellules endothéliales dans l'intégrité du tissu sain et tumoral a été mise en évidence suite à de fortes doses d'irradiation [Garcia-Barros *et al.*, 2003; Paris *et al.*, 2001]. Il a de plus été montré que les cellules endothéliales confluentes meurent après irradiation par une voie induite par la génération du facteur pro-apoptotique céramide [Haimovitz-Friedman *et al.*, 1994b]. La mort mitotique a largement été étudiée en ce qui concerne la mort radioinduite pour la plupart des cellules eucaryotes en division, et elle apparaît dans la littérature comme étant la voie de signalisation majeure suite à une irradiation. Cependant, cette mort mitotique a été peu ou pas décrite en ce qui concerne la mort des cellules endothéliales après irradiation et son implication directe en ce qui concerne l'intégrité tissulaire n'a pas été démontrée. Mes travaux de thèse prouvent que les cellules endothéliales en prolifération ont une radiosensibilité induisant deux types de mort : une mort par apoptose médiée par la génération radioinduite de céramide, ainsi qu'une mort mitotique induite par les dommages radioinduits de l'ADN. Le premier type de mort est précoce, puisqu'il apparaît avant toute mitose, et est dépendant de l'activation de l'aSMase et de la génération du céramide. Nous avons prouvé que la S1P est capable d'inhiber cette apoptose radioinduite. Le second type de mort est plus tardif puisqu'il apparaît après les premières 24 h qui suivent l'irradiation. Cette mort mitotique est dépendante d'une voie médiée par les dommages de l'ADN. Le fait que ni la désipramine, ni la FBI ou encore la S1P ne soit capable de lever la mort mitotique radioinduite *in vitro* laisse penser que le céramide n'est pas impliqué dans l'induction de la mort mitotique radioinduite, et donc que le céramide n'interfère pas avec les dommages de l'ADN.

La protection médiée par la S1P a été validée *in vivo* au niveau d'un modèle murin de SGI. Le fait que les souris traitées à la S1P ne meurent pas du SGI radioinduit nous conforte dans l'idée que les cellules endothéliales *in vivo* meurent principalement de l'apoptose radioinduite dépendante de l'activation de l'aSMase et de la génération de céramide, mises en évidence *in vitro* avec l'utilisation de la désipramine, et non pas de la mort mitotique induite par les dommages de l'ADN. Le fait que l'addition exogène de S1P lève la radiosensibilité des cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo* nous permet de penser que ce sphingolipide pourrait être utilisé à des fins cliniques en radioprotection des tissus sains au cours de traitements radiothérapeutiques.

Enfin, la S1P est connue pour induire une protection contre l'apoptose de plusieurs lignées cellulaires. Cependant, les mécanismes de cette protection n'ont pas été identifiés. Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence que la radioprotection induite par la S1P au niveau de l'apoptose précoce des cellules endothéliales médiée par la génération de céramide radioinduite semble dépendre majoritairement de l'activation d'un ou de plusieurs récepteurs à la S1P.

VI PERSPECTIVES

Suite à ces travaux de recherche, quelques questions restent ouvertes, notamment en ce qui concerne les causes de la mort des souris qui ont reçu un traitement par la S1P et une greffe de moelle osseuse. La S1P permet de lever la mort induite par le SGI dû au dysfonctionnement microvasculaire, et la greffe de moelle osseuse empêche les souris de mourir d'une aplasie médullaire. Ces résultats laissent cependant penser que les radiations entraînent d'autres dysfonctionnements létaux de l'organisme, et que la S1P ne semble pas les inhiber. Il serait donc intéressant d'identifier les causes de la mort de ces animaux. Sont-elles dues à un dysfonctionnement d'organe induit par des problèmes vasculaires, ou bien à une dérégulation d'autres systèmes que le système vasculaire?

Une autre question ouverte suite à mes travaux de recherche se pose en ce qui concerne le rôle de la S1P au niveau de l'évolution tumorale dans le cas d'un traitement des tissus sains au cours d'une radiothérapie. La littérature démontre en effet un rôle pro-prolifératif de la S1P au niveau de l'endothélium tumoral. Cependant, mes travaux de thèse ont validé le fait que dans le cas d'une irradiation, la S1P n'induit pas de prolifération des cellules endothéliales. L'inhibition de la prolifération par l'irradiation domine donc l'effet proprolifératif de la S1P. Ainsi, le fait de traiter un patient atteint d'une tumeur avec de la S1P en plus d'une radiothérapie ne devrait pas augmenter l'angiogenèse tumorale. De plus, certains travaux montrent que le fait de cibler la S1P circulante générée par les cellules tumorales affecte majoritairement la progression tumorale en inhibant l'angiogenèse, et non pas en diminuant la croissance des cellules tumorales. Cependant, il semble important de vérifier que dans le cas d'une injection de S1P à des souris irradiées atteintes de tumeurs, la S1P ne favoriserait pas la prolifération tumorale suite à une irradiation. Au laboratoire nous sommes actuellement en train de développer un modèle *in vivo* de souris auxquelles on injecte des cellules B16F10 de mélanome ou des cellules issues de carcinome de Lewis LL/2. Les tumeurs vont être irradiées localement à une dose unique de 15 Gy et les souris seront injectées par $2 \times 100 \mu\text{g}$ de S1P 30 min avant et 5 min après l'irradiation, afin de répéter les conditions obtenues lors de la mise en évidence de la protection du SGI par la S1P. Les B16F10 expriment les récepteurs S1P₂ seulement. La S1P semble induire une inhibition du pouvoir métastatiques de ces cellules chez la souris par l'inhibition de la voie médiée par S1P₂

et par l'inhibition de Rac conjointe à l'activation de RhoA [Yamaguchi *et al.*, 2003]. Actuellement, aucun travail n'a montré l'expression des récepteurs S1Ps par les cellules de carcinomes de Lewis. De plus, les tumeurs expriment différemment les récepteurs S1Ps, c'est pourquoi il serait intéressant de refaire l'expérience avec des tumeurs exprimant chacun des type de récepteurs.

Enfin, mes travaux de thèse prouvent que l'action de la S1P au niveau de la radioprotection des cellules endothéliales contre l'apoptose radioinduite est médiée principalement par un ou plusieurs récepteur S1Ps. Afin de pouvoir optimiser cette protection des cellules endothéliales il paraît indispensable de mettre en évidence la voie par laquelle elle est induite. Des outils pharmacologiques permettant de moduler la majorité des récepteurs S1Ps ont été développés : des agonistes dont certains sont des analogues structuraux directs de la S1P comme le FTY720, ou encore des antagonistes. De telles molécules peuvent permettre de discriminer le ou les récepteurs S1Ps impliqués dans la radioprotection des cellules endothéliales médiée par la S1P. Toutefois l'utilisation de ces molécules est limitée pour deux raisons techniques :

- le chevauchement de spécificité de ces différents inhibiteurs; on peut citer par exemple le VPC24191 (Avantilipids), agoniste de S1P₁ et S1P₃, ainsi que le VPC23019 (Avantilipids), antagoniste de ces mêmes récepteurs.
- la régulation négative du nombre de récepteurs présents en surface qui est contrôlée par la concentration ou la durée d'utilisation de ces molécules.

Une telle approche doit donc à la fois combiner différents agonistes ou antagonistes, ainsi que la détermination de gammes de concentration et de durées d'utilisation ce qui nous a semblé assez contraignant. De plus, ces agonistes ou antagonistes n'ont jamais été utilisés afin de valider la fonction de protection contre l'apoptose induite par la S1P, ce qui ne nous donne pas d'indication ni pour l'effet attendu ni pour leur utilisation pratique.

Il nous a donc semblé plus intéressant de développer un modèle *in vitro* de HMEC-1 dans lesquelles chacun des récepteurs est inhibé de façon définitive. Afin de pouvoir inhiber ces récepteurs nous avons choisi d'utiliser la technique de l'interférence ARN avec comme outils des petits ARN interférents synthétiques, les siARN (small interfering ARN). Cette technique a été décrite assez récemment [Fire *et al.*, 1998], et elle est utilisée afin d'inhiber l'expression protéique d'un gène ciblé. Elle est inspirée d'un mécanisme qui existe naturellement chez les plantes, la levure ou encore la drosophile (Figure 70).

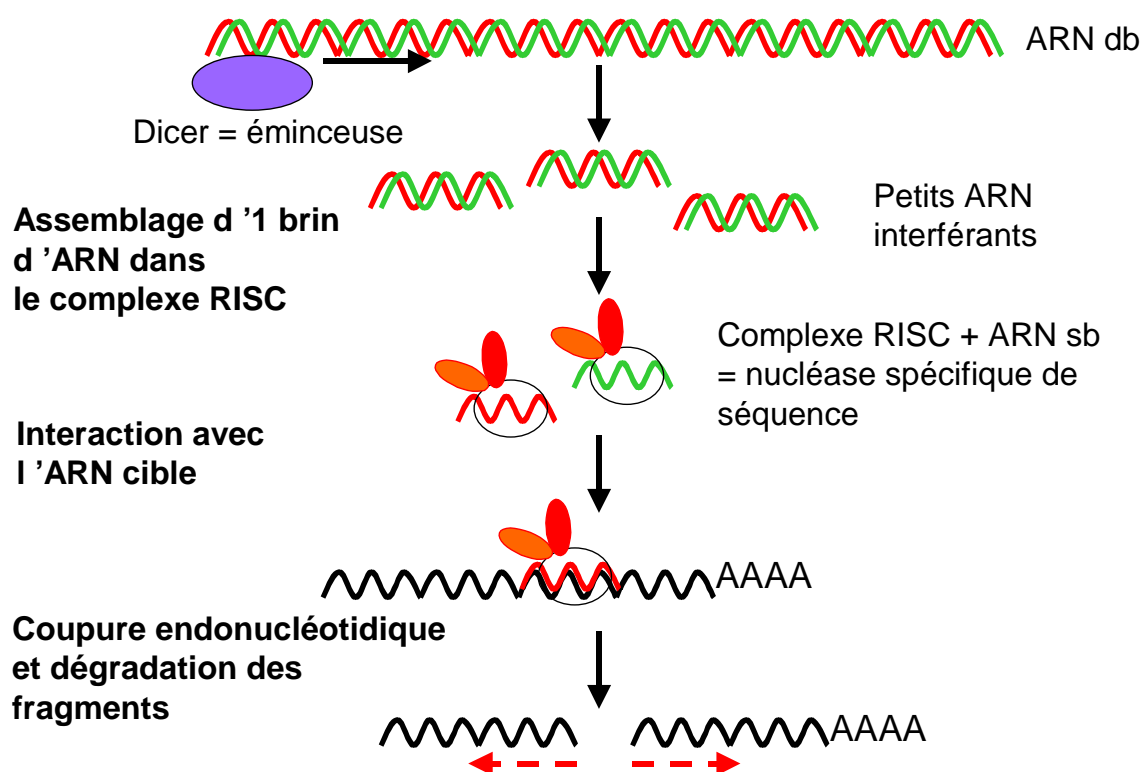


Figure 70: schéma représentatif du fonctionnement de l'interférence ARN.

Il s'agit d'ARN double brin qui sont naturellement présents dans la cellule et qui sont clivés en petits ARN de 20 paires de bases par une protéine appelée Dicer ou « éminceuse ». Ces ARN double brin sont dissociés pour former des simples brins qui sont alors intégrés dans un complexe protéique appelé RISC et qui agit comme une nucléase spécifique de séquence afin de cliver les ARNm dont elle possède la séquence homologue. Ainsi, les ARNm sont dégradés et la traduction protéique ne peut pas avoir lieu. Afin de reproduire ce phénomène dans nos cellules HMEC-1, nous avons choisi de transférer de petits siARN par la méthode des lentivirus pour 2 raisons : cette technique permet d'obtenir une transfection stable. Ainsi, les cellules HMEC-1 peuvent être cultivées après transfection avant d'être soumise à un autre stress tel qu'une irradiation. De plus, cette technique nous permet d'insérer une cassette d'expression pour la GFP (Green Fluorescent Protein) qui permet de quantifier la production virale, mais qui permet aussi de voir l'état de transfection puisque les cellules ayant intégré les séquences de siARN dans leur génome intègrent aussi la cassette d'expression de la GFP. Nous avons déjà produit des lentivirus porteurs de séquences cibles pour chacun des trois récepteurs S1P₁, S1P₂ et S1P₃. Pour chaque récepteur, nous avons choisi trois cibles différentes afin d'augmenter les chances d'obtenir une séquence de siARN fonctionnelle (voir chapitre Matériels et Méthodes VI.3). Nous avons également procédé à des

tests de MOI (Multiplicity Of Infection) afin de déterminer si les HMEC-1 supportent bien l'infection par les lentivirus, et afin de déterminer combien de particules virales doivent infecter une cellule pour qu'elle intègre l'expression stable de la GFP et donc du siARN (Figure 71).

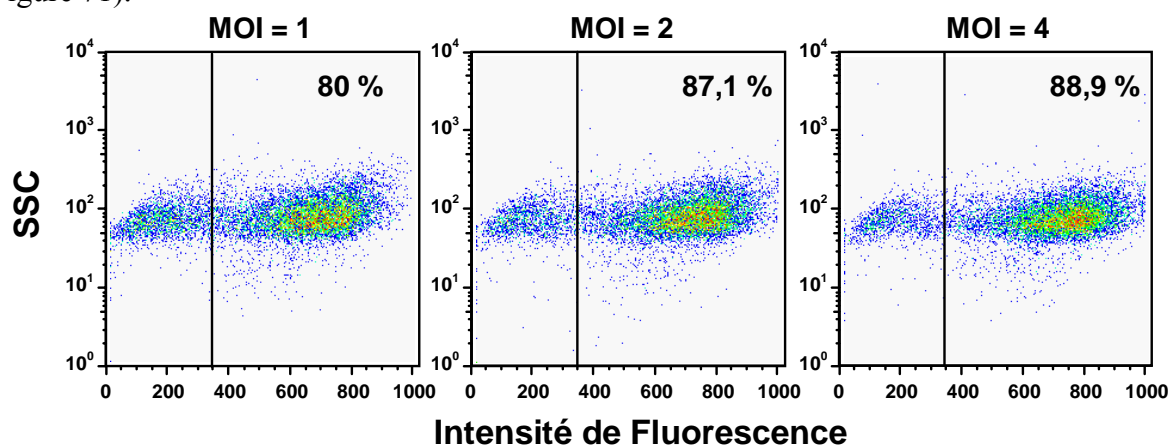


Figure 71: dot plot de cytométrie en flux représentant l'intensité de fluorescence des cellules HMEC-1 après une infection par 1, 2 ou 4 particules lentivirales par cellule.

Nous avons observé qu'au delà le nombre de 2 particules, le pourcentage de cellules HMEC-1 positives pour le marqueur GFP ne varie plus. On obtient en effet 87,1 % de cellules positives lorsque 2 particules par cellule sont utilisées, et 88,9 % pour 4 particules par cellule. Enfin, nous avons déjà procédé à l'infection des cellules HMEC-1 avec une MOI égale à 2 par les lentivirus porteurs des séquences différentes dirigées contre chacun des 3 récepteurs S1Ps ciblés. Ces cellules ont été maintenues en culture afin de vérifier l'impact de la transfection par rapport aux cellules contrôles, ainsi que l'expression du marqueur GFP qui témoigne de l'expression stable des siARN pendant plus de 3 passages suite à l'infection. Nous en sommes actuellement à la caractérisation par RT-PCR et par Western Blot de l'extinction de l'expression des récepteurs S1Ps au niveau moléculaire et protéique. Lorsque nous aurons sélectionné la séquence la plus efficace pour chacun des trois récepteurs, nous réaliserons des expériences de quantification d'apoptose de ces cellules HMEC-1 transfectées après irradiation à 15 Gy et prétraitement à la S1P. L'identification du ou des récepteurs S1Ps impliqués dans la radioprotection permettra de faire une avancée des connaissances en ce qui concerne la signalisation induite par la S1P. De plus, au niveau thérapeutique il pourrait alors être possible d'essayer de cibler spécifiquement le ou les récepteurs impliqués dans l'action de radioprotection induite par la S1P afin d'augmenter cette radioprotection des cellules endothéliales, et de diminuer certains effets secondaires, s'il y en a, comme par exemple une action médiée par la S1P en faveur du développement de la tumeur traitée.

MATERIELS ET METHODES

I CULTURES CELLULAIRES ET TRAITEMENTS

I.1. Les HMEC-1

I.1.1. Milieu de culture

Les HMEC-1 ont été fournies par le professeur F.J. Candal (Center for Disease Control; Atlanta, Georgie, USA). Il s'agit d'une lignée qui dérive de cellules endothéliales de microvaisseaux humaines immortalisées par le virus SV40, et qui conserve toutes les caractéristiques de cellules endothéliales primaires. Les HMEC-1 sontensemencées à une densité de 20000 cellules/cm² et cultivées jusqu'à atteindre la confluence pendant 5 jours à 37°C dans une atmosphère humide enrichie en CO₂ (5 %). Le milieu de culture est composé de MCDB 131 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplémenté de 15 % de SVF, 10 ng/ml d'EGF (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), 2 µg/ml d'hydrocortisone (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Favier, France), 2 mM de L-Glutamine (Gibco-BRL, Cergy Pontoise, France) et pénicilline/streptomycine respectivement à 100 U/ml et 100 µg/ml (Sigma-Aldrich). Ce milieu est désigné comme étant le Milieu Complet (MC).

I.1.2. Irradiations et traitements

Les irradiations des HMEC-1 à confluence ont lieu dans un irradiateur à rayons X Faxitron CP160 (Faxitron X-ray Corporation, Buffalo Grove, Illinois, USA) à un débit de dose de 1,48 Gy/min et à une dose totale comprise entre 2 et 30 Gy. Deux heures avant l'irradiation le milieu de culture MC est remplacé par du Milieu Appauvri (MA) (MCDB 131, SVF 0,1 %, hydrocortisone 2 µg/ml, L-Glutamine 2 mM, 100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine). En fonction des expériences, différents produits ou inhibiteurs pharmacologiques sont ajoutés au MA 2 h avant l'irradiation : S1P 1 µM (Biomol, Philadelphie, Pennsylvanie, USA ; reprise dans le PET : polyéthylène glycol 5 %, éthanol 2,5 % et Tween-80 0,8 %), dhS1P 1µM (Alexis Biochemicals; Coger, Paris, France), FB1 1 µM (Biomol). Des exceptions sont faites pour la désipramine ajoutée à 50µM seulement 15 min avant l'irradiation et retirée 1 h après, la TP (Sigma-Aldrich) ajoutée à 100 ng/ml 2 h 30

avant, et le nocodazole (Sigma-Aldrich) ajouté à 0,1 µg/ml 24 h après l'irradiation pendant 24 h.

I.2. Les cellules 293 FT

La lignée 293 FT dérivée de cellules épithéliales humaines est utilisée pour la production de particules virales. Les 293 FT sont cultivées dans du milieu DMEM 4,5 g/ml de glucose (Sigma-Aldrich) supplémenté de 10 % de SVF, 2 mM de L-Glutamine et pénicilline/streptomycine respectivement à 100 U/ml et 100 µg/ml. Vingt-quatre heures avant la transfection, les 293 FT sontensemencées à $3 \cdot 10^6$ cellules dans des boîtes de pétri 100 mm.

I.3. Les souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées pour la production des plasmides lentiviraux servant à la fabrication des lentivirus porteurs des séquences siARN sont listées ci-dessous (Tableau 10) :

<i>Souches</i>	<i>Description</i>
E. coli XL1	supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac ⁻ F' [proAB ⁺ lacI ^q lacZΔM15 TN10(tet ^r)]. Le plasmide F' de cette souche possède un gène de résistance à la tétracycline.
E. coli XL10	TetrD(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]. Le plasmide F' de cette souche possède un gène de résistance à la tétracycline.

Tableau 10: souches bactériennes utilisées pour les préparations plasmidiques.

II DETECTION DE L'APOPTOSE

II.1. Test de comptage cellulaire

Comme il a déjà été décrit [Lawrence *et al.*, 2001], le pourcentage de cellules apoptotiques est calculé en prenant le ratio [nombre de cellules flottantes/nombre total des cellules (cellules flottantes + adhérentes)] \times 100. La fraction des cellules flottantes représente les cellules flottantes contenues dans le milieu de culture et les cellules faiblement adhérentes obtenues avec deux lavages de la monocouche cellulaire avec du PBS-EDTA (Phosphate Buffer Saline). Les cellules adhérentes sont ensuite décollées avec de la trypsine (Sigma-Aldrich). Le nombre de cellules des deux fractions est déterminé par comptage sur lame de Malassez.

II.2. Détection du marqueur apoptotique Apo2.7

Le marqueur Apo2.7 (antigène 7A6) a été décrit comme un marqueur mitochondrial apoptotique [Zhang *et al.*, 1996a]. Les cellules adhérentes et flottantes, marquées séparément ou non, sont lavées deux fois dans du PBS, perméabilisées avec 100 μ g/ml de digitonine dans du PBS, SVF 2,5 %, 20 min sur glace. Les cellules sont ensuite lavées dans du PBSF (PBS, SVF 2,5 %, NaN₃ 0,01 %) puis marquées avec l'AcMo IgG₁ de souris anti-APO2.7-phycoérythrine (clone 2.7A6A3; Immunotech, Marseille, France) 15 minutes à l'obscurité. Les cellules sont alors lavées dans du PBSF, reprises dans du PBS et analysées au cytomètre en flux FACScalibur[®] ou FACScan (BD Biosciences). Les résultats sont alors étudiés avec le logiciel CellQuest Pro (BD Biosciences).

II.3. Marquage TUNEL

Les cellules HMEC-1, flottantes et adhérentes, sont lavées dans du PBS, fixées en paraformaldehyde (2 %) pendant 1 h sous agitation à température ambiante, lavées en PBS puis perméabilisées 2 min sur glace en PBS, Triton X-100 0,1 %, citrate de sodium 0,1 %. Après 2 lavages en PBS les cellules sont reprises dans la solution de marquage du kit In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein (Roche, Meylan, France) pendant 1 h à 37°C dans

l'obscurité, lavées, reprises dans du PBS puis analysées au cytomètre en flux FACScalibur[®] ou FACScan (BD Biosciences). Les résultats sont alors étudiés avec le logiciel CellQuest Pro (BD Biosciences).

III ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE

III.1. Incorporation de ³H-Thymidine

Seize heures après l'irradiation les cellules HMEC-1 sont incubées dans du MA contenant de la ³H-Thymidine (1 µCi/ml) pendant 8 h. Les cellules sont alors trypsinisées et récoltées sur une membrane en fibre de verre (Wallac-PerkinElmer, Courtaboeuf France) à l'aide d'un harvester Titertek Cell (Flow Laboratories, Rickmansworth, RU). La membrane est séchée puis incubée avec du liquide de scintillation Betaplate (Wallac-PerkinElmer). La radioactivité β est comptée grâce à un spectromètre de scintillation (Wallac-PerkinElmer), et l'incorporation de ³H-Thymidine est analysée avec le logiciel Microbeta Windows Workstation (Wallac-PerkinElmer).

III.2. Marquage à l'IP

Les cellules HMEC-1, flottantes et adhérentes, sont lavées en PBS, fixées en éthanol 70 % pendant 20 min à -20°C, lavées en PBS puis marquée avec de l'IP à 40 µg/ml (Sigma-Aldrich) additionné de 100 µg/ml de RNase (Qiagen, Courtaboeuf, France) pendant 30 min à 37°C dans l'obscurité. Les cellules sont enfin lavées puis reprises dans du PBS et analysées au cytomètre en flux FACScalibur[®] ou FACScan (BD Biosciences). Les résultats sont alors étudiés avec le logiciel CellQuest Pro (BD Biosciences). Les phases du cycle cellulaire sont quantifiées en utilisant le logiciel Flow Jo (Tree Star, Ashland, Oregon, USA).

IV ANALYSE DES DOMMAGES DE L'ADN

IV.1. Détection de la phosphorylation de l'histone H2AX (γ H2AX)

Pour la détection des DSBs de l'ADN après irradiation, le marquage γ H2AX a été réalisé comme décrit par Sedelnikova et collaborateurs [Sedelnikova *et al.*, 2002]. Les cellules sont décollées en trypsine, lavées en PBS et fixées en éthanol 70 % à -20°C sur la nuit. Les cellules sont ensuite réhydratées pendant 10 min en PBS SVF 4 %, Triton X-100 0,1 %, puis resuspendues dans 200 μl d'AcM IgG₁ de souris anti- γ H2AX humain (clone JBW301; Euromedex; Mundolsheim, France) (dilution 1:500 en PBS SVF 2 %, Triton X-100 0,1 %) pendant 2 h à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées en PBS SVF 2 %, Triton X-100 0,1 % puis resuspendues dans 100 μl d'Ac secondaire de chèvre anti-souris, fragment IgG F(ab')₂ couplé à la phycoérythrine (Beckman Coulter; Roissy, France) (dilution 1:100 en PBS SVF 2 %, Triton X-100 0,1 %) pendant 1 h à température ambiante. Les cellules sont enfin lavées et reprises dans 20 $\mu\text{g/ml}$ de 7-Amino-Actinomycin D (Sigma-Aldrich) avant d'être analysées en cytométrie en flux sur BD FACSArray Bioanalyser[®] (BD Biosciences). Les résultats sont alors étudiés avec le logiciel CellQuest Pro (BD Biosciences).

IV.2. Analyses cytogénétiques

Afin d'étudier les indices mitotiques et les aberrations chromosomiques, la technique FPG mise au point par Perry et Wolff [Perry and Wolff, 1974] a été utilisée. Vingt-deux heures et trente minutes après irradiation, la colchicine (0,1 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma-Aldrich) a été ajoutée au milieu de culture pendant 1 h 30 avant de récolter les cellules. Elles sont trypsinisées, resuspendues dans une solution hypotonique (KCl 0,075 M), incubées 20 min à 37°C puis fixées en méthanol : acide acétique (3 :1, v :v). La suspension cellulaire est ensuite étalée sur lame de verre qui sont séchées à température ambiante, puis marquées au GIEMSA (Gibco-BRL). Les télomères sont détectés par la sonde (C3TA2)3PNA-Cy3 (Perceptive Biosystem, Boston, Massachusetts, USA) incubée 3 h à température ambiante, et les centromères sont marqués avec la sonde Pan-centromère (Cambio, Cambridge, RU), hybridée sur la nuit à température ambiante. Les métaphases sont capturées avec un appareil CCD (Zeiss, Jena, Allemagne) couplé à un microscope Axioplan (Zeiss). Les métaphases sont alors

étudiées avec le logiciel ISIS (MetaSystems, Altlußheim, Allemagne). Au moins 100 métaphases sont analysées pour chaque condition. Les aberrations chromosomiques sont comptées exclusivement pour les métaphases en première division. Afin de déterminer le nombre de cassures par métaphase un nombre de cassures par type d'aberration a été attribué : 1 dicentrique = 1 cassure ; 1 tricentrique = 4 ; 1 quadricentrique = 6 ; 1 pentacentrique = 8 ; 1 anneau = 2 et 1 minute = 1 cassure.

IV.3. Détection des micronoyaux

Les cellules flottantes et adhérentes sont poolées 48 h après une irradiation à 15 Gy, lavées en PBS puis étalées sur lame de verre avec un Cytospin® (Thermo Electron Corp., Waltham, Massachusetts, USA) à 800 rpm, 2 min. Les cellules sont alors fixées en paraformaldehyde (0,5 %) pendant 30 min puis perméabilisées au Triton X-100 (0,1 % en PBS) pendant 10 min. Les lames sont lavées deux fois en PBS, incubées en IP 5 µg/ml (Sigma-Aldrich), RNase 1 mg/ml (Qiagen) pendant 1 h à 37°C dans l'obscurité, puis rincées en Tris 10 mM. Les micronoyaux sont visualisés à un grossissement x 400 sur un microscope à fluorescence Axiovert 200-M (Zeiss, Göttingen, Allemagne).

V ETUDES *IN VIVO*

V.1. Animaux et traitements

Les souris C57Bl/6 (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France), sont élevées à l'animalerie de l'Unité INSERM U601 en accord avec l'Association Française des Sciences et Techniques de l'Animal de Laboratoire (AFSTAL).

Les souris, âgées de 8 à 12 semaines, sont soumises à une irradiation corporelle totale à une dose unique de 15 Gy de rayons X délivrée à un taux de 2 Gy/min par un accélérateur linéaire General Electric Medical System.

Pour les traitements par S1P (Avanti Lipids; Coger), dhS1P (Avanti Lipids) et LPA (Avanti Lipids), les souris sont injectées de façon rétro-orbitale 30 min avant et 5 min après irradiation avec 100 µg/injection pour la S1P et la dhS1P, et 63 µg/injection pour le LPA. Pour les traitements par la TP (Sigma-Aldrich), les souris sont injectées de façon intra-péritonéale 2 h et 30 min avant, 5 min et 2 h après irradiation avec 1 µg/injection.

V.2. Transplantation de moëlle osseuse

Les souris C57Bl/6 donneuses de moëlle osseuse sont sacrifiées par asphyxie. Les cellules de moëlle osseuse sont récupérées à partir de la cavité médullaire du tibia et du fémur par lavage avec de l'HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) (Sigma-Aldrich) à l'aide d'une aiguille de diamètre 26 (Invitrogen). Les cellules sont ensuite lavées deux fois en HBSS et la suspension cellulaire est obtenue par passage à travers une aiguille de diamètre 21. Après comptage, les cellules sont diluées à 10^7 cellules pour 200 µl puis injectées dans la veine de la queue de la souris receveuse 16 h après irradiation corporelle totale.

V.3. Préparation des tissus

Pour obtenir les échantillons tissulaires, les souris sont sacrifiées par asphyxie et des segments de 2,5 cm du jujenum proximal, ainsi que la tête et la partie proximale du fémur sont récupérés. Les échantillons d'intestin sont fixés par incubation sur la nuit en formaldéhyde 4 % PBS, tandis que les échantillons osseux sont fixés en decalcifer II

(Surgipath, Peterborough, Angleterre). Les tissus fixés sont inclus dans des block de paraffine, et des sections de 5 μm d'organes sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome. Elles sont ensuite étalées sur lames de verre traitées à la polylysine. Les sections sont déparaffinées par traitement à la chaleur (90°C, 10 min puis 60°C, 5 min) avant d'être lavées deux fois en xylène. Les lames sont enfin marquées en hématoxyline/éosine ou en TUNEL.

V.4. Marquage hématoxyline/éosine

Les lames sont réhydratées par des bains successifs en éthanol (100 % 15 min, 70 % 15 min) puis rincées 10 min à l'eau distillée. Elles sont ensuite marquées 45 s en hématoxyline (Marck Europium, Paris, France) puis rincées abondamment à l'eau distillée. Un bain de 3 s en acide acétique précède le marquage de 30 s en éosine (Sigma-Aldrich). Les lames sont rincées en eau distillée puis en éthanol (70 % 1 min 30 s, 100 % 1 min 30 s) puis déshydratées par deux bains successifs de 2 min en xylène.

V.5. Marquage TUNEL

Les échantillons inclus sur lames de verre sont marqués par la technique TUNEL comme décrite par les fournisseurs (Roche). Les cellules apoptotiques sont identifiées par un marquage nucléaire TUNEL positif rouge-brun.

V.6. Survie des souris et évaluation des causes de la mort

Les courbes de survie sont réalisées selon la méthode de Kaplan-Meyer. Les souris présentant un état moribond et montrant des signes de SGI tels que des diarrhées, un amaigrissement, ou les souris contrôles sont sacrifiées par asphyxie. Les causes de la mort sont évaluées par autopsie. Les échantillons obtenus à partir des organes sont fixés en formaldéhyde et marqués avec hématoxyline/éosine comme décrit précédemment. Les dommages gastro-intestinaux sont diagnostiqués comme étant la cause de la mort quand les intestins montrent une muqueuse abîmée sans villosités et cryptes apparentes. Les dommages de la moëlle osseuse sont diagnostiqués comme étant la cause de la mort quand la moëlle présente une déplétion complète en éléments hématopoïétiques.

VI ETUDE DE L'EXPRESSION DES RECEPTEURS S1PS

VI.1. Expression protéique

VI.1.1. Préparation des extraits protéiques totaux

Après exposition des cellules à une irradiation, elles sont récoltées aux temps désirés après deux lavages en PBS-EDTA puis décollées en trypsine. Les cellules sont centrifugées 5 min à 1500 rpm, puis le culot est lavé en PBS, séché et stocké à -20°C . L'extraction des protéines totales a lieu en tampon RIPA (Tris pH 8,8 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP 40 1 %, Sodium déoxycholate 1 %, SDS 0,1 %, PMSF 2 mM, aprotinine et leupeptine 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 200 μl pour $5 \cdot 10^6$ cellules. Les extraits sont vortexés toutes les 10 min pendant 1 h à 4°C puis centrifugés à 12 000 rpm, 30 min, 4°C . Les surnageants sont récupérés, dosés, et révélés en Western Blot.

VI.1.2. Dosage protéique

Les extraits protéiques totaux sont dosés grâce au BCA Protein Assay Kit (Pierce, Perbio, Brebières, France). Les échantillons sont dilués au $1/8^{\text{ème}}$ dans le tampon d'extraction adéquat, ainsi que la BSA de référence dans une gamme de 0 à 2 mg/ml. Après 10 min d'incubation à 37°C dans 200 μl de réactif colorimétrique, la densité optique des échantillons est mesurée par spectrophotomètre (Molecular Probes, Invitrogen). Les concentrations protéiques des lysats sont déduites de la gamme de concentration de BSA.

VI.1.3. Western Blot

60 μg de protéines totales sont reprises dans du tampon Laemmli 2X (Tris 20 mM pH 8,8, SDS 2 %, β 2-mercaptoéthanol 10 %, glycérol 20 %, bleu de bromophénol) et sont dénaturées 5 min à 100°C . Elles sont ensuite séparées par électrophorèse SDS-PAGE à 12 % pendant 2 h à 100 V (gel de concentration : acrylamide 5 %, Tris 125 mM pH 6,8, SDS 0,1 %, APS 0,1 %, TEMED 0,1 % ; gel de séparation : acrylamide 12 %, Tris 375 mM pH 8,8, SDS 0,1 %, APS 0,1 %, TEMED 0,04 %) dans un tampon Tris 25 mM, Glycine 192 mM, pH 8,3

(Biorad, Marnes La Coquette, France). Les protéines contenues dans les gels sont transférées sur une membrane de polyvinylidène (PVDF, Millipore, Bedford, MA, USA) au préalable activées par des bains successifs de 1 min en méthanol, eau puis tampon de transfert (Tris 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1 %, pH 8,3, méthanol 20 % (Biorad). Le transfert à lieu dans une cassette Biorad Mini-Protean II gel (Biorad) dans le tampon de transfert décrit précédemment pendant 2 h à 120 mA à 4°C. La membrane est ensuite saturée pendant 1 h dans le tampon de saturation TBS (Biorad), Tween 0,1 %, Western Blocking Reagent 1X (Roche). La membrane est alors incubée dans l'Ac primaire (Tableau 11) dilué en TBS Tween 0,1 % sur la nuit à 4 °C.

<i>Anticorps</i>	<i>Description</i>	<i>Fournisseur</i>	<i>Dilution</i>
anti-EDG1 P-20 (sc16070)	IgG, polyclonal, chèvre	Santa Cruz, (Tebu Bio, Le Perray en Yvelines, France)	1/500 ^{ème} (200 µg/ml)
anti-EDG3 (E1891)	IgG, polyclonal, souris	Sigma-Aldrich	1/500 ^{ème} (1 mg/ml)
anti-EDG5 C-16 (sc16085)	IgG, polyclonal, chèvre	Santa Cruz	1/500 ^{ème} (200 µg/ml)
anti-actine C-11 (sc-1615)	IgG, polyclonal, chèvre	Santa Cruz	1/1000 ^{ème} (200 µg/ml)

Tableau 11: Ac primaires utilisés en Western Blot.

La membrane est lavée 3 fois 10 min en TBS Tween 0,1 % puis incubée 1 h à température ambiante dans l'Ac secondaire (Tableau 12) couplé à la peroxidase dilué en TBS Tween 0,1 %.

<i>Anticorps</i>	<i>Description</i>	<i>Fournisseur</i>	<i>Dilution</i>
anti-chèvre couplé peroxidase (705-035-003)	IgG, polyclonal, singe	Jackson (Immunotech, Marseille, France)	1/10000 ^{ème} (1 mg/ml)
anti-souris anti-lapin couplé peroxidase (1500708)	IgG, polyclonal, chèvre	Roche	1/1000 ^{ème} (1 mg/ml)

Tableau 12: Ac secondaires utilisés en Western Blot.

La membrane est lavée 3 fois 10 min en TBS Tween 0,1 % et l'activité enzymatique est révélée par chimiluminescence en incubant la membrane 1 min dans la solution du kit de révélation et d'amplification du signal BM Chemoluminescence Blotting Substrate (Roche). La membrane est enfin révélée par autoradiographie sur hyperfilm (Kodak, Chalon-sur-Saône, France).

Afin de pouvoir quantifier l'intensité de l'expression des récepteurs S1Ps, l'actine est révélée sur les mêmes dépôts protéiques après 3 lavages de 10 min en TBS Tween 0,1 % suivis d'une déshybridation par 1 h d'incubation en Western Blot Stripping Reagent (Roche). La membrane est à nouveau saturée et incubée dans l'Ac primaire anti-actine puis dans l'Ac secondaire approprié.

VI.2. Expression moléculaire

VI.2.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits par une technique de phénol-chloroforme issue de la technique décrite par Chomczynski [Chomczynski and Sacchi, 1987] utilisant le principe de solubilité des ARN dans le phénol à pH acide. Brièvement, les cellules sont reprises dans le RNAlater (1 ml pour $5 \cdot 10^6$ cellules) et 10 % de chloroforme sont ajoutés à l'homogénat. Après une centrifugation à 12 000 rpm, 15 min, 4°C, la phase aqueuse contenant les ARN est récupérée et additionnée à volume égal d'isopropanol. Après une centrifugation à 12 000 rpm, 5 min, 4°C, les culots d'ARN sont lavés 2 fois en éthanol 75 %, séchés puis repris en eau. Les échantillons d'ARN sont soumis à un traitement DNase avant toute réaction de Reverse Transcription, ceci afin d'éviter toute amplification à partir de l'ADN génomique. Le traitement a lieu pendant 15 min à 37°C dans le milieu réactionnel suivant : Tris-HCl 20 mM pH 8,4, MgCl₂ 2 mM, KCl 50 mM, DNase 1 U (Dnase I, AmpGrade, Invitrogen), 1 µg d'ARN, suivi d'une inactivation thermique de 15 min à 65°C après l'ajout d'EDTA 2 mM final.

VI.2.2. Reverse Transcription

La RT est réalisée en utilisant l'enzyme Transcriptase Inverse (M-MLV Reverse Transcriptase, Invitrogen) qui utilise de l'ARN ou ADN simple brin afin de synthétiser de l'ADN double brin à l'aide d'une amorce. La RT est réalisée pendant 1 h à 37 °C suivi d'une inactivation thermique de 15 min à 70°C. Le milieu réactionnel est le suivant : Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT (antioxydant) 10 mM, dNTP 0,5 mM, RNasin (Promega, Charbonnière, France) 2,5 U, OligodT 2,5 µM, ARN 1µg et 200 U d'enzyme M-MLV transcriptase Inverse.

VI.2.3. Réaction de PCR

L'amplification par PCR a lieu à partir de l'ADNc obtenu par RT afin de déterminer si les cellules expriment bien les ARNm codant pour les récepteurs S1Ps. Le milieu réactionnel est le suivant : Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 250 µM, amorce 3' 0,5 µM, amorce 5' 0,5 µM, ADNc 2 µl, Taq Polymérase (Invitrogen) 5 U. Lorsque les produits de PCR sont destinés au séquençage, l'enzyme utilisée est la PfuUltraTM (Stratagene, Strasbourg, France) dont la fidélité est supérieure à celle de la Taq Polymérase. Les cycles de PCR sont les suivants : dénaturation initiale à 94 °C 5 min, 30 cycles de dénaturation 1 min 94°C/ hybridation 1 min 60°C/ élongation 1 min 30 s 72°C, suivis d'une élongation finale 5 min 72°C. Les produits de PCR sont vérifiés sur gel d'agarose 1 % et révélés en BET.

Les séquences des oligonucléotides utilisés en PCR sont listées ci-dessous (Tableau 13) :

<i>Nom</i>	<i>Séquence (5'-3')</i>	<i>Taille du fragment</i>
S1P ₁ Up	TCATCGTCCGGCATTACAATA	269 nucléotides
S1P ₁ Down	GAGTGAGCTTGTAGGTGGTG	
S1P ₂ Up	ATGGGCAGCTTGTACTCGGAG	741 nucléotides
S1P ₂ Down	CAGCCAGCAGACGATAAAGAC	
S1P ₃ Up	CTTGGTCATCTGCAGCTTCATC	469 nucléotides
S1P ₃ Down	TGCTGATGCAGAAGGCAATGTA	
S1P ₄ Up	TGAACATCACGCTGAGTGACCT	511 nucléotides
S1P ₄ Down	GATCATCAGCACCGTCTTCAGC	
S1P ₅ Up	ATCTGTGCGCTCTATGCAAGGA	322 nucléotides
S1P ₅ Down	GGTGTAGATGATAGGATTCAGCA	
Actine Up	CATGTTTGAGACCTTCAACACCC	400 nucléotides
Actine Down	AACCCCTCATTGCCAATGGTGATG	
T3	AAATAACCCTCACTAAAGGGA	378 ou 443 nucléotides
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	

Tableau 13: Séquences des amorces utilisées en PCR.

VI.3. Invalidation des récepteurs S1Ps par siARN

VI.3.1. Préparation du plasmide pSUPER-siARN

VI.3.1.1. Construction des siARN

Les siARN sont construits selon les règles de Tuschl [Tuschl *et al.*, 1999] (Figure 72):

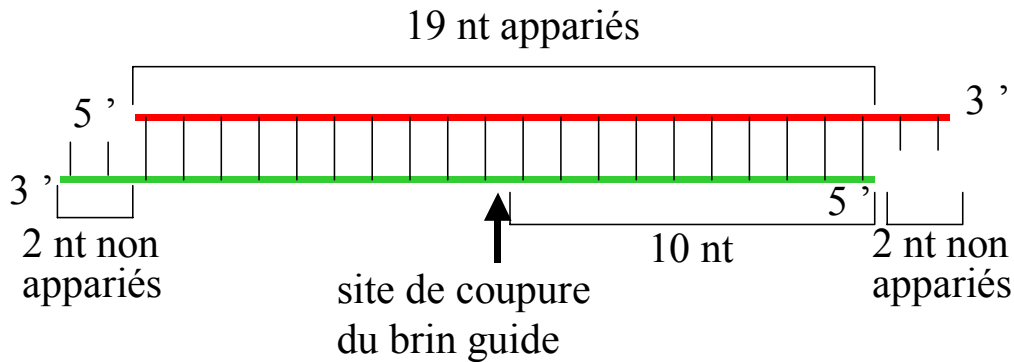


Figure 72: schéma de la structure optimale d'efficacité des siARN.

Leur longueur optimale est de 21 nucléotides avec deux nucléotides en 3' non appariés de nature déoxy-thymidines (elles facilitent la synthèse des siARN et permet une protection contre les nucléases). Leur pourcentage en GC doit être compris entre 40 et 55 %, ils ne doivent pas contenir de répétitions de T, A ou bien G, et si possible doivent posséder une purine après les deux A en 5' qui permet une meilleure initialisation pour l'ARN polymérase III. Les siARN ne doivent pas contenir de site de coupe BglIII afin de permettre leur insertion dans le vecteur de clonage pSUPER. Enfin, ils ne doivent pas cibler les régions proches des séquences d'initiation ou de terminaison de la traduction du gène ciblé. Afin d'être insérés dans le génome de façon stable, les siARN sont insérés de façon à être transcrits sous forme d'une cassette en tige-boucle (Figure 73) à l'aide de vecteurs lentiviraux.

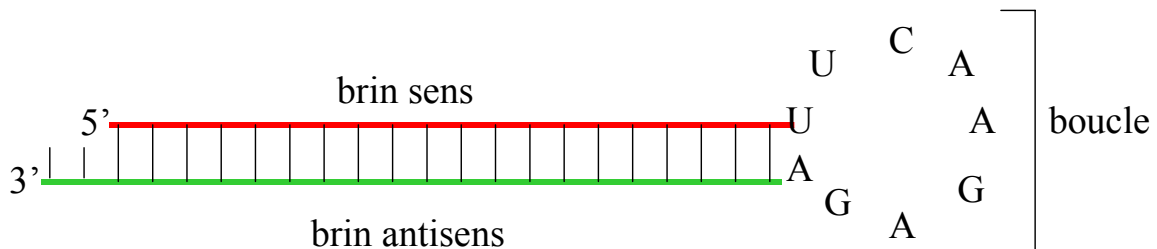


Figure 73: schéma de la structure tige-boucle d'un siARN.

Afin de permettre l'insertion des siARN dans les vecteurs lentiviraux, les structures en cassettes sont d'abord clonées dans le vecteur de clonage pSUPER. Chaque structure en cassette est donc constituée des sites de coupures spécifiques BglIII et HindIII, et sont constituées d'un brin sens et antisens chacun de 64 nucléotides (Figure 74).

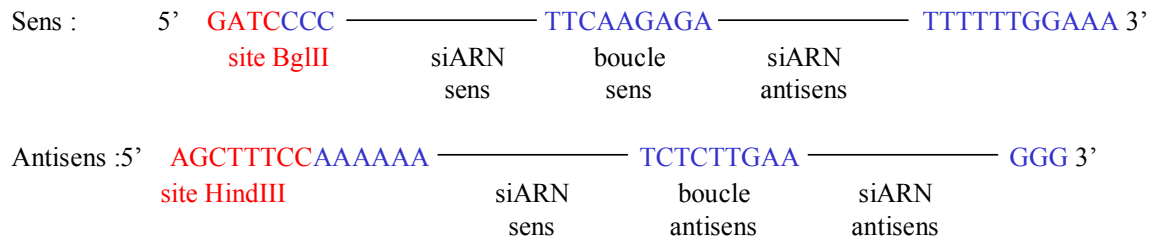


Figure 74: Schéma des séquences nucléotidiques codant pour les cassettes d'expression des siARN.

Pour chaque gène ciblé, trois séquences de siARN différentes ont été choisies afin d'augmenter les chances d'extinction de l'expression, exceptée pour le contrôle négatif ciblant le gène de la β 2-microglobuline dont la séquence nous a été fournie par le professeur Richard Breathnach. Les séquences sens et antisens des siARN de chaque gène cible sont présentées ci-dessous (Tableau 14):

<i>Nom</i>	<i>Brin sens (5'-3')</i>	<i>Brin antisens (5'-3')</i>
S1P1.1	GCCTGGATCACTCATCGAATT	TTCGATGAGTGATCCAGGCTT
S1P1.2	ACGTCAACTCTTCTTCCTATT	TAGGAAGAAGAGTTGACGTTT
S1P1.3	GGTCTAGCATTGTCAAGCTTT	AGCTTGACAATGCTAGACCTT
S1P3.1	GGTCAACATTCTGATGTCCTT	AGACATCAGAATGTTGACCTT
S1P3.2	TTAGCTGGATGCGATAGCATT	TGCTATCGCATCCAGCTAATT
S1P3.3	TGTGCACCAATATGCCTAATT	TTAGGCATATTGGTGCACATT
S1P5.1	CAAGGTCCAGGAACACTATTT	ATAGTGTTCTGACCTTGTT
S1P5.2	GGTCCAGGAACACTATAATTT	ATTATAGTGTTCTGACCTT
S1P5.3	GACGGTCACCATCGTGCTATT	TAGCACGATGGTGACCGTCTT
β 2-microglobuline	AGTGGAGCATTCAGACTTGTT	CAAGTCTGAATGCTCCACTTT

Tableau 14: Séquences sens et antisens des siARN.

VI.3.1.2. Insertion des duplex siARN dans le plasmide pSUPER

Les duplex siARN sont formés en les mélangeant à quantité égale puis en les hybridant 2 h à 70°C après une dénaturation de 10 min à 100°C. La ligation de pSUPER (Tableau 15) et des duplex siARN a lieu sur la nuit à 4°C avec l'enzyme T4 DNA ligase (Invitrogen) après une digestion au préalable du plasmide pSUPER par les enzymes de restriction BglIII et HindIII. Les produits de ligation sont précipités en éthanol 100 % et NaCl 5M puis électroporés dans les bactéries de souche KL1 qui sont ensuite étalées sur milieu nutritif 2XTY et incubées à 37°C sur la nuit.

<i>Plasmide</i>	<i>Génotype et description</i>	<i>Référence</i>
pSUPER	promoteur H1, origines pUC et fl(+), séquences T3, T7, M13 et M13(20) et M13 reverse, bla (gène de résistance à l'ampicilline)	Invitrogen
pFG12	dérivé de FUGW (Lois et al ; 2002 ;Science 259 :868) avec réarrangements des sites de clonages. Code pour le protéine fluorescente GFP.	[Qin <i>et al.</i> , 2003]
pLP1	Promoteur CMV, intron β -globine humaine, gag et pol HIV-1, RRE, signal de polyadénylation de β -globine humaine, origine pUC, bla + promoteur	Invitrogen
pLP2	Promoteur RSV, ORF Rev HIV-1, signal de polyadénylation LTR HIV-1, origine pUC, bla + promoteur	Invitrogen
pLP/VSV-G	Promoteur CMV, intron β -globine humaine, glycoprotéine VSV-G, signal de polyadénylation de β -globine humaine, origine pUC, bla + promoteur	Invitrogen

Tableau 15 : Liste des plasmides utilisés pour le clonage des siARN et la production des particules virales porteuses des siARN.

VI.3.1.3. Vérification du plasmide pSUPER-siARN

Pour chaque électroporation, 12 colonies sont mises à pousser en milieu 2XTY sur la nuit et des minipréparations plasmidiques sont réalisées avec le kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) selon les instruction du constructeur. Des PCR sont ensuite réalisées avec les amorces T3 et T7 afin de vérifier l'insertion du siARN dans le plasmide pSUPER, et les produits de PCR sont envoyés au séquençage (collaboration avec le plateau technique du CHU de Nantes).

VI.3.2. Préparation des plasmides lentiviraux pFG12-siARN, pLP1, pLP2 et pLP/VSV-G

Les clones positifs pSUPER-siARN sont digérés par les enzymes de restriction XbaI et XhoI ainsi que le plasmide lentiviral pFG12 (Tableau 15; fourni par le professeur Richard Breathnach), et la ligation a lieu sur la nuit à 4°C avec l'enzyme T4 DNA ligase (Invitrogen). Après la ligation, une digestion des plasmides par l'enzyme HpaI a lieu afin d'éliminer les vecteurs qui n'ont pas incorporés les siARN. Les ligations sont enfin introduites dans les bactéries XL10 par choc thermique de 2 min à 42°C. Les XL10 sont enfin étalées sur milieu nutritif 2XTY et incubées à 37°C sur la nuit.

Les plasmides pLP1 (codant pour les protéines de la capsid virale GAG et POL), pLP2 (codant pour la protéine de régulation virale REV), pLP/VSV-G (codant pour la glycoprotéine d'infection) (Tableau 15), et enfin les plasmides pFG12-siARN sont amplifiés par maxipréparation avec le kit Plasmid Maxi Kit selon les instructions du constructeur.

VI.3.3. Production des particules virales

VI.3.3.1. Transfection au phosphate de calcium et productions virales

Les cellules 293 FT servant à l'encapsidation des virus sontensemencées la veille de la transfection à 3.10^6 cellules par boîte de 100 mm. Le mélange CaCl_2 2,5M 20 X, HBS (NaCl 280 mM, Na_2HPO_4 1,5 mM, Hepes 50 mM, pH 7,05) 2X et 3 μg de maxipréparation de chacun des plasmides pFG12-siARN, pLP1, pLP2 et pLP/VSV-G est incubé 30 min à température ambiante avant d'être déposé goutte à goutte sur les cellules. Six heures après la transfection, le milieu de culture des 293 FT est changé pour du milieu frais. Les surnageant sont récupérés 48 h après les transfusions, et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 2500 rpm, 5 min. Les surnageants sont alors filtrés sur filtres $0,45\mu\text{m}$ puis ultracentrifugés à 25 000 rpm, 1 h 30 min à 4°C . Les culots sont repris dans du PBS et concentrés 500 fois.

VI.3.3.2. Titration des particules virales

La titration virale a lieu sur cellules 293 FT. La veille de la titration les cellules sontensemencées à 50 000 cellules par puit. Le jour de l'infection, les cellules sont comptées, et une gamme de dilution de particules virales est déposée dans le surnageant. Les cellules sont passées au Facs 72 h après l'infection. Sachant que les 293 FT ont une MOI de 1, c'est à dire qu'une seule particule virale par cellule suffit, le pourcentage de cellules 293 FT fluorescentes permet de déterminer le titre des solutions virales.

VI.3.3.3 Détermination de la MOI des HMEC-1

On procède de la même façon avec les HMEC-1 que pour la titration virale sur les 293 FT. Etant donné que le titre de la solution en particules virales est connu, on peut déduire du

pourcentage de cellules HMEC-1 fluorescentes le nombre de particules virales nécessaires pour qu'une cellule devienne verte, et donc intègre le siARN.

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abbassi, O., T. K. Kishimoto, L. V. McIntire, D. C. Anderson, and C. W. Smith. 1993. E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *J Clin Invest* 92: 2719-30.
- Abend, M., K. P. Gilbertz, A. Rhein, and D. van Beuningen. 1996. Early and late G2 arrest of cells undergoing radiation-induced apoptosis or micronucleation. *Cell Prolif* 29: 101-13.
- Acker, J. C., L. B. Marks, D. P. Spencer, W. Yang, M. A. Avery, R. K. Dodge, G. L. Rosner, and M. W. Dewhirst. 1998. Serial in vivo observations of cerebral vasculature after treatment with a large single fraction of radiation. *Radiat Res* 149: 350-9.
- Ades, E. W., F. J. Candal, R. A. Swerlick, V. G. George, S. Summers, D. C. Bosse, and T. J. Lawley. 1992. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 99: 683-90.
- Albanese, J., and N. Dainiak. 2000a. Ionizing radiation alters Fas antigen ligand at the cell surface and on exfoliated plasma membrane-derived vesicles: implications for apoptosis and intercellular signaling. *Radiat Res* 153: 49-61.
- Albanese, J., and N. Dainiak. 2000b. Regulation of TNFRSF6 (Fas) expression in ataxia telangiectasia cells by ionizing radiation. *Radiat Res* 154: 616-24.
- Albanese, J., and N. Dainiak. 2003. Modulation of intercellular communication mediated at the cell surface and on extracellular, plasma membrane-derived vesicles by ionizing radiation. *Exp Hematol* 31: 455-64.
- Albert, J. M., C. Cao, L. Geng, L. Leavitt, D. E. Hallahan, and B. Lu. 2006. Integrin alpha v beta 3 antagonist Cilengitide enhances efficacy of radiotherapy in endothelial cell and non-small-cell lung cancer models. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65: 1536-43.
- Aldridge, D. R., and I. R. Radford. 1998. Explaining differences in sensitivity to killing by ionizing radiation between human lymphoid cell lines. *Cancer Res* 58: 2817-24.
- Allende, M. L., T. Sasaki, H. Kawai, A. Olivera, Y. Mi, G. van Echten-Deckert, R. Hajdu, M. Rosenbach, C. A. Keohane, S. Mandala, S. Spiegel, and R. L. Proia. 2004. Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720. *J Biol Chem* 279: 52487-92.
- Alper, T. 1977. The role of membrane damage in radiation-induced cell death. *Adv Exp Med Biol* 84: 139-65.
- Ancellin, N., C. Colmont, J. Su, Q. Li, N. Mittereder, S. S. Chae, S. Stefansson, G. Liau, and T. Hla. 2002. Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation. *J Biol Chem* 277: 6667-75.
- Anderson, R. G., and K. Jacobson. 2002. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296: 1821-5.
- Anderson, T. J. 1999. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* 34: 631-8.
- Andrews, D. W., C. B. Scott, P. W. Sperduto, A. E. Flanders, L. E. Gaspar, M. C. Schell, M. Werner-Wasik, W. Demas, J. Ryu, J. P. Bahary, L. Souhami, M. Rotman, M. P. Mehta, and W. J. Curran, Jr. 2004. Whole brain radiation therapy with or without stereotactic radiosurgery boost for patients with one to three brain metastases: phase III results of the RTOG 9508 randomised trial. *Lancet* 363: 1665-72.
- Anelli, V., R. Bassi, G. Tettamanti, P. Viani, and L. Riboni. 2005. Extracellular release of newly synthesized sphingosine-1-phosphate by cerebellar granule cells and astrocytes. *J Neurochem* 92: 1204-15.
- Arar, M., M. Levi, and M. Baum. 1994. Maturation effects of glucocorticoids on neonatal brush-border membrane phosphate transport. *Pediatr Res* 35: 474-8.

- Argraves, K. M., B. A. Wilkerson, W. S. Argraves, P. A. Fleming, L. M. Obeid, and C. J. Drake. 2004. Sphingosine-1-phosphate signaling promotes critical migratory events in vasculogenesis. *J Biol Chem* 279: 50580-90.
- Aubin, I., C. P. Adams, S. Opsahl, D. Septier, C.E. Bishop, N. Auge, R. Salvayre, A. Negre-Salvayre, M. Goldberg, J.L. Guenet, and C. Poirier. 2005. A deletion in the gene encoding sphingomyelin phosphodiesterase 3 (Smpd3) results in osteogenesis and dentinogenesis imperfecta in the mouse. *Nat Genet* 37(8): 803-5.
- Auge, N., M. Nikolova-Karakashian, S. Carpentier, S. Parthasarathy, A. Negre-Salvayre, R. Salvayre, A. H. Merrill, Jr., and T. Levade. 1999. Role of sphingosine 1-phosphate in the mitogenesis induced by oxidized low density lipoprotein in smooth muscle cells via activation of sphingomyelinase, ceramidase, and sphingosine kinase. *J Biol Chem* 274: 21533-8.
- Ausprunk, D. H., and J. Folkman. 1977. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 14: 53-65.
- Azzam, E. I., S. M. de Toledo, T. Gooding, and J.B. Little. 1998. Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Radiat Res* 150(5): 497-504.
- Ballou, L. R., C. P. Chao, M. A. Holness, S. C. Barker, and R. Raghov. 1992. Interleukin-1-mediated PGE2 production and sphingomyelin metabolism. Evidence for the regulation of cyclooxygenase gene expression by sphingosine and ceramide. *J Biol Chem* 267: 20044-50.
- Ballou, L. R., S. J. Lauderkind, E. F. Rosloniec, and R. Raghov. 1996. Ceramide signalling and the immune response. *Biochim Biophys Acta* 1301: 273-87.
- Barnholz, Y., A. Roitman, and S. Gatt. 1966. Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. II. Hydrolysis of sphingomyelin by an enzyme from rat brain. *J Biol Chem* 241: 3731-7.
- Becker, J. C., C. Muller-Tidow, H. Serve, W. Domschke, and T. Pohle. 2006. Role of receptor tyrosine kinases in gastric cancer: new targets for a selective therapy. *World J Gastroenterol* 12: 3297-305.
- Belotti, D., V. Vergani, T. Drudis, P. Borsotti, M. R. Pitelli, G. Viale, R. Giavazzi, and G. Taraboletti. 1996. The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity. *Clin Cancer Res* 2: 1843-9.
- Bergers, G., R. Brekken, G. McMahon, T. H. Vu, T. Itoh, K. Tamaki, K. Tanzawa, P. Thorpe, S. Itohara, Z. Werb, and D. Hanahan. 2000. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2: 737-44.
- Bergers, G., D. Hanahan, and L. M. Coussens. 1998. Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 42: 995-1002.
- Bergers, G., S. Song, N. Meyer-Morse, E. Bergsland, and D. Hanahan. 2003. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 111: 1287-95.
- Bernier, J., E. J. Hall, and A. Giaccia. 2004. Radiation oncology: a century of achievements. *Nat Rev Cancer* 4: 737-47.
- Bonetti, P. O., L. O. Lerman, and A. Lerman. 2003. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 168-75.
- Booth, C., and C. S. Potten. 2000. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest* 105: 1493-9.
- Bornfeldt, K. E., L. M. Graves, E. W. Raines, Y. Igarashi, G. Wayman, S. Yamamura, Y. Yatomi, J. S. Sidhu, E. G. Krebs, S. Hakomori, and et al. 1995. Sphingosine-1-phosphate inhibits PDGF-induced chemotaxis of human arterial smooth muscle cells:

-
- spatial and temporal modulation of PDGF chemotactic signal transduction. *J Cell Biol* 130: 193-206.
- Boujaoude, L. C., C. Bradshaw-Wilder, C. Mao, J. Cohn, B. Ogretmen, Y. A. Hannun, and L. M. Obeid. 2001. Cystic fibrosis transmembrane regulator regulates uptake of sphingoid base phosphates and lysophosphatidic acid: modulation of cellular activity of sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem* 276: 35258-64.
- Bourguignon, M. H., P. A. Gisone, M. R. Perez, S. Michelin, D. Dubner, M. D. Giorgio, and E. D. Carosella. 2005. Genetic and epigenetic features in radiation sensitivity Part I: cell signalling in radiation response. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32: 229-46.
- Bramhall, S. R., A. Rosemurgy, P. D. Brown, C. Bowry, and J. A. Buckels. 2001. Marimastat as first-line therapy for patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 19: 3447-55.
- Brindley, D. N., and D. W. Waggoner. 1998. Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases. *J Biol Chem* 273: 24281-4.
- Browder, T., C. E. Butterfield, B. M. Kraling, B. Shi, B. Marshall, M. S. O'Reilly, and J. Folkman. 2000. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 60: 1878-86.
- Brunk, D. K., D. J. Goetz, and D. A. Hammer. 1996. Sialyl Lewis(x)/E-selectin-mediated rolling in a cell-free system. *Biophys J* 71: 2902-7.
- Bruno, A. P., G. Laurent, D. Averbek, C. Demur, J. Bonnet, A. Bettaieb, T. Levade, and J. P. Jaffrezou. 1998. Lack of ceramide generation in TF-1 human myeloid leukemic cells resistant to ionizing radiation. *Cell Death Differ* 5: 172-82.
- Burrows, F. J., and P. E. Thorpe. 1993. Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8996-9000.
- Cai, H., and D. G. Harrison. 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87: 840-4.
- Candi, E., R. Schmidt, and G. Melino. 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 328-40.
- Canman, C. E., and M. B. Kastan. 1996. Signal transduction. Three paths to stress relief. *Nature* 384: 213-4.
- Carmeliet, P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-95.
- Carmeliet, P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438: 932-6.
- Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau, and A. Nagy. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435-9.
- Carmeliet, P., and R. K. Jain. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-57.
- Carmeliet, P., M. G. Lampugnani, L. Moons, F. Breviario, V. Compernelle, F. Bono, G. Balconi, R. Spagnuolo, B. Oostuyse, M. Dewerchin, A. Zanetti, A. Angellilo, V. Mattot, D. Nuyens, E. Lutgens, F. Clotman, M. C. de Ruiter, A. Gittenberger-de Groot, R. Poelmann, F. Lupu, J. M. Herbert, D. Collen, and E. Dejana. 1999. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 98: 147-57.
- Carney, J. P., R. S. Maser, H. Olivares, E. M. Davis, M. Le Beau, J. R. Yates, 3rd, L. Hays, W. F. Morgan, and J. H. Petrini. 1998. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93: 477-86.
- Carpenter, G., and S. Cohen. 1979. Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem* 48: 193-216.
-

-
- Chae, S. S., J. H. Paik, H. Furneaux, and T. Hla. 2004. Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference. *J Clin Invest* 114: 1082-9.
- Ch'ang, H. J., J. G. Maj, F. Paris, H. R. Xing, J. Zhang, J. P. Truman, C. Cardon-Cardo, A. Haimovitz-Friedman, R. Kolesnick, and Z. Fuks. 2005. ATM regulates target switching to escalating doses of radiation in the intestines. *Nat Med* 11: 484-90.
- Chang, W. P., and J. B. Little. 1991. Delayed reproductive death in X-irradiated Chinese hamster ovary cells. *Int J Radiat Biol* 60: 483-96.
- Chatterjee, S. 1999. Neutral sphingomyelinase: past, present and future. *Chem Phys Lipids* 102: 79-96.
- Chen, Y. R., X. Wang, D. Templeton, R. J. Davis, and T. H. Tan. 1996. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem* 271: 31929-36.
- Cheng, Y., A. Nilsson, E. Tomquist, and R. D. Duan. 2002. Purification, characterization, and expression of rat intestinal alkaline sphingomyelinase. *J Lipid Res* 43: 316-24.
- Chmura, S. J., E. Nodzenski, M. A. Beckett, D. W. Kufe, J. Quintans, and R. R. Weichselbaum. 1997. Loss of ceramide production confers resistance to radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 57: 1270-5.
- Cho, C. H., R. A. Kammerer, H. J. Lee, K. Yasunaga, K. T. Kim, H. H. Choi, W. Kim, S. H. Kim, S. K. Park, G. M. Lee, and G. Y. Koh. 2004. Designed angiopoietin-1 variant, COMP-Ang1, protects against radiation-induced endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5553-8.
- Choi, O. H., J. H. Kim, and J. P. Kinet. 1996. Calcium mobilization via sphingosine kinase in signalling by the Fc epsilon RI antigen receptor. *Nature* 380: 634-6.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-9.
- Chua CW, D.T. Lee, M.T. Ling, C. Zhou, K. Man, J. Ho, F.L. Chan, X. Wang, Y.C. Wong. 2005. FTY720, a fungus metabolite, inhibits in vivo growth of androgen-independent prostate cancer. *Int J Cancer* 117(6): 1039-48.
- Chun, J., E. J. Goetzl, T. Hla, Y. Igarashi, K. R. Lynch, W. Moolenaar, S. Pyne, and G. Tigyi. 2002. International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 54: 265-9.
- Claesson-Welsh, L., M. Welsh, N. Ito, B. Anand-Apte, S. Soker, B. Zetter, M. O'Reilly, and J. Folkman. 1998. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5579-83.
- Cobleigh, M. A., V. K. Langmuir, G. W. Sledge, K. D. Miller, L. Haney, W. F. Novotny, J. D. Reimann, and A. Vassel. 2003. A phase I/II dose-escalation trial of bevacizumab in previously treated metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 30: 117-24.
- Coroneos, E., Y. Wang, J. R. Panuska, D. J. Templeton, and M. Kester. 1996. Sphingolipid metabolites differentially regulate extracellular signal-regulated kinase and stress-activated protein kinase cascades. *Biochem J* 316 (Pt 1): 13-7.
- Couturier, O., S. Supiot, M. Degraef-Mougin, A. Faivre-Chauvet, T. Carlier, J. F. Chatal, F. Davodeau, and M. Cherel. 2005. Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32: 601-14.
- Cremesti, A., F. Paris, H. Grassme, N. Holler, J. Tschopp, Z. Fuks, E. Gulbins, and R. Kolesnick. 2001. Ceramide enables fas to cap and kill. *J Biol Chem* 276: 23954-61.
- Cuvillier, O., G. Pirianov, B. Kleuser, P. G. Vanek, O. A. Coso, S. Gutkind, and S. Spiegel. 1996. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381: 800-3.
-

- Cuvillier, O., D. S. Rosenthal, M. E. Smulson, and S. Spiegel. 1998. Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas- and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *J Biol Chem* 273: 2910-6.
- Dasika, G. K., S. C. Lin, S. Zhao, P. Sung, A. Tomkinson, and E. Y. Lee. 1999. DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* 18: 7883-99.
- Dbaibo, G. S., M. Y. Pushkareva, R. A. Rachid, N. Alter, M. J. Smyth, L. M. Obeid, and Y. A. Hannun. 1998. p53-dependent ceramide response to genotoxic stress. *J Clin Invest* 102: 329-39.
- Decaudin, D., S. Geley, T. Hirsch, M. Castedo, P. Marchetti, A. Macho, R. Kofler, and G. Kroemer. 1997. Bcl-2 and Bcl-XL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 57: 62-7.
- Dejana, E., M. G. Lampugnani, O. Martinez-Estrada, and G. Bazzoni. 2000. The molecular organization of endothelial junctions and their functional role in vascular morphogenesis and permeability. *Int J Dev Biol* 44: 743-8.
- Demarcq, C., R. T. Bunch, D. Creswell, and A. Eastman. 1994. The role of cell cycle progression in cisplatin-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *Cell Growth Differ* 5: 983-93.
- Devary, Y., C. Rosette, J. A. DiDonato, and M. Karin. 1993. NF-kappa B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. *Science* 261: 1442-5.
- Dewey, W. C., C. C. Ling, and R. E. Meyn. 1995. Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 33: 781-96.
- Dickson, M. C., J. S. Martin, F. M. Cousins, A. B. Kulkarni, S. Karlsson, and R. J. Akhurst. 1995. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* 121: 1845-54.
- Dimitrievich, G. S., K. Fischer-Dzoga, and M. L. Griem. 1984. Radiosensitivity of vascular tissue. I. Differential radiosensitivity of capillaries: a quantitative in vivo study. *Radiat Res* 99: 511-35.
- Dobrowsky, R. T., and Y. A. Hannun. 1992. Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase. *J Biol Chem* 267: 5048-51.
- Durant, S. T., and J. A. Nickoloff. 2005. Good timing in the cell cycle for precise DNA repair by BRCA1. *Cell Cycle* 4: 1216-22.
- Easton, J. B., and P. J. Houghton. 2006. mTOR and cancer therapy. *Oncogene* 25: 6436-46.
- Edsall, L. C., G. G. Pirianov, and S. Spiegel. 1997. Involvement of sphingosine 1-phosphate in nerve growth factor-mediated neuronal survival and differentiation. *J Neurosci* 17: 6952-60.
- Edsall, L. C., and S. Spiegel. 1999. Enzymatic measurement of sphingosine 1-phosphate. *Anal Biochem* 272: 80-6.
- Egeblad, M., and Z. Werb. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2: 161-74.
- Ehrmann, R. L., and M. Knoth. 1968. Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy. *J Natl Cancer Inst* 41: 1329-41.
- El-Deiry, W. S. 2003. The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene* 22: 7486-95.
- Elkind, M. M., H. Sutton-Gilbert, W. B. Moses, T. Alescio, and R. W. Swain. 1965. Radiation Response of Mammalian Cells Grown in Culture. V. Temperature Dependence of the Repair of X-Ray Damage in Surviving Cells (Aerobic and Hypoxic). *Radiat Res* 25: 359-76.

-
- Engerman, R. L., D. Pfaffenbach, and M. D. Davis. 1967. Cell turnover of capillaries. *Lab Invest* 17: 738-43.
- English, D., Z. Welch, A. T. Kovala, K. Harvey, O. V. Volpert, D. N. Brindley, and J. G. Garcia. 2000. Sphingosine 1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis. *Faseb J* 14: 2255-65.
- Fan, Z., B. Y. Shang, Y. Lu, J. L. Chou, and J. Mendelsohn. 1997. Reciprocal changes in p27(Kip1) and p21(Cip1) in growth inhibition mediated by blockade or overstimulation of epidermal growth factor receptors. *Clin Cancer Res* 3: 1943-8.
- Favaudon, V. 2000. [Regulation of cell cycle and radiation-induced cell death]. *Cancer Radiother* 4: 355-68.
- Ferrara, N. 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 25: 581-611.
- Ferrara, N., K. Carver-Moore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K. S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K. J. Hillan, and M. W. Moore. 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380: 439-42.
- Ferrara, N., K. J. Hillan, H. P. Gerber, and W. Novotny. 2004. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 3: 391-400.
- Fertil, B., and E. P. Malaise. 1985. Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: analysis of 101 published survival curves. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11: 1699-707.
- Finlay, C. A., P. W. Hinds, and A. J. Levine. 1989. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57: 1083-93.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-11.
- Fischer-Dzoga, K., G. S. Dimitrievich, and M. L. Griem. 1984. Radiosensitivity of vascular tissue. II. Differential radiosensitivity of aortic cells in vitro. *Radiat Res* 99: 536-46.
- Folkman, J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-6.
- Folkman, J. 1995a. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1: 27-31.
- Folkman, J. 1995b. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 333: 1757-63.
- Folkman, J., and K. Camphausen. 2001. Cancer. What does radiotherapy do to endothelial cells? *Science* 293: 227-8.
- Frankenberg-Schwager, M. 1989. Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. *Radiother Oncol* 14: 307-20.
- French, K. J., R. S. Schrecengost, B. D. Lee, Y. Zhuang, S. N. Smith, J. L. Eberly, J. K. Yun, and C. D. Smith. 2003. Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res* 63: 5962-9.
- French, K. J., J. J. Upson, S. N. Keller, Y. Zhuang, J. K. Yun, and C. D. Smith. 2006. Antitumor activity of sphingosine kinase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 596-603.
- Friedberg, E. C., G. C. Walker and W. Siede. 1995. *DNA Repair and Mutagenesis* ASM Press, Washington.
- Friedman, M., U. S. Ryan, W. C. Davenport, E. L. Chaney, D. L. Strickland, and L. Kwock. 1986. Reversible alterations in cultured pulmonary artery endothelial cell monolayer morphology and albumin permeability induced by ionizing radiation. *J Cell Physiol* 129: 237-49.
-

- Fuks, Z., A. Haimovitz-Friedman, and R. N. Kolesnick. 1995. The role of the sphingomyelin pathway and protein kinase C in radiation-induced cell kill. *Important Adv Oncol*: 19-31.
- Fuks, Z., R. S. Persaud, A. Alfieri, M. McLoughlin, D. Ehleiter, J. L. Schwartz, A. P. Seddon, C. Cordon-Cardo, and A. Haimovitz-Friedman. 1994. Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death in vitro and in vivo. *Cancer Res* 54: 2582-90.
- Fukuda, Y., A. Kihara, and Y. Igarashi. 2003. Distribution of sphingosine kinase activity in mouse tissues: contribution of SPHK1. *Biochem Biophys Res Commun* 309: 155-60.
- Fulda, S., and K. M. Debatin. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25: 4798-811.
- Gajdusek, C., K. Onoda, S. London, M. Johnson, R. Morrison, and M. Mayberg. 2001. Early molecular changes in irradiated aortic endothelium. *J Cell Physiol* 188: 8-23.
- Garcia, J. G., F. Liu, A. D. Verin, A. Birukova, M. A. Dechert, W. T. Gerthoffer, J. R. Bamberg, and D. English. 2001. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest* 108: 689-701.
- Garcia-Barros, M., D. Lacorazza, H. Petrie, A. Haimovitz-Friedman, C. Cardon-Cardo, S. Nimer, Z. Fuks, and R. Kolesnick. 2004. Host acid sphingomyelinase regulates microvascular function not tumor immunity. *Cancer Res* 64: 8285-91.
- Garcia-Barros, M., F. Paris, C. Cordon-Cardo, D. Lyden, S. Rafii, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks, and R. Kolesnick. 2003. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 300: 1155-9.
- Garcia-Ruiz, C., A. Colell, M. Mari, A. Morales, and J. C. Fernandez-Checa. 1997. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem* 272: 11369-77.
- Gaugler, M. H. 2005. A unifying system: does the vascular endothelium have a role to play in multi-organ failure following radiation exposure? *Br J Radiol* Supplement 27: 100-105.
- Gaugler, M. H., C. Squiban, M. Claraz, K. Schweitzer, B. Weksler, P. Gourmelon, and A. Van der Meeren. 1998. Characterization of the response of human bone marrow endothelial cells to in vitro irradiation. *Br J Haematol* 103: 980-9.
- Gaugler, M. H., M. Neunlist, S. Bonnaud, P. Aubert, M. Benderitter, and F. Paris. 2007. Intestinal Epithelial Cell Dysfunction is Mediated by an Endothelial-Specific Radiation-Induced Bystander Effect. *Radiat Res* 167:000-000.
- Gerber, H. P., A. K. Malik, G. P. Solar, D. Sherman, X. H. Liang, G. Meng, K. Hong, J. C. Marsters, and N. Ferrara. 2002. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 417: 954-8.
- Ghosh, N., R. Sabbadini, and S. Chatterjee. 1998. Identification, partial purification, and localization of a neutral sphingomyelinase in rabbit skeletal muscle: neutral sphingomyelinase in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 189: 161-8.
- Ghosh, T. K., J. Bian, and D. L. Gill. 1990. Intracellular calcium release mediated by sphingosine derivatives generated in cells. *Science* 248: 1653-6.
- Ghosh, T. K., J. Bian, and D. L. Gill. 1994. Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium. *J Biol Chem* 269: 22628-35.
- Glade Bender, J., E. M. Cooney, J. J. Kandel, and D. J. Yamashiro. 2004. Vascular remodeling and clinical resistance to antiangiogenic cancer therapy. *Drug Resist Updat* 7: 289-300.

- Goetz, D. J., D. M. Greif, H. Ding, R. T. Camphausen, S. Howes, K. M. Comess, K. R. Snapp, G. S. Kansas, and F. W. Luscinskas. 1997. Isolated P-selectin glycoprotein ligand-1 dynamic adhesion to P- and E-selectin. *J Cell Biol* 137: 509-19.
- Goldenberg, D. M. 2002. Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *J Nucl Med* 43: 693-713.
- Goodemote, K. A., M. E. Mattie, A. Berger, and S. Spiegel. 1995. Involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein in the mitogenic signaling pathways of sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem* 270: 10272-7.
- Gossmann, A., T. H. Helbich, S. Mesiano, D. M. Shames, M. F. Wendland, T. P. Roberts, N. Ferrara, R. B. Jaffe, and R. C. Brasch. 2000. Magnetic resonance imaging in an experimental model of human ovarian cancer demonstrating altered microvascular permeability after inhibition of vascular endothelial growth factor. *Am J Obstet Gynecol* 183: 956-63.
- Graeler, M., G. Shankar, and E. J. Goetzl. 2002. Cutting edge: suppression of T cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate. *J Immunol* 169: 4084-7.
- Graler, M. H., and E. J. Goetzl. 2002. Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity. *Biochim Biophys Acta* 1582: 168-74.
- Grassme, H., A. Jekle, A. Riehle, H. Schwarz, J. Berger, K. Sandhoff, R. Kolesnick, and E. Gulbins. 2001. CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 276: 20589-96.
- Green, D. R., and J. C. Reed. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-12.
- Greenblatt, M., and P. Shubi. 1968. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst* 41: 111-24.
- Gulbins, E., and R. Kolesnick. 2003. Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene* 22: 7070-7.
- Gutheil, J. C., T. N. Campbell, P. R. Pierce, J. D. Watkins, W. D. Huse, D. J. Bodkin, and D. A. Cheresh. 2000. Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin $\alpha v \beta 3$. *Clin Cancer Res* 6: 3056-61.
- Haimovitz-Friedman, A. 1998. Radiation-induced signal transduction and stress response. *Radiat Res* 150: S102-8.
- Haimovitz-Friedman, A., N. Balaban, M. McLoughlin, D. Ehleiter, J. Michaeli, I. Vlodaysky, and Z. Fuks. 1994a. Protein kinase C mediates basic fibroblast growth factor protection of endothelial cells against radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 54: 2591-7.
- Haimovitz-Friedman, A., C. Cordon-Cardo, S. Bayoumy, M. Garzotto, M. McLoughlin, R. Gallily, C. K. Edwards, 3rd, E. H. Schuchman, Z. Fuks, and R. Kolesnick. 1997a. Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. *J Exp Med* 186: 1831-41.
- Haimovitz-Friedman, A., C. C. Kan, D. Ehleiter, R. S. Persaud, M. McLoughlin, Z. Fuks, and R. N. Kolesnick. 1994b. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med* 180: 525-35.
- Haimovitz-Friedman, A., R. N. Kolesnick, and Z. Fuks. 1997b. Differential inhibition of radiation-induced apoptosis. *Stem Cells* 15 Suppl 2: 43-7.
- Halicka, H. D., K. Seiter, E. J. Feldman, F. Traganos, A. Mittelman, T. Ahmed, and Z. Darzynkiewicz. 1997. Cell cycle specificity of apoptosis during treatment of leukaemias. *Apoptosis* 2: 25-39.
- Hallahan, D. E., and S. Virudachalam. 1997. Intercellular adhesion molecule 1 knockout abrogates radiation induced pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6432-7.

-
- Hanai, J., M. Dhanabal, S. A. Karumanchi, C. Albanese, M. Waterman, B. Chan, R. Ramchandran, R. Pestell, and V. P. Sukhatme. 2002. Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1. *J Biol Chem* 277: 16464-9.
- Hancke K, O. Strauch, C. Kissel, H. Gobel, W. Schafer, and D. Denschlag. 2006. Sphingosine 1-phosphate protects ovaries from chemotherapy-induced damage in vivo. *Fertil Steril* Oct 31. Epub ahead of print.
- Hannun, Y. A. 1996. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 274: 1855-9.
- Hannun, Y. A., and L. M. Obeid. 1995. Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem Sci* 20: 73-7.
- Hari, D., M. A. Beckett, V. P. Sukhatme, M. Dhanabal, E. Nodzenski, H. Lu, H. J. Mauceri, D. W. Kufe, and R. R. Weichselbaum. 2000. Angiostatin induces mitotic cell death of proliferating endothelial cells. *Mol Cell Biol Res Commun* 3: 277-82.
- Hartwell, L. H., and T. A. Weinert. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-34.
- Hasanzadeh, H., A. Sharafi, M. Allah Verdi, and A. Nikoofar. 2006. Assessment of absorbed dose to thyroid, parotid and ovaries in patients undergoing Gamma Knife radiosurgery. *Phys Med Biol* 51: 4375-83.
- Hattori, K., B. Heissig, Y. Wu, S. Dias, R. Tejada, B. Ferris, D. J. Hicklin, Z. Zhu, P. Bohlen, L. Witte, J. Hendrikx, N. R. Hackett, R. G. Crystal, M. A. Moore, Z. Werb, D. Lyden, and S. Rafii. 2002. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* 8: 841-9.
- Heddle, J. A., and A. V. Carrano. 1977. The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutat Res* 44: 63-9.
- Heller, R. A., and M. Kronke. 1994. Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *J Cell Biol* 126: 5-9.
- Hicklin, D. J., and L. M. Ellis. 2005. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 23: 1011-27.
- Hirama, T., S. Tanosaki, S. Kandatsu, N. Kuroiwa, T. Kamada, H. Tsuji, S. Yamada, H. Katoh, N. Yamamoto, H. Tsujii, G. Suzuki, and M. Akashi. 2003. Initial medical management of patients severely irradiated in the Tokai-mura criticality accident. *Br J Radiol* 76: 246-53.
- Hla, T. 2003. Signaling and biological actions of sphingosine 1-phosphate. *Pharmacol Res* 47: 401-7.
- Hla, T. 2004. Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate. *Semin Cell Dev Biol* 15: 513-20.
- Hla, T., M. J. Lee, N. Ancellin, J. H. Paik, and M. J. Kluk. 2001. Lysophospholipids--receptor revelations. *Science* 294: 1875-8.
- Hla, T., and T. Maciag. 1990. An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 265: 9308-13.
- Hobson, B., and J. Denekamp. 1984. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer* 49: 405-13.
- Hofmann, K., S. Tomiuk, G. Wolff, and W. Stoffel. 2000. Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11): 5895-900.
- Holopainen, J. M., M. Subramanian, and P. K. Kinnunen. 1998. Sphingomyelinase induces lipid microdomain formation in a fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin membrane. *Biochemistry* 37: 17562-70.
-

- Houchen, C. W., R. J. George, M. A. Sturmoski, and S. M. Cohn. 1999. FGF-2 enhances intestinal stem cell survival and its expression is induced after radiation injury. *Am J Physiol* 276: G249-58.
- Huber, R. M., M. Flentje, M. Schmidt, B. Pollinger, H. Gosse, J. Willner, and K. Ulm. 2006. Simultaneous chemoradiotherapy compared with radiotherapy alone after induction chemotherapy in inoperable stage IIIA or IIIB non-small-cell lung cancer: study CTRT99/97 by the Bronchial Carcinoma Therapy Group. *J Clin Oncol* 24: 4397-404.
- Hwang, A., A. Maity, W. G. McKenna, and R. J. Muschel. 1995. Cell cycle-dependent regulation of the cyclin B1 promoter. *J Biol Chem* 270: 28419-24.
- Igarashi, Y., and Y. Yatomi. 1998. Sphingosine 1-phosphate is a blood constituent released from activated platelets, possibly playing a variety of physiological and pathophysiological roles. *Acta Biochim Pol* 45: 299-309.
- Ishiai, M., M. Kimura, K. Namikoshi, M. Yamazoe, K. Yamamoto, H. Arakawa, K. Agematsu, N. Matsushita, S. Takeda, J. M. Buerstedde, and M. Takata. 2004. DNA cross-link repair protein SNM1A interacts with PIAS1 in nuclear focus formation. *Mol Cell Biol* 24: 10733-41.
- Ishii, I., X. Ye, B. Friedman, S. Kawamura, J. J. Contos, M. A. Kingsbury, A. H. Yang, G. Zhang, J. H. Brown, and J. Chun. 2002. Marked perinatal lethality and cellular signaling deficits in mice null for the two sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors, S1P(2)/LP(B2)/EDG-5 and S1P(3)/LP(B3)/EDG-3. *J Biol Chem* 277: 25152-9.
- Iwamoto, K., N. Shinomiya, and H. Mochizuki. 1999. Different cell cycle mechanisms between UV-induced and X-ray-induced apoptosis in WiDr colorectal carcinoma cells. *Apoptosis* 4: 59-66.
- Jackson, S. P. 1997. DNA-dependent protein kinase. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 935-8.
- Jackson, S. P., and P. A. Jeggo. 1995. DNA double-strand break repair and V(D)J recombination: involvement of DNA-PK. *Trends Biochem Sci* 20: 412-5.
- Jaffrezou, J. P., A. P. Bruno, A. Moisan, T. Levade, and G. Laurent. 2001. Activation of a nuclear sphingomyelinase in radiation-induced apoptosis. *Faseb J* 15: 123-133.
- Jaffrezou, J. P., and G. Laurent. 2004. Ceramide : A New Target in Anticancer Research? *Bull Cancer* 91: E133-61.
- Jaffrezou, J. P., T. Levade, A. Bettaieb, N. Andrieu, C. Bezombes, N. Maestre, S. Vermeersch, A. Rousse, and G. Laurent. 1996. Daunorubicin-induced apoptosis: triggering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis. *Embo J* 15: 2417-24.
- Jahnukainen, K., M. Hou, M. Parvinen, S. Eksborg, and O. Soder. 2000. Stage-specific inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis and induction of apoptosis by antracyclines in cultured rat spermatogenic cells. *Biol Reprod* 63: 482-7.
- Jain, R. K. 2005. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307: 58-62.
- Jangati, G. R., R. Veluthakal, and A. Kowluru. 2006. siRNA-mediated depletion of endogenous protein phosphatase 2A α markedly attenuates ceramide-activated protein phosphatase activity in insulin-secreting INS-832/13 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 649-52.
- Jerezek-Fossa, B. A., M. Krengli, and R. Orecchia. 2006. Particle beam radiotherapy for head and neck tumors: radiobiological basis and clinical experience. *Head Neck* 28(8): 750-60.
- Johnson, K. R., K. P. Becker, M. M. Facchinetti, Y. A. Hannun, and L. M. Obeid. 2002. PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. Extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). *J Biol Chem* 277: 35257-62.

-
- Jonathan, E. C., E. J. Bernhard, and W. G. McKenna. 1999. How does radiation kill cells? *Curr Opin Chem Biol* 3: 77-83.
- Jordan, M. A., K. Wendell, S. Gardiner, W. B. Derry, H. Copp, and L. Wilson. 1996. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res* 56: 816-25.
- Kachnic, L. A., B. Wu, H. Wunsch, K. L. Mekeel, J. S. DeFrank, W. Tang, and S. N. Powell. 1999. The ability of p53 to activate downstream genes p21(WAF1/cip1) and MDM2, and cell cycle arrest following DNA damage is delayed and attenuated in scid cells deficient in the DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 274: 13111-7.
- Kappos, L., J. Antel, G. Comi, X. Montalban, P. O'Connor, C. H. Polman, T. Haas, A. A. Korn, G. Karlsson, and E. W. Radue. 2006. Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 355: 1124-40.
- Kashkar, H., K. Wiegmann, B. Yazdanpanah, D. Haubert, and M. Kronke. 2005. Acid sphingomyelinase is indispensable for UV light-induced Bax conformational change at the mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 280: 20804-13.
- Kerbel, R. S., J. Yu, J. Tran, S. Man, A. Vilorio-Petit, G. Klement, B. L. Coomber, and J. Rak. 2001. Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer Metastasis Rev* 20: 79-86.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-57.
- Khan, W. B., C. Shui, S. Ning, and S. J. Knox. 1997. Enhancement of murine intestinal stem cell survival after irradiation by keratinocyte growth factor. *Radiat Res* 148: 248-53.
- Khodarev, N. N., Y. Kataoka, J. S. Murley, R. R. Weichselbaum, and D. J. Grdina. 2004. Interaction of amifostine and ionizing radiation on transcriptional patterns of apoptotic genes expressed in human microvascular endothelial cells (HMEC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 60: 553-63.
- Kiyota, A., S. Shintani, M. Mihara, Y. Nakahara, Y. Ueyama, T. Matsumura, T. Tachikawa, and D. T. Wong. 2002. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 upregulates p27(KIP1) and p15(INK4B) and induces G1 arrest in oral squamous carcinoma cell lines. *Oncology* 63: 92-8.
- Kleuser, B., O. Cuvillier, and S. Spiegel. 1998. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits programmed cell death in HL-60 cells by activation of sphingosine kinase. *Cancer Res* 58: 1817-24.
- Kluk, M. J., and T. Hla. 2001. Role of the sphingosine 1-phosphate receptor EDG-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res* 89: 496-502.
- Kolesnick, R., and Z. Fuks. 2003. Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene* 22: 5897-906.
- Kroemer, G., W. S. El-Deiry, P. Golstein, M. E. Peter, D. Vaux, P. Vandenabeele, B. Zhivotovsky, M. V. Blagosklonny, W. Malorni, R. A. Knight, M. Piacentini, S. Nagata, and G. Melino. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2: 1463-7.
- Krut, O., K. Wiegmann, H. Kashkar, B. Yazdanpanah, and M. Kronke. 2006. Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein. *J Biol Chem* 281: 13784-93.
- Kuerbitz, S. J., B. S. Plunkett, W. V. Walsh, and M. B. Kastan. 1992. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7491-5.
- Kuwana, T., J. J. Smith, M. Muzio, V. Dixit, D. D. Newmeyer, and S. Kornbluth. 1998. Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem* 273: 16589-94.
-

-
- Lam, T. T., D. Rubin, and E. A. Drab. 1985. The effect of dexamethasone on the cytotoxic and enzymatic response of cultured endothelial cells to radiation. *Radiat Res* 103: 240-50.
- LaMontagne K, A. Littlewood-Evans, C. Schnell, T. O'Reilly, L. Wyder, T. Sanchez, B. Probst, J. Butler, A. Wood, G. Liau, E. Billy, A. Theuer, T. Hla, and J. Wood. 2006. Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization. *Cancer Res* 66(1): 221-31.
- Lane, D. P., and L. V. Crawford. 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278: 261-3.
- Langley, R. E., E. A. Bump, S. G. Quartuccio, D. Medeiros, and S. J. Braunhut. 1997. Radiation-induced apoptosis in microvascular endothelial cells. *Br J Cancer* 75: 666-72.
- Lawrence, T. S., M. A. Davis, A. Hough, and A. Rehemtulla. 2001. The role of apoptosis in 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (gemcitabine)-mediated radiosensitization. *Clin Cancer Res* 7: 314-9.
- Le Stunff, H., I. Galve-Roperh, C. Peterson, S. Milstien, and S. Spiegel. 2002a. Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis. *J Cell Biol* 158: 1039-49.
- Le Stunff, H., C. Peterson, R. Thornton, S. Milstien, S. M. Mandala, and S. Spiegel. 2002b. Characterization of murine sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase. *J Biol Chem* 277: 8920-7.
- Lee, H., E. J. Goetzl, and S. An. 2000. Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C612-8.
- Lee, M. J., S. Thangada, K. P. Claffey, N. Ancellin, C. H. Liu, M. Kluk, M. Volpi, R. I. Sha'afi, and T. Hla. 1999. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 99: 301-12.
- Lee, M. J., S. Thangada, J. H. Paik, G. P. Sapkota, N. Ancellin, S. S. Chae, M. Wu, M. Morales-Ruiz, W. C. Sessa, D. R. Alessi, and T. Hla. 2001. Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Mol Cell* 8: 693-704.
- Lee, M. J., J. R. Van Brocklyn, S. Thangada, C. H. Liu, A. R. Hand, R. Menzeleev, S. Spiegel, and T. Hla. 1998. Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* 279: 1552-5.
- Levine, A. J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-31.
- Levine, B., and D. J. Klionsky. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6: 463-77.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri, and X. Wang. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-89.
- Li, Y. Q., P. Chen, A. Haimovitz-Friedman, R. M. Reilly, and C. S. Wong. 2003. Endothelial apoptosis initiates acute blood-brain barrier disruption after ionizing radiation. *Cancer Res* 63: 5950-6.
- Liao, W. C., A. Haimovitz-Friedman, R. S. Persaud, M. McLoughlin, D. Ehleiter, N. Zhang, M. Gatei, M. Lavin, R. Kolesnick, and Z. Fuks. 1999. Ataxia telangiectasia-mutated gene product inhibits DNA damage-induced apoptosis via ceramide synthase. *J Biol Chem* 274: 17908-17.
- Licht, T., L. Tsurulnikov, H. Reuveni, T. Yarnitzky, and S. A. Ben-Sasson. 2003. Induction of pro-angiogenic signaling by a synthetic peptide derived from the second intracellular loop of S1P3 (EDG3). *Blood* 102: 2099-107.
- Limaye, V., X. Li, C. Hahn, P. Xia, M. C. Berndt, M. A. Vadas, and J. R. Gamble. 2005. Sphingosine kinase-1 enhances endothelial cell survival through a PECAM-1-
-

-
- dependent activation of PI-3K/Akt and regulation of Bcl-2 family members. *Blood* 105: 3169-77.
- Lindahl, P., B. R. Johansson, P. Leveen, and C. Betsholtz. 1997. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 277: 242-5.
- Lindahl, T., and R. D. Wood. 1999. Quality control by DNA repair. *Science* 286: 1897-905.
- Linzer, D. I., and A. J. Levine. 1979. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43-52.
- Liotta, L. A., P. S. Steeg, and W. G. Stetler-Stevenson. 1991. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64: 327-36.
- Liu, H., D. Chakravarty, M. Maceyka, S. Milstien, and S. Spiegel. 2002. Sphingosine kinases: a novel family of lipid kinases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 71: 493-511.
- Liu, H., M. Sugiura, V. E. Nava, L. C. Edsall, K. Kono, S. Poulton, S. Milstien, T. Kohama, and S. Spiegel. 2000a. Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J Biol Chem* 275: 19513-20.
- Liu, Y., R. Wada, T. Yamashita, Y. Mi, C. X. Deng, J. P. Hobson, H. M. Rosenfeldt, V. E. Nava, S. S. Chae, M. J. Lee, C. H. Liu, T. Hla, S. Spiegel, and R. L. Proia. 2000b. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest* 106: 951-61.
- Lock, R. B., and W. E. Ross. 1990. Inhibition of p34cdc2 kinase activity by etoposide or irradiation as a mechanism of G2 arrest in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 50: 3761-6.
- Luscinskas, F. W., and M. A. Gimbrone, Jr. 1996. Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leukocyte recruitment. *Annu Rev Med* 47: 413-21.
- Lyons, J. M., and N. J. Karin. 2001. A role for G protein-coupled lysophospholipid receptors in sphingolipid-induced Ca²⁺ signaling in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 16: 2035-42.
- Macaulay, V. M., K. J. O'Byrne, M. P. Saunders, J. P. Braybrooke, L. Long, F. Gleeson, C. S. Mason, A. L. Harris, P. Brown, and D. C. Talbot. 1999. Phase I study of intrapleural batimastat (BB-94), a matrix metalloproteinase inhibitor, in the treatment of malignant pleural effusions. *Clin Cancer Res* 5: 513-20.
- Maceyka, M., S. G. Payne, S. Milstien, and S. Spiegel. 2002. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585: 193-201.
- MacPhail, S. H., J. P. Banath, T. Y. Yu, E. H. Chu, H. Lambur, and P. L. Olive. 2003. Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *Int J Radiat Biol* 79: 351-8.
- Magne, N., J. L. Fischel, C. Tiffon, P. Formento, A. Dubreuil, N. Renee, J. L. Formento, M. Francoual, J. Ciccolini, M. C. Etienne, and G. Milano. 2003. Molecular mechanisms underlying the interaction between ZD1839 ('Iressa') and cisplatin/5-fluorouracil. *Br J Cancer* 89: 585-92.
- Maisin, J. R. 1970. The ultrastructure of the lung of mice exposed to a supra-lethal dose of ionizing radiation on the thorax. *Radiat Res* 44: 545-64.
- Maisonpierre, P. C., C. Suri, P. F. Jones, S. Bartunkova, S. J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T. H. Aldrich, N. Papadopoulos, T. J. Daly, S. Davis, T. N. Sato, and G. D. Yancopoulos. 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277: 55-60.
- Maj, J. G., F. Paris, A. Haimovitz-Friedman, E. Venkatraman, R. Kolesnick, and Z. Fuks. 2003. Microvascular function regulates intestinal crypt response to radiation. *Cancer Res* 63: 4338-41.
- Mandala, S. M., R. Thornton, I. Galve-Roperh, S. Poulton, C. Peterson, A. Olivera, J. Bergstrom, M. B. Kurtz, and S. Spiegel. 2000. Molecular cloning and characterization
-

- of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7859-64.
- Mandala, S. M., R. Thornton, Z. Tu, M. B. Kurtz, J. Nickels, J. Broach, R. Menzeleev, and S. Spiegel. 1998. Sphingoid base 1-phosphate phosphatase: a key regulator of sphingolipid metabolism and stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 150-5.
- Mansat, V., A. Bettaieb, T. Levade, G. Laurent, and J. P. Jaffrezou. 1997a. Serine protease inhibitors block neutral sphingomyelinase activation, ceramide generation, and apoptosis triggered by daunorubicin. *Faseb J* 11: 695-702.
- Mansat, V., G. Laurent, T. Levade, A. Bettaieb, and J. P. Jaffrezou. 1997b. The protein kinase C activators phorbol esters and phosphatidylserine inhibit neutral sphingomyelinase activation, ceramide generation, and apoptosis triggered by daunorubicin. *Cancer Res* 57: 5300-4.
- Mao, C., J. D. Saba, and L. M. Obeid. 1999. The dihydrosphingosine-1-phosphate phosphatases of *Saccharomyces cerevisiae* are important regulators of cell proliferation and heat stress responses. *Biochem J* 342 Pt 3: 667-75.
- Mao, C., M. Wadleigh, G. M. Jenkins, Y. A. Hannun, and L. M. Obeid. 1997. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* dihydrosphingosine-1-phosphate phosphatase. *J Biol Chem* 272: 28690-4.
- Marchesini, N., C. Luberto, Y.A. Hannun. 2003. Biochemical properties of mammalian neutral sphingomyelinase 2 and its role in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem* 278(16): 13775-83.
- Martin, S. J., D. D. Newmeyer, S. Mathias, D. M. Farschon, H. G. Wang, J. C. Reed, R. N. Kolesnick, and D. R. Green. 1995. Cell-free reconstitution of Fas-, UV radiation- and ceramide-induced apoptosis. *Embo J* 14: 5191-200.
- Mathias, S., A. Younes, C. C. Kan, I. Orlow, C. Joseph, and R. N. Kolesnick. 1993. Activation of the sphingomyelin signaling pathway in intact EL4 cells and in a cell-free system by IL-1 beta. *Science* 259: 519-22.
- Matter, A. 2001. Tumor angiogenesis as a therapeutic target. *Drug Discov Today* 6: 1005-1024.
- Matucci-Cerinic, M., A. Jaffa, and B. Kahaleh. 1992. Angiotensin converting enzyme: an in vivo and in vitro marker of endothelial injury. *J Lab Clin Med* 120: 428-33.
- Mauceri, H. J., N. N. Hanna, M. A. Beckett, D. H. Gorski, M. J. Staba, K. A. Stellato, K. Bigelow, R. Heimann, S. Gately, M. Dhanabal, G. A. Soff, V. P. Sukhatme, D. W. Kufe, and R. R. Weichselbaum. 1998. Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumour therapy. *Nature* 394: 287-91.
- Mayer, R. J. 2004. Two steps forward in the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 350: 2406-8.
- McDevitt, M. R., D. Ma, L. T. Lai, J. Simon, P. Borchardt, R. K. Frank, K. Wu, V. Pellegrini, M. J. Curcio, M. Miederer, N. H. Bander, and D. A. Scheinberg. 2001. Tumor therapy with targeted atomic nanogenerators. *Science* 294: 1537-40.
- Meijer, A. E., A. R. Jernberg, T. Heiden, B. Stenerlow, L. M. Persson, N. Tilly, B. K. Lind, and M. R. Edgren. 2005. Dose and time dependent apoptotic response in a human melanoma cell line exposed to accelerated boron ions at four different LET. *Int J Radiat Biol* 81: 261-72.
- Melendez, A. J., E. Carlos-Dias, M. Gosink, J. M. Allen, and L. Takacs. 2000. Human sphingosine kinase: molecular cloning, functional characterization and tissue distribution. *Gene* 251: 19-26.
- Menendez, J. C., D. Casanova, J. A. Amado, E. Salas, M. T. Garcia-Unzueta, F. Fernandez, L. P. de la Lastra, and J. R. Berrazueta. 1998. Effects of radiation on endothelial function. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 41: 905-13.

- Meyer zu Heringdorf, D., H. Lass, R. Alemany, K. T. Laser, E. Neumann, C. Zhang, M. Schmidt, U. Rauen, K. H. Jakobs, and C. J. van Koppen. 1998. Sphingosine kinase-mediated Ca²⁺ signalling by G-protein-coupled receptors. *Embo J* 17: 2830-7.
- Michael, J. M., M. F. Lavin, and D. J. Watters. 1997. Resistance to radiation-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma cells is associated with defective ceramide signaling. *Cancer Res* 57: 3600-5.
- Milas, L., N. R. Hunter, K. A. Mason, B. Kurdoglu, and L. J. Peters. 1994. Enhancement of tumor radioresponse of a murine mammary carcinoma by paclitaxel. *Cancer Res* 54: 3506-10.
- Milstien, S., and S. Spiegel. 2006. Targeting sphingosine-1-phosphate: a novel avenue for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 9: 148-50.
- Miranda, E. I., C. Santana, E. Rojas, S. Hernandez, P. Ostrosky-Wegman, and A. Garcia-Carranca. 1996. Induced mitotic death of HeLa cells by abnormal expression of c-H-ras. *Mutat Res* 349: 173-82.
- Mitra, P., C. A. Oskeritzian, S. G. Payne, M. A. Beaven, S. Milstien, and S. Spiegel. 2006. Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16394-9.
- Miyashita, T., S. Krajewski, M. Krajewska, H. G. Wang, H. K. Lin, D. A. Liebermann, B. Hoffman, and J. C. Reed. 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9: 1799-805.
- Miyashita, T., and J. C. Reed. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80: 293-9.
- Morales-Ruiz, M., M. J. Lee, S. Zollner, J. P. Gratton, R. Scotland, I. Shiojima, K. Walsh, T. Hla, and W. C. Sessa. 2001. Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells. *J Biol Chem* 276: 19672-7.
- Morita, Y., G. I. Perez, F. Paris, S. R. Miranda, D. Ehleiter, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks, Z. Xie, J. C. Reed, E. H. Schuchman, R. N. Kolesnick, and J. L. Tilly. 2000. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med* 6: 1109-14.
- Mothersill, C. and C. B. Seymour 1998. Cell-cell contact during gamma irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes: evidence for release during irradiation of a signal controlling survival into the medium. *Radiat Res* 149(3): 256-62.
- Moustacchi, E. 2000. DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutat Res* 464: 35-40.
- Mouthon, M. A., M. H. Gaugler, A. Van der Meeren, M. Vandamme, P. Gourmelon, and G. Wagemaker. 2001. Single administration of thrombopoietin to lethally irradiated mice prevents infectious and thrombotic events leading to mortality. *Exp Hematol* 29: 30-40.
- Murray, A. W. 1992. Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* 359: 599-604.
- Nagl, W. 1990. Polyploidy in differentiation and evolution. *Int J Cell Cloning* 8: 216-23.
- Nakamura, Y., K. Sato, N. Wakimoto, F. Kimura, A. Okuyama, and K. Motoyoshi. 2001. A new matrix metalloproteinase inhibitor SI-27 induces apoptosis in several human myeloid leukemia cell lines and enhances sensitivity to TNF alpha-induced apoptosis. *Leukemia* 15: 1217-24.
- Nakazawa, T., and S. Nagatsuka. 1980. Radiation-induced lipid peroxidation and membrane permeability in liposomes. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 38: 537-44.
- Nakazawa, T., S. Nagatsuka, and O. Yukawa. 1986. Effects of membrane stabilizing agents and radiation on liposomal membranes. *Drugs Exp Clin Res* 12: 831-5.

-
- Nicolson, G. L., S. E. Custead, K. M. Dulski, and L. Milas. 1991. Effects of gamma irradiation on cultured rat and mouse microvessel endothelial cells: metastatic tumor cell adhesion, subendothelial matrix degradation, and secretion of tumor cell growth factors. *Clin Exp Metastasis* 9: 457-68.
- Niedernhofer, L. J., H. Odijk, M. Budzowska, E. van Drunen, A. Maas, A. F. Theil, J. de Wit, N. G. Jaspers, H. B. Beverloo, J. H. Hoeijmakers, and R. Kanaar. 2004. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 24: 5776-87.
- Nilsson, A., and R. D. Duan. 1999. Alkaline sphingomyelinases and ceramidases of the gastrointestinal tract. *Chem Phys Lipids* 102: 97-105.
- Nubel, T., J. Damrot, W. P. Roos, B. Kaina, and G. Fritz. 2006. Lovastatin protects human endothelial cells from killing by ionizing radiation without impairing induction and repair of DNA double-strand breaks. *Clin Cancer Res* 12: 933-9.
- Nurminen, T. A., J. M. Holopainen, H. Zhao, and P. K. Kinnunen. 2002. Observation of topical catalysis by sphingomyelinase coupled to microspheres. *J Am Chem Soc* 124: 12129-34.
- Ogawa, C., A. Kihara, M. Gokoh, and Y. Igarashi. 2003. Identification and characterization of a novel human sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase, hSPP2. *J Biol Chem* 278: 1268-72.
- Okaji, Y., N. H. Tsuno, S. Saito, S. Yoneyama, M. Tanaka, H. Nagawa, and K. Takahashi. 2006. Vaccines targeting tumour angiogenesis--a novel strategy for cancer immunotherapy. *Eur J Surg Oncol* 32: 363-70.
- Okamoto, H., N. Takuwa, T. Yokomizo, N. Sugimoto, S. Sakurada, H. Shigematsu, and Y. Takuwa. 2000. Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol Cell Biol* 20: 9247-61.
- Okazaki, T., R. M. Bell, and Y. A. Hannun. 1989. Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation. *J Biol Chem* 264: 19076-80.
- Okazaki, T., A. Bielawska, N. Domae, R. M. Bell, and Y. A. Hannun. 1994. Characteristics and partial purification of a novel cytosolic, magnesium-independent, neutral sphingomyelinase activated in the early signal transduction of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation. *J Biol Chem* 269: 4070-7.
- Okunieff, P., M. Mester, J. Wang, T. Maddox, X. Gong, D. Tang, M. Coffee, and I. Ding. 1998. In vivo radioprotective effects of angiogenic growth factors on the small bowel of C3H mice. *Radiat Res* 150: 204-11.
- Olivera, A., T. Kohama, L. Edsall, V. Nava, O. Cuvillier, S. Poulton, and S. Spiegel. 1999. Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol* 147: 545-58.
- Olivera, A., and S. Spiegel. 1993. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 365: 557-60.
- Olivieri, G., and A. Micheli. 1983. Mitotic delay and repair in human lymphocytes. *Mutat Res* 122: 65-72.
- O'Reilly, M. S., L. Holmgren, C. Chen, and J. Folkman. 1996. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med* 2: 689-92.
- O'Reilly, M. S., L. Holmgren, Y. Shing, C. Chen, R. A. Rosenthal, Y. Cao, M. Moses, W. S. Lane, E. H. Sage, and J. Folkman. 1994. Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59: 471-82.
- Orrenius, S., B. Zhivotovsky, and P. Nicotera. 2003. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 552-65.
-

-
- Otala, M., M. O. Pentikainen, T. Matikainen, L. Suomalainen, J. K. Hakala, G. I. Perez, M. Tenhunen, K. Erkkila, P. Kovanen, M. Parvinen, and L. Dunkel. 2005. Effects of acid sphingomyelinase deficiency on male germ cell development and programmed cell death. *Biol Reprod* 72: 86-96.
- Otala, M., L. Suomalainen, M. O. Pentikainen, P. Kovanen, M. Tenhunen, K. Erkkila, J. Toppari, and L. Dunkel. 2004. Protection from radiation-induced male germ cell loss by sphingosine-1-phosphate. *Biol Reprod* 70: 759-67.
- Otterbach, B., and W. Stoffel. 1995. Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann-Pick disease). *Cell* 81: 1053-61.
- Paik, J. H., S. Chae, M. J. Lee, S. Thangada, and T. Hla. 2001. Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of alpha vbeta3- and beta1-containing integrins. *J Biol Chem* 276: 11830-7.
- Paik, J. H., A. Skoura, S. S. Chae, A. E. Cowan, D. K. Han, R. L. Proia, and T. Hla. 2004. Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization. *Genes Dev* 18: 2392-403.
- Paku, S., and N. Paweletz. 1991. First steps of tumor-related angiogenesis. *Lab Invest* 65: 334-46.
- Panes, J., D. C. Anderson, M. Miyasaka, and D. N. Granger. 1995. Role of leukocyte-endothelial cell adhesion in radiation-induced microvascular dysfunction in rats. *Gastroenterology* 108: 1761-9.
- Panetti, T. S., H. Chen, T. M. Misenheimer, S. B. Getzler, and D. F. Mosher. 1997. Endothelial cell mitogenesis induced by LPA: inhibition by thrombospondin-1 and thrombospondin-2. *J Lab Clin Med* 129: 208-16.
- Panetti, T. S., M. K. Magnusson, O. Peyruchaud, Q. Zhang, M. E. Cooke, T. Sakai, and D. F. Mosher. 2001. Modulation of cell interactions with extracellular matrix by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 64: 93-106.
- Panetti, T. S., J. Nowlen, and D. F. Mosher. 2000. Sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid stimulate endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1013-9.
- Paris, F., Z. Fuks, A. Kang, P. Capodiceci, G. Juan, D. Ehleiter, A. Haimovitz-Friedman, C. Cordon-Cardo, and R. Kolesnick. 2001. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 293: 293-7.
- Paris, F., G. I. Perez, Z. Fuks, A. Haimovitz-Friedman, H. Nguyen, M. Bose, A. Ilagan, P. A. Hunt, W. F. Morgan, J. L. Tilly, and R. Kolesnick. 2002. Sphingosine 1-phosphate preserves fertility in irradiated female mice without propagating genomic damage in offspring. *Nat Med* 8: 901-2.
- Pena, L. A., Z. Fuks, and R. Kolesnick. 1997. Stress-induced apoptosis and the sphingomyelin pathway. *Biochem Pharmacol* 53: 615-21.
- Pena, L. A., Z. Fuks, and R. N. Kolesnick. 2000. Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency. *Cancer Res* 60: 321-7.
- Pepper, M. S. 1996. Positive and negative regulation of angiogenesis: from cell biology to the clinic. *Vasc Med* 1: 259-66.
- Pepper, M. S., S. J. Mandriota, J. D. Vassalli, L. Orci, and R. Montesano. 1996. Angiogenesis-regulating cytokines: activities and interactions. *Curr Top Microbiol Immunol* 213 (Pt 2): 31-67.
-

-
- Perez, G. I., C. M. Knudson, L. Leykin, S. J. Korsmeyer, and J. L. Tilly. 1997. Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. *Nat Med* 3: 1228-32.
- Perry, P., and S. Wolff. 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251: 156-8.
- Peterson, L. M., M. L. Evans, K. L. Thomas, and M. M. Graham. 1992. Vascular response to fractionated irradiation in the rat lung. *Radiat Res* 131: 224-6.
- Petty, W. J., K. H. Dragnev, V. A. Memoli, Y. Ma, N. B. Desai, A. Biddle, T. H. Davis, W. C. Nugent, N. Memoli, M. Hamilton, K. K. Iwata, J. R. Rigas, and E. Dmitrovsky. 2004. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition represses cyclin D1 in aerodigestive tract cancers. *Clin Cancer Res* 10: 7547-54.
- Pfeilschifter, J., and A. Huwiler. 2000. Ceramides as Key Players in Cellular Stress Response. *News Physiol Sci* 15: 11-15.
- Pitson, S. M., P. Xia, T. M. Leclercq, P. A. Moretti, J. R. Zebol, H. E. Lynn, B. W. Wattenberg, and M. A. Vadas. 2005. Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling. *J Exp Med* 201: 49-54.
- Potten, C. S. 1990. A comprehensive study of the radiobiological response of the murine (BDF1) small intestine. *Int J Radiat Biol* 58: 925-73.
- Potten, C. S. 1992. The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice. *Cancer Metastasis Rev* 11: 179-95.
- Potten, C. S., C. Booth, and D. M. Pritchard. 1997. The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol* 78: 219-43.
- Pouget, J. P., and S. J. Mather. 2001. General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. *Eur J Nucl Med* 28: 541-61.
- Powell, S., and T. J. McMillan. 1990. DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation. *Radiother Oncol* 19: 95-108.
- Prewett, M., J. Huber, Y. Li, A. Santiago, W. O'Connor, K. King, J. Overholser, A. Hooper, B. Pytowski, L. Witte, P. Bohlen, and D. J. Hicklin. 1999. Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Res* 59: 5209-18.
- Prieschl, E. E., R. Csonga, V. Novotny, G. E. Kikuchi, and T. Baumruker. 1999. The balance between sphingosine and sphingosine-1-phosphate is decisive for mast cell activation after Fc epsilon receptor I triggering. *J Exp Med* 190: 1-8.
- Pruschy, M., H. Resch, Y. Q. Shi, N. Aalame, C. Glanzmann, and S. Bodis. 1999. Ceramide triggers p53-dependent apoptosis in genetically defined fibrosarcoma tumour cells. *Br J Cancer* 80: 693-8.
- Puck, T. T., and P. I. Marcus. 1956. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med* 103: 653-66.
- Pyne, S., J. Chapman, L. Steele, and N. J. Pyne. 1996. Sphingomyelin-derived lipids differentially regulate the extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK-2) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) signal cascades in airway smooth muscle. *Eur J Biochem* 237: 819-26.
- Pyne, S., and N. J. Pyne. 1996. The differential regulation of cyclic AMP by sphingomyelin-derived lipids and the modulation of sphingolipid-stimulated extracellular signal regulated kinase-2 in airway smooth muscle. *Biochem J* 315 (Pt 3): 917-23.
- Pyne, S., and N. J. Pyne. 2000. Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J* 349: 385-402.
-

-
- Qin, X. F., D. S. An, I. S. Chen, and D. Baltimore. 2003. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 183-8.
- Quarmany, S., P. Kumar, and S. Kumar. 1999. Radiation-induced normal tissue injury: role of adhesion molecules in leukocyte-endothelial cell interactions. *Int J Cancer* 82: 385-95.
- Quintans, J., J. Kilkus, C. L. McShan, A. R. Gottschalk, and G. Dawson. 1994. Ceramide mediates the apoptotic response of WEHI 231 cells to anti-immunoglobulin, corticosteroids and irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 710-4.
- Quintern, L. E., E. H. Schuchman, O. Levran, M. Suchi, K. Ferlinz, H. Reinke, K. Sandhoff, and R. J. Desnick. 1989. Isolation of cDNA clones encoding human acid sphingomyelinase: occurrence of alternatively processed transcripts. *Embo J* 8: 2469-73.
- Radford, I. R. 1991. Mouse lymphoma cells that undergo interphase death show markedly increased sensitivity to radiation-induced DNA double-strand breakage as compared with cells that undergo mitotic death. *Int J Radiat Biol* 59: 1353-69.
- Radford, I. R. 1994. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part I. Sensitivity to killing by ionizing radiation, rate of loss of viability, and cell type of origin. *Int J Radiat Biol* 65: 203-15.
- Radford, I. R. 1999. Initiation of ionizing radiation-induced apoptosis: DNA damage-mediated or does ceramide have a role? *Int J Radiat Biol* 75: 521-8.
- Radford, I. R., and T. K. Murphy. 1994. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part III. Different signals can lead to apoptosis and may influence sensitivity to killing by DNA double-strand breakage. *Int J Radiat Biol* 65: 229-39.
- Radford, I. R., T. K. Murphy, J. M. Radley, and S. L. Ellis. 1994. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part II. Apoptotic death is shown by all lines examined. *Int J Radiat Biol* 65: 217-27.
- Rafii, S., and D. Lyden. 2003. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 9: 702-12.
- Raicu, M., A. Vral, H. Thierens, and L. De Ridder. 1993. Radiation damage to endothelial cells in vitro, as judged by the micronucleus assay. *Mutagenesis* 8: 335-9.
- Raines, M. A., R. N. Kolesnick, and D. W. Golde. 1993. Sphingomyelinase and ceramide activate mitogen-activated protein kinase in myeloid HL-60 cells. *J Biol Chem* 268: 14572-5.
- Rak, J. W., B. D. St Croix, and R. S. Kerbel. 1995. Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy. *Anticancer Drugs* 6: 3-18.
- Rao, P. N. 1980. The molecular basis of drug-induced G2 arrest in mammalian cells. *Mol Cell Biochem* 29: 47-57.
- Reap, E. A., K. Roof, K. Maynor, M. Borrero, J. Booker, and P. L. Cohen. 1997. Radiation and stress-induced apoptosis: a role for Fas/Fas ligand interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5750-5.
- Risau, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-4.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova, and W. M. Bonner. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273: 5858-68.
- Roninson, I. B., E. V. Broude, and B. D. Chang. 2001. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* 4: 303-13.
- Rosenwald, A. G., and R. E. Pagano. 1993. Inhibition of glycoprotein traffic through the secretory pathway by ceramide. *J Biol Chem* 268: 4577-9.
- Rosette, C., and M. Karin. 1996. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* 274: 1194-7.
-

-
- Ross, G. M. 1999. Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr Relat Cancer* 6: 41-4.
- Ross, H. J., R. J. Antoniono, J. A. Buckmeier, and J. L. Redpath. 1994. Variable expression of IL-1 beta has minimal effect on the radiation sensitivity of three human glioma cell lines. *Int J Radiat Biol* 66: 785-91.
- Roth, Z., and P. J. Hansen. 2004. Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during maturation. *Biol Reprod* 71: 2072-8.
- Rubin, D. B., E. A. Drab, and K. D. Bauer. 1989. Endothelial cell subpopulations in vitro: cell volume, cell cycle, and radiosensitivity. *J Appl Physiol* 67: 1585-90.
- Ryu, Y., N. Takuwa, N. Sugimoto, S. Sakurada, S. Usui, H. Okamoto, O. Matsui, and Y. Takuwa. 2002. Sphingosine-1-phosphate, a platelet-derived lysophospholipid mediator, negatively regulates cellular Rac activity and cell migration in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 90: 325-32.
- Saba, J. D., F. Nara, A. Bielawska, S. Garrett, and Y. A. Hannun. 1997. The BST1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is the sphingosine-1-phosphate lyase. *J Biol Chem* 272: 26087-90.
- Sadahira, Y., F. Ruan, S. Hakomori, and Y. Igarashi. 1992. Sphingosine 1-phosphate, a specific endogenous signaling molecule controlling cell motility and tumor cell invasiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 9686-90.
- Sakakeeny, M. A., M. Harrington, J. Leif, W. Merrill, D. Pratt, E. Romanik, M. McKenna, T. J. FitzGerald, and J. S. Greenberger. 1994. Effects of gamma-irradiation on the M-CSF-promoter linked to a chloramphenicol aminoacyl transferase reporter gene expressed in a clonal murine bone marrow stromal cell line. *Stem Cells* 12: 87-94.
- Samet, D., and Y. Barenholz. 1999. Characterization of acidic and neutral sphingomyelinase activities in crude extracts of HL-60 cells. *Chem Phys Lipids* 102: 65-77.
- Santana, P., L. A. Pena, A. Haimovitz-Friedman, S. Martin, D. Green, M. McLoughlin, C. Cordon-Cardo, E. H. Schuchman, Z. Fuks, and R. Kolesnick. 1996. Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* 86: 189-99.
- Sawai, H., T. Okazaki, H. Yamamoto, H. Okano, Y. Takeda, M. Tashima, H. Sawada, M. Okuma, H. Ishikura, H. Umehara, and et al. 1995. Requirement of AP-1 for ceramide-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem* 270: 27326-31.
- Scaffidi, C., I. Schmitz, J. Zha, S. J. Korsmeyer, P. H. Krammer, and M. E. Peter. 1999. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* 274: 22532-8.
- Scaife, J. F. 1966. The effect of lethal doses of x-irradiation on the enzymatic activity of mitochondrial cytochrome c. *Can J Biochem* 44: 433-48.
- Schissel, S. L., X. Jiang, J. Tweedie-Hardman, T. Jeong, E. H. Camejo, J. Najib, J. H. Rapp, K. J. Williams, and I. Tabas. 1998a. Secretory sphingomyelinase, a product of the acid sphingomyelinase gene, can hydrolyze atherogenic lipoproteins at neutral pH. Implications for atherosclerotic lesion development. *J Biol Chem* 273: 2738-46.
- Schissel, S. L., G. A. Keesler, E. H. Schuchman, K. J. Williams, and I. Tabas. 1998b. The cellular trafficking and zinc dependence of secretory and lysosomal sphingomyelinase, two products of the acid sphingomyelinase gene. *J Biol Chem* 273: 18250-9.
- Schmid G, M. Guba, I. Ischenko, A. Papyan, M. Joka, S. Schrepfer, C.J. Bruns, K.W. Jauch, C. Heeschen, C. Graeb. 2007. The immunosuppressant FTY720 inhibits tumor angiogenesis via the sphingosine 1-phosphate receptor 1. *J Cell Biochem* Epub ahead of print.
- Schutze, S., K. Potthoff, T. Machleidt, D. Berkovic, K. Wiegmann, and M. Kronke. 1992. TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* 71: 765-76.
-

- Sedelnikova, O. A., E. P. Rogakou, I. G. Panyutin, and W. M. Bonner. 2002. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res* 158: 486-92.
- Seidita, G., D. Polizzi, G. Costanzo, S. Costa, and A. Di Leonardo. 2000. Differential gene expression in p53-mediated G(1) arrest of human fibroblasts after gamma-irradiation or N-phosphoacetyl-L-aspartate treatment. *Carcinogenesis* 21: 2203-10.
- Shaheen, R. M., S. A. Ahmad, W. Liu, N. Reinmuth, Y. D. Jung, W. W. Tseng, K. E. Drazan, C. D. Bucana, D. J. Hicklin, and L. M. Ellis. 2001. Inhibited growth of colon cancer carcinomatosis by antibodies to vascular endothelial and epidermal growth factor receptors. *Br J Cancer* 85: 584-9.
- Shalaby, F., J. Ho, W. L. Stanford, K. D. Fischer, A. C. Schuh, L. Schwartz, A. Bernstein, and J. Rossant. 1997. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89: 981-90.
- Sherman, M. L., R. Datta, D. E. Hallahan, R. R. Weichselbaum, and D. W. Kufe. 1991. Regulation of tumor necrosis factor gene expression by ionizing radiation in human myeloid leukemia cells and peripheral blood monocytes. *J Clin Invest* 87: 1794-7.
- Sherr, C. J., and J. M. Roberts. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13: 1501-12.
- Shewach, D. S., T. M. Hahn, E. Chang, L. W. Hertel, and T. S. Lawrence. 1994. Metabolism of 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine and radiation sensitization of human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 54: 3218-23.
- Shieh, S. Y., M. Ikeda, Y. Taya, and C. Prives. 1997. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91: 325-34.
- Shiloh, Y. 2001. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* 11: 71-7.
- Shinohara, K., and H. Nakano. 1993. Interphase death and reproductive death in X-irradiated MOLT-4 cells. *Radiat Res* 135: 197-205.
- Shinomiya, N. 2001. New concepts in radiation-induced apoptosis: 'premitotic apoptosis' and 'postmitotic apoptosis'. *J Cell Mol Med* 5: 240-53.
- Shinomiya, N., Y. Kuno, F. Yamamoto, M. Fukasawa, A. Okumura, M. Uefuji, and M. Rokutanda. 2000. Different mechanisms between premitotic apoptosis and postmitotic apoptosis in X-irradiated U937 cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47: 767-77.
- Siegal, T., and M. R. Pfeffer. 1995. Radiation-induced changes in the profile of spinal cord serotonin, prostaglandin synthesis, and vascular permeability. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31: 57-64.
- Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-72.
- Simons, K., and D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31-9.
- Sinclair, W. K. 1968. Cyclic x-ray responses in mammalian cells in vitro. *Radiat Res* 33: 620-43.
- Sinclair, W. K., and R. A. Morton. 1966. X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured Chinese hamster cells. *Radiat Res* 29: 450-74.
- Singer, S. J., and G. L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-31.
- Skwarchuk, M. W., B. G. Wouters, and L. D. Skarsgard. 1993. Substructure in the radiation survival response at low dose: asynchronous and partially synchronized V79-WNRE cells. *Int J Radiat Biol* 64: 601-12.
- Sleiman, R. J., and B. W. Stewart. 2000. Early caspase activation in leukemic cells subject to etoposide-induced G2-M arrest: evidence of commitment to apoptosis rather than mitotic cell death. *Clin Cancer Res* 6: 3756-65.

-
- Smeets, M. F., E. H. Mooren, and A. C. Begg. 1994. The effect of radiation on G2 blocks, cyclin B expression and cdc2 expression in human squamous carcinoma cell lines with different radiosensitivities. *Radiother Oncol* 33: 217-27.
- Smiraldo, P. G., A. M. Gruver, J. C. Osborn, and D. L. Pittman. 2005. Extensive chromosomal instability in Rad51d-deficient mouse cells. *Cancer Res* 65: 2089-96.
- Smith, G. C., and S. P. Jackson. 1999. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* 13: 916-34.
- Spiegel, S. 1999. Sphingosine 1-phosphate: a prototype of a new class of second messengers. *J Leukoc Biol* 65: 341-4.
- Spiegel, S., D. Foster, and R. Kolesnick. 1996. Signal transduction through lipid second messengers. *Curr Opin Cell Biol* 8: 159-67.
- Spiegel, S., and S. Milstien. 2000. Functions of a new family of sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim Biophys Acta* 1484: 107-16.
- Spiegel, S., and S. Milstien. 2002. Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J Biol Chem* 277: 25851-4.
- Spiegel, S., and S. Milstien. 2003. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 397-407.
- Springer, T. A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301-14.
- Stanimirovic, D. B., J. Wong, R. Ball, and J. P. Durkin. 1995. Free radical-induced endothelial membrane dysfunction at the site of blood-brain barrier: relationship between lipid peroxidation, Na,K-ATPase activity, and 51Cr release. *Neurochem Res* 20: 1417-27.
- Stark, G. 1991. The effect of ionizing radiation on lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1071: 103-22.
- Stoffel, W., and G. Assmann. 1970. Metabolism of sphingosine bases. XV. Enzymatic degradation of 4t-sphingenine 1-phosphate (sphingosine 1-phosphate) to 2t-hexadecen-1-al and ethanolamine phosphate. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 351: 1041-9.
- Strum, J. C., G. W. Small, S. B. Pauig, and L. W. Daniel. 1994. 1-beta-D-Arabinofuranosylcytosine stimulates ceramide and diglyceride formation in HL-60 cells. *J Biol Chem* 269: 15493-7.
- Sturzbecher, H. W., B. Donzelmann, W. Henning, U. Knippschild, and S. Buchhop. 1996. p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *Embo J* 15: 1992-2002.
- Susin, S. A., N. Zamzami, M. Castedo, T. Hirsch, P. Marchetti, A. Macho, E. Daugas, M. Geuskens, and G. Kroemer. 1996. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 184: 1331-41.
- Suzuki, M., H. Zhou, C.R. Geard, and T.K. Hei 2004. Effect of medium on chromatin damage in bystander mammalian cells. *Radiat Res* 162(3): 264-9.
- Sweeney, C. J., K. D. Miller, and G. W. Sledge, Jr. 2003. Resistance in the anti-angiogenic era: nay-saying or a word of caution? *Trends Mol Med* 9: 24-9.
- Taha, T. A., W. Osta, L. Kozhaya, J. Bielawski, K. R. Johnson, W. E. Gillanders, G. S. Dbaibo, Y. A. Hannun, and L. M. Obeid. 2004. Down-regulation of sphingosine kinase-1 by DNA damage: dependence on proteases and p53. *J Biol Chem* 279: 20546-54.
- Takuwa, Y. 2002. Subtype-specific differential regulation of Rho family G proteins and cell migration by the Edg family sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim Biophys Acta* 1582: 112-20.
- Teicher, B. A. 1996. A systems approach to cancer therapy. (Antioncogenics + standard cytotoxics-->mechanism(s) of interaction). *Cancer Metastasis Rev* 15: 247-72.
-

-
- Teichert-Kuliszewska, K., M. J. Kutryk, M. A. Kuliszewski, G. Karoubi, D. W. Courtman, L. Zucco, J. Granton, and D. J. Stewart. 2006. Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival: implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Circ Res* 98: 209-17.
- Tepper, A. D., E. de Vries, W. J. van Blitterswijk, and J. Borst. 1999. Ordering of ceramide formation, caspase activation, and mitochondrial changes during CD95- and DNA damage-induced apoptosis. *J Clin Invest* 103: 971-8.
- Terasima, T., and L. J. Tolmach. 1963. Variations in several responses of HeLa cells to x-irradiation during the division cycle. *Biophys J* 3: 11-33.
- Thompson, L. H., and H. D. Suit. 1969. Proliferation kinetics of x-irradiated mouse L cells studied WITH TIME-lapse photography. II. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 15: 347-62.
- Thyagarajan, B., M. McCormick-Graham, D. P. Romero, and C. Campbell. 1996. Characterization of homologous DNA recombination activity in normal and immortal mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 24: 4084-91.
- Tibbetts, R. S., K. M. Brumbaugh, J. M. Williams, J. N. Sarkaria, W. A. Cliby, S. Y. Shieh, Y. Taya, C. Prives, and R. T. Abraham. 1999. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* 13: 152-7.
- Toblem G. 2000. *Sang Thrombose Vaisseaux*.12(10) :591-597.
- Tomiuk, S., K. Hofmann, M. Nix, M. Zumbansen, and W. Stoffel. 1998. Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling? *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3638-43.
- Tsai, J. H., S. Makonnen, M. Feldman, C. M. Sehgal, A. Maity, and W. M. Lee. 2005. Ionizing radiation inhibits tumor neovascularization by inducing ineffective angiogenesis. *Cancer Biol Ther* 4: 1395-1400.
- Tuschl, T., P. D. Zamore, R. Lehmann, D. P. Bartel, and P. A. Sharp. 1999. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* 13: 3191-7.
- Valerie, K., and L. F. Povirk. 2003. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 22: 5792-812.
- Van Brocklyn, J. R., C. A. Jackson, D. K. Pearl, M. S. Kotur, P. J. Snyder, and T. W. Prior. 2005. Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 695-705.
- Van Brocklyn, J. R., M. J. Lee, R. Menzeleev, A. Olivera, L. Edsall, O. Cuvillier, D. M. Thomas, P. J. Coopman, S. Thangada, C. H. Liu, T. Hla, and S. Spiegel. 1998. Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J Cell Biol* 142: 229-40.
- Van Brocklyn, J. R., Z. Tu, L. C. Edsall, R. R. Schmidt, and S. Spiegel. 1999. Sphingosine 1-phosphate-induced cell rounding and neurite retraction are mediated by the G protein-coupled receptor H218. *J Biol Chem* 274: 4626-32.
- van Kleef, E., M. Verheij, H. te Poele, Y. Oussoren, L. Dewit, and F. Stewart. 2000. In vitro and in vivo expression of endothelial von Willebrand factor and leukocyte accumulation after fractionated irradiation. *Radiat Res* 154: 375-81.
- Van Veldhoven, P. P., S. Gijsbers, G. P. Mannaerts, J. R. Vermeesch, and V. Brys. 2000. Human sphingosine-1-phosphate lyase: cDNA cloning, functional expression studies and mapping to chromosome 10q22(1). *Biochim Biophys Acta* 1487: 128-34.
- Verheij, M., R. Bose, X. H. Lin, B. Yao, W. D. Jarvis, S. Grant, M. J. Birrer, E. Szabo, L. I. Zon, J. M. Kyriakis, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks, and R. N. Kolesnick. 1996. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380: 75-9.
-

- Visentin, B., J. A. Vekich, B. J. Sibbald, A. L. Cavalli, K. M. Moreno, R. G. Matteo, W. A. Garland, Y. Lu, S. Yu, H. S. Hall, V. Kundra, G. B. Mills, and R. A. Sabbadini. 2006. Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell* 9: 225-38.
- Vit, J. P., and F. Rosselli. 2003. Role of the ceramide-signaling pathways in ionizing radiation-induced apoptosis. *Oncogene* 22: 8645-52.
- Wahl, M. L., D. J. Kenan, M. Gonzalez-Gronow, and S. V. Pizzo. 2005. Angiostatin's molecular mechanism: aspects of specificity and regulation elucidated. *J Cell Biochem* 96: 242-61.
- Walczak, H., and P. H. Krammer. 2000. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 256: 58-66.
- Walker, J. R., R. A. Corpina, and J. Goldberg. 2001. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412: 607-14.
- Wang, C. Y., M. W. Mayo, and A. S. Baldwin, Jr. 1996. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 274: 784-7.
- Wang, F., J. R. Van Brocklyn, L. Edsall, V. E. Nava, and S. Spiegel. 1999. Sphingosine-1-phosphate inhibits motility of human breast cancer cells independently of cell surface receptors. *Cancer Res* 59: 6185-91.
- Ward, H. E., L. Kemsley, L. Davies, M. Holecek, and N. Berend. 1993. The pulmonary response to sublethal thoracic irradiation in the rat. *Radiat Res* 136: 15-21.
- Warters, R. L., K. G. Hofer, C. R. Harris, and J. M. Smith. 1978. Radionuclide toxicity in cultured mammalian cells: elucidation of the primary site of radiation damage. *Curr Top Radiat Res Q* 12: 389-407.
- Waters, C. M., J. M. Taylor, A. Molteni, and W. F. Ward. 1996. Dose-response effects of radiation on the permeability of endothelial cells in culture. *Radiat Res* 146: 321-8.
- Wiegmann, K., S. Schutze, T. Machleidt, D. Witte, and M. Kronke. 1994. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 78: 1005-15.
- Winkler, F., S. V. Kozin, R. T. Tong, S. S. Chae, M. F. Booth, I. Garkavtsev, L. Xu, D. J. Hicklin, D. Fukumura, E. di Tomaso, L. L. Munn, and R. K. Jain. 2004. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell* 6: 553-63.
- Witte, L., Z. Fuks, A. Haimovitz-Friedman, I. Vlodavsky, D. S. Goodman, and A. Eldor. 1989. Effects of irradiation on the release of growth factors from cultured bovine, porcine, and human endothelial cells. *Cancer Res* 49: 5066-72.
- Wolff, R. A., R. T. Dobrowsky, A. Bielawska, L. M. Obeid, and Y. A. Hannun. 1994. Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 269: 19605-9.
- Yamada, T., and H. Ohyama. 1988. Radiation-induced interphase death of rat thymocytes is internally programmed (apoptosis). *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 53: 65-75.
- Yamaguchi, H., J. Kitayama, N. Takuwa, K. Arikawa, I. Inoki, K. Takehara, H. Nagawa, and Y. Takuwa. 2003. Sphingosine-1-phosphate receptor subtype-specific positive and negative regulation of Rac and haematogenous metastasis of melanoma cells. *Biochem J* 374: 715-22.
- Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, A. M. Ibrado, J. Cai, T. I. Peng, D. P. Jones, and X. Wang. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275: 1129-32.

-
- Yatomi, Y., Y. Ozaki, T. Ohmori, and Y. Igarashi. 2001. Sphingosine 1-phosphate: synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 64: 107-22.
- Yatomi, Y., F. Ruan, J. Ohta, R. J. Welch, S. Hakomori, and Y. Igarashi. 1995. Quantitative measurement of sphingosine 1-phosphate in biological samples by acylation with radioactive acetic anhydride. *Anal Biochem* 230: 315-20.
- Yin, F. F., S. Das, J. Kirkpatrick, M. Oldham, Z. Wang, and S. M. Zhou. 2006. Physics and imaging for targeting of oligometastases. *Semin Radiat Oncol* 16: 85-101.
- Yu, J. L., J. W. Rak, B. L. Coomber, D. J. Hicklin, and R. S. Kerbel. 2002. Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science* 295: 1526-8.
- Zachary, I. 2003. VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans* 31: 1171-7.
- Zhan, Q., S. Fan, I. Bae, C. Guillouf, D. A. Liebermann, P. M. O'Connor, and A. J. Fornace, Jr. 1994. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 9: 3743-51.
- Zhang, C., Z. Ao, A. Seth, and S. F. Schlossman. 1996a. A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells. *J Immunol* 157: 3980-7.
- Zhang, H., N. N. Desai, A. Olivera, T. Seki, G. Brooker, and S. Spiegel. 1991. Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J Cell Biol* 114: 155-67.
- Zhang, J., N. Alter, J. C. Reed, C. Borner, L. M. Obeid, and Y. A. Hannun. 1996b. Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5325-8.
- Zhang, Y., P. Mattjus, P. C. Schmid, Z. Dong, S. Zhong, W. Y. Ma, R. E. Brown, A. M. Bode, and H. H. Schmid. 2001. Involvement of the acid sphingomyelinase pathway in uva-induced apoptosis. *J Biol Chem* 276: 11775-82.
- Zhang, Y., B. Yao, S. Delikat, S. Bayoumy, X. H. Lin, S. Basu, M. McGinley, P. Y. Chan-Hui, H. Lichenstein, and R. Kolesnick. 1997. Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell* 89: 63-72.
- Zheng, D. M., T. Kitamura, K. Ikejima, N. Enomoto, S. Yamashina, S. Suzuki, Y. Takei, and N. Sato. 2006. Sphingosine 1-phosphate protects rat liver sinusoidal endothelial cells from ethanol-induced apoptosis: Role of intracellular calcium and nitric oxide. *Hepatology* 44: 1278-87.
- Zhou, B. B., and S. J. Elledge. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408: 433-9.
- Zhou, H., S. A. Summers, M. J. Birnbaum, and R. N. Pittman. 1998. Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 273: 16568-75.
- Zhou, J., and J. D. Saba. 1998. Identification of the first mammalian sphingosine phosphate lyase gene and its functional expression in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 242: 502-7.
- Zhou, Q., Y. Zhao, P. Li, X. Bai, and C. Ruan. 1992. Thrombomodulin as a marker of radiation-induced endothelial cell injury. *Radiat Res* 131: 285-9.
- Zhou, Z., S. S. Apte, R. Soininen, R. Cao, G. Y. Baaklini, R. W. Rauser, J. Wang, Y. Cao, and K. Tryggvason. 2000. Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4052-7.
- Zhu, Z., D. Lu, H. Kotanides, A. Santiago, X. Jimenez, T. Simcox, D. J. Hicklin, P. Bohlen, and L. Witte. 1999. Inhibition of vascular endothelial growth factor induced mitogenesis of human endothelial cells by a chimeric anti-kinase insert domain-containing receptor antibody. *Cancer Lett* 136: 203-13.
-

- Zumbansen, M. and W. Stoffel. 2002. Neutral sphingomyelinase 1 deficiency in the mouse causes no lipid storage disease. *Mol Cell Biol* 22(11): 3633-8.
- Zundel, W., and A. Giaccia. 1998. Inhibition of the anti-apoptotic PI(3)K/Akt/Bad pathway by stress. *Genes Dev* 12: 1941-6.

ANNEXES

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.
2007 Jan;292(1):G231-41. Epub 2006 Jan 19.

Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway.

Neunlist M, Aubert P, Bonnaud S, Van Landeghem L, Coron E, Wedel T, Naveilhan P, Ruhl A, Lardeux B, Savidge T, Paris F, Galmiche JP.

INSERM U 539, University of Nantes, Hôpital Hôtel Dieu, 44035 Nantes, France.

michel.neunlist@univ-nantes.fr

Although recent studies have shown that enteric neurons control intestinal barrier function, the role of enteric glial cells (EGCs) in this control remains unknown. Therefore, our goal was to characterize the role of EGCs in the control of intestinal epithelial cell proliferation using an *in vivo* transgenic and an *in vitro* coculture model. Assessment of intestinal epithelial cell proliferation after ablation of EGCs in transgenic mice demonstrated a significant increase in crypt cell hyperplasia. Furthermore, mucosal glial network (assessed by immunohistochemical detection of S-100beta) is altered in colon adenocarcinoma compared with control tissue. In an *in vitro* coculture model of subconfluent Caco-2 cells seeded onto Transwell filters with EGCs, Caco-2 cell density and [³H]thymidine incorporation were significantly lower than in control (Caco-2 cultured alone). Flow cytometry analysis showed that EGCs had no effect on Caco-2 cell viability. EGCs induced a significant increase in Caco-2 cell surface area without any sign of cellular hypertrophy. These effects by EGCs were also seen in various transformed or nontransformed intestinal epithelial cell lines. Furthermore, TGF-beta1 mRNA was expressed, and TGF-beta1 was secreted by EGCs. Exogenously added TGF-beta1 reproduced partly the EGC-mediated effects on cell density and surface area. In addition, EGC effects on Caco-2 cell density were significantly reduced by a neutralizing TGF-beta antibody. In conclusion, EGCs have profound antiproliferative effects on intestinal epithelial cells. Functional alterations in EGCs may therefore modify intestinal barrier functions and be involved in pathologies such as cancer or inflammatory bowel diseases.

Sphingosine-1-Phosphate Protects Proliferating Endothelial Cells from Ceramide-Induced Apoptosis but not from DNA Damage–Induced Mitotic Death

Stéphanie Bonnaud,¹ Colin Niaudet,¹ Géraldine Pottier,² Marie-Hélène Gaugler,^{1,3} Julie Millour,¹ Jacques Barbet,¹ Laure Sabatier,² and François Paris¹

¹Département de Recherche en Cancérologie, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U601; Université de Nantes, Faculté des Sciences, Nantes, France; ²CEA-DSV/DRR/LRO, Laboratoire de Radiobiologie et Oncologie; and ³Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, DRPH/SRBE/LRPAT, Fontenay-aux-roses, France

Abstract

Because of the central role of the endothelium in tissue homeostasis, protecting the vasculature from radiation-induced death is a major concern in tissue radioprotection. Premitotic apoptosis and mitotic death are two prevalent cell death pathways induced by ionizing radiation. Endothelial cells undergo apoptosis after radiation through generation of the sphingolipid ceramide. However, if mitotic death is known as the established radiation-induced death pathway for cycling eukaryotic cells, direct involvement of mitotic death in proliferating endothelial radiosensitivity has not been clearly shown. In this study, we proved that proliferating human microvascular endothelial cells (HMEC-1) undergo two waves of death after exposure to 15 Gy radiation: an early premitotic apoptosis dependent on ceramide generation and a delayed DNA damage–induced mitotic death. The fact that sphingosine-1-phosphate (S1P), a ceramide antagonist, protects HMEC-1 only from membrane-dependent apoptosis but not from DNA damage–induced mitotic death proves the independence of the two pathways. Furthermore, adding nocodazole, a mitotic inhibitor, to S1P affected both cell death mechanisms and fully prevented radiation-induced death. If our results fit with the standard model in which S1P signaling inhibits ceramide-mediated apoptosis induced by antitumor treatments, such as radiotherapy, they exclude, for the first time, a significant role of S1P-induced molecular survival pathway against mitotic death. Discrimination between ceramide-mediated apoptosis and DNA damage–induced mitotic death may give the opportunity to define a new class of radioprotectors for normal tissues in which quiescent endothelium represents the most sensitive target, while excluding malignant tumor containing proliferating angiogenic endothelial cells that are sensitive to mitotic death. [Cancer Res 2007;67(4):1–9]

Introduction

For decades, DNA damage was considered as the principal cause of cell death induced by ionizing radiation. DNA double-strand breaks, which generate chromosomal aberrations, induce mitotic death (e.g., clonogenic or reproductive death). Mitotic death is a slow process occurring after a variable number of cell cycles (1),

characterized by anaphase bridges, exclusion of micronuclei from the nucleus (2), cell enlargement (3), and generation of polyploid cells (4). Besides mitotic death, DNA damage is also involved in radiation-induced apoptosis by initiating signaling pathways that lead to the subsequent induction of a wide range of genes, such as *ATM* (5) or *p53* (6). New developments showed that other cell compartments are also involved in radiosensitivity. Indeed, cell membrane also represents a major target in radiation-induced apoptosis (7). Activation of the acid sphingomyelinase enzyme pool on the outer cell membrane layer potentiates sphingomyelin hydrolysis to ceramide, inducing membrane rearrangement, raft formation, and apoptotic signal transduction (8).

By supplying nutrients and oxygen, the endothelium network maintains tissue homeostasis. Vasculature represents a highly differentiated tissue where endothelial cells are quiescent in most of the normal physiologic conditions, except during tissue repair. Endothelium dysfunctions, such as loss of nonproliferating status during tumor angiogenesis, are involved in severe pathologies (9). Because of these physiologic outputs, understanding the death mechanism of the endothelial cell has a genuine relevance. *In vitro* radiosensitivity of endothelial cell has been essentially studied by clonogenic assays (10, 11). If clonogenic assay measures the capacity of the irradiated cell to divide into colony, correlation between clonogenic assay and mortality is partial. Indeed, clonogenic assay is related as much to survival and proliferation as to death, without discriminating the different types of death. New developments in radiobiology, such as generation of transgenic murine models, allowed to better define factors involved in endothelial cell radiosensitivity. *In vitro* (12) and *in vivo* (13) studies showed the crucial roles of acid sphingomyelinase enzyme activation and a rapid ceramide generation in radiation-induced endothelial cell death. Ionizing radiation acts directly on bovine aortic endothelial cell membrane preparations devoid of nuclei, proving that ceramide generation after irradiation is independent of DNA damage and cell cycle regulation induced by DNA double-strand breaks (14). Furthermore, invalidation of *asmase* gene in mice inhibited the radiation-induced endothelial cell apoptosis (15), which leads to tissue response as injury to the central nervous system (16), gastrointestinal syndrome (13), or blood-brain barrier disruption (17). Microvascular apoptosis has also been characterized by tumor response to high-dose radiotherapy. A 15 Gy irradiation of fibrosarcoma or melanoma tumor cells transplanted in mice rapidly induced a massive endothelial cell apoptosis via acid sphingomyelinase activation, which led to tumor regression (18). These results showed the importance of the acid sphingomyelinase and ceramide pair in endothelial cell apoptosis in normal or tumor tissue integrity after ionizing radiation, as well as the critical role of

Requests for reprints: François Paris, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U601, Institut de Biologie, 9 quai Moncousu, 44093 Nantes cedex 01, France. Phone: 33-2-40-08-47-33; Fax: 33-2-40-35-66-97; E-mail: fparis@nantes.inserm.fr.

©2007 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2802

endothelial cell in maintenance of normal or tumor integrity. Pharmacologic alteration of the ceramide metabolic pathway should modulate endothelial cell death and tissue response.

Sphingosine-1-phosphate (S1P), a ceramide metabolite, is a bioactive sphingolipid that has been characterized as a potent signal transduction-inducing molecule that exerts diverse biological responses, such as cellular differentiation, hypertrophy, proliferation, migration (19), and cell survival (20). S1P protection mechanisms seem to occur when apoptosis is dependent on ceramide generation (21). Indeed, S1P was shown to protect human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) from C₂-ceramide-mediated apoptosis (22). *In vivo* studies using C57Bl/6 mouse model showed that S1P pretreatment in ovarian bursa protects mice from chemotherapy- or radiotherapy-induced sterility through inhibition of ceramide-mediated apoptosis in oocytes (23, 24). Ceramide/S1P balance has the capacity to modulate cell apoptosis and tissue radiosensitivity. However, no study has validated the potential protecting effect of S1P on endothelial cells after high-dose radiation.

If previous studies showed that quiescent endothelial cells, found in normal tissue, died by ceramide generation-dependent apoptosis after exposure to high dose of radiation (13, 17, 25, 26), the death mechanisms, such as tumor angiogenesis, have not been explored for proliferating endothelial cells, which are present in pathologic tissues. In this study, we propose to investigate the contribution of two major death pathways (i.e., DNA damage-induced mitotic death and ceramide generation-induced apoptosis) involved in radiosensitivity status of the proliferating endothelial cell. Because of its radioprotective effects in several cell models toward a large spectrum of stresses, the involvement of S1P in protecting proliferating endothelial cells will be more specifically studied in these two major radiosensitive pathways.

Materials and Methods

Cell Culture and Treatments

Human microvascular endothelial cells (HMEC-1) were kindly provided by F.J. Candal (Center for Disease Control, Atlanta, GA; ref. 27). HMEC-1 cells were seeded at a density of 20,000/cm² and allowed to reach subconfluence for 5 days in MCDB 131 medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 15% FCS, 10 ng/mL epidermal growth factor, 2 µg/mL hydrocortisone, 2 mmol/L L-glutamine, 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin, referred to as endothelial cell complete medium.

Irradiations of subconfluent HMEC-1 cells were carried out in a Faxitron CP160 irradiator (Faxitron X-ray Corporation, Buffalo Grove, IL) at a dose rate of 1.48 Gy/min and a total dose between 2 and 30 Gy. Two hours before irradiation, cell medium was changed to low-serum medium (MCDB 131 medium supplemented with 0.1% FCS, 2 µg/mL hydrocortisone, 2 mmol/L L-glutamine, 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin). Different pharmacologic drugs were added to the low-serum medium 2 h before irradiation: 1 µmol/L fumonisins B1 (Biomol, Philadelphia, PA) or 1 µmol/L S1P (Biomol; prepared as previously described in ref. 23). Exceptions were made for desipramine (50 µmol/L; Sigma-Aldrich, St. Quentin-Favier, France), which was added 15 min before irradiation and removed 1 h after, and nocodazole (0.1 µg/mL; Sigma-Aldrich), which was added 24 h after radiation for another 24 h.

Detection of Apoptosis

Cell counting assay. As previously described (28), apoptotic fraction was calculated by taking the ratio of floating cell number to total cell number (floating + adherent). Floating cell population represented the nonadherent cells in the culture medium, and loosely adherent cells were derived from

two PBS washes of the monolayer. Adherent cells were trypsinized. Cell number of both fractions was determined using Malassez slides.

Detection of apoptotic marker Apo2.7. Apo2.7 (7A6 antigen) has been described as a mitochondrial marker of apoptosis (29). Adherent and floating cells, either pooled or not, were washed twice with PBS, and labeled with the monoclonal antibody (mAb) anti-Apo2.7-phycoerythrin (clone 2.7A6A3) according to the supplier's recommendations (Immunotech, Marseilles, France). Acquisitions were done on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), and data were analyzed using CellQuest software (BD Biosciences).

Cell Cycle Analysis

[³H]thymidine incorporation. Sixteen hours after irradiation, HMEC-1 cells were incubated with low-serum medium containing [³H]thymidine (1 µCi/mL) for 8 h. Cells were then trypsinized and harvested with a Titertek cell harvester (Flow Laboratories, Rickmansworth, United Kingdom) on glass fiber filter (Wallac Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). Cells were then dried and incubated with Betaplate scintillation liquid (Wallac Perkin-Elmer). β Radioactivity was counted by using a scintillation spectrometer (Wallac Perkin-Elmer). [³H]thymidine incorporation was analyzed with the Micro-beta Windows Workstation software (Wallac Perkin-Elmer).

Propidium iodide staining. Floating and adherent cells were pooled, washed with PBS, fixed in 70% ethanol for 20 min at -20°C, and stained with 40 µg/mL propidium iodide (Sigma-Aldrich) and 100 µg/mL RNase (Qiagen, Courtaboeuf, France) for 30 min at 37°C in the dark. Cell cycle phases were quantified using Flow Jo software (Tree Star, Ashland, OR).

DNA Damage Assessment

Detection of phosphorylated histone H2AX. For the detection of DNA double-strand breaks after irradiation, staining for phosphorylated H2AX (γH2AX) was conducted as described previously (30). Cells were trypsinized, washed with PBS, and fixed in 70% ethanol overnight at -20°C. Cells were rehydrated for 10 min in PBS/4% FCS/0.1% Triton X-100, and resuspended in 200 µL of mouse mAb against γH2AX (clone JBW301; Euromedex, Mundolsheim, France; 1:500 dilution in PBS/2% FCS/0.1% Triton X-100) for 2 h at room temperature. Cells were washed in PBS/2% FCS/0.1% Triton X-100 and resuspended in secondary antibody, a phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse IgG F(ab')₂ fragment (Beckman Coulter, Roissy, France; 1:100 dilution in PBS/2% FCS/0.1% Triton X-100) for 1 h at room temperature. Cells were washed and resuspended in 20 µg/mL 7-aminocoumarin D (Sigma-Aldrich) before analysis with a BD FACSAArray Bioanalyser (BD Biosciences). Analyses of flow cytometry data were conducted using CellQuest software.

Cytogenetic analyses. Twenty-two hours 30 min after 15 Gy irradiation, colchicine (0.1 µg/mL; Sigma-Aldrich) was added for 1 h 30 min before collecting the cells. Then, cultures were trypsinized and suspended in hypotonic solution (0.075 mol/L KCl), incubated for 20 min at 37°C, and fixed in methanol/acetic acid (3:1). Cell suspensions were dropped on slides and dried. Slides were processed according to the fluorochrome plus Giemsa method by Perry and Wolff (31) to score mitotic index (percentage of metaphase), chromosomal aberrations, and number of cell divisions done posttreatment. Cell culture duration postirradiation was determined to score chromosomal aberrations exclusively from the first division. Telomeres were detected by a (C3TA2)3PNA-Cy3 probe (Perceptive Biosystem, Boston, MA), whereas centromeres were detected by a Pan-centromere probe (Cambio, Cambridge, United Kingdom). Hybridized metaphases were captured with a charge coupled device camera (Zeiss, Jena, Germany) coupled to a Zeiss Axioplan microscope and were processed with the ISIS software (MetaSystems, Altlusheim, Germany). At least 100 metaphases were examined for each sample. We scored chromosome rearrangements, such as dicentric or multacentric, rings, and excess acentrics (i.e., we did not score the acentric generated with one dicentric chromosome). To determine the number of breaks per metaphase, the number of breaks per type of aberration was assigned as follows: one dicentric (two breaks), one tracentric (four breaks), one quadricentric (six breaks), one pentacentric (eight breaks), one ring (two breaks), and one minute or one acentric (one break).

Q4

Q5

Detection of micronuclei. Floating and adherent cells were pooled 48 h after 15 Gy irradiation, washed with PBS, spread on slides with a Cytospin (Thermo Electron Corp., Waltham, MA) at 800 rpm for 2 min, fixed in paraformaldehyde (0.5%) for 30 min, and permeabilized with Triton X-100 (0.1% in PBS) for 10 min. Slides were washed twice with PBS, incubated in 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide (Sigma-Aldrich) and 1 mg/mL RNase (Qiagen) for 1 h at 37°C in the dark, and rinsed in 10 mmol/L Tris. Cells were visualized with a $\times 400$ lens on a fluorescent microscope (Axiovert 200-M; Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

Statistical Analysis

All values were reported as mean \pm SD or SE as indicated. Data were analyzed using the Student's *t* test or the Mann-Whitney test (SIGMASTAT software, Jandel Scientific, Erkrath, Germany). Differences were considered as significant at $P < 0.05$ unless indicated otherwise.

Results

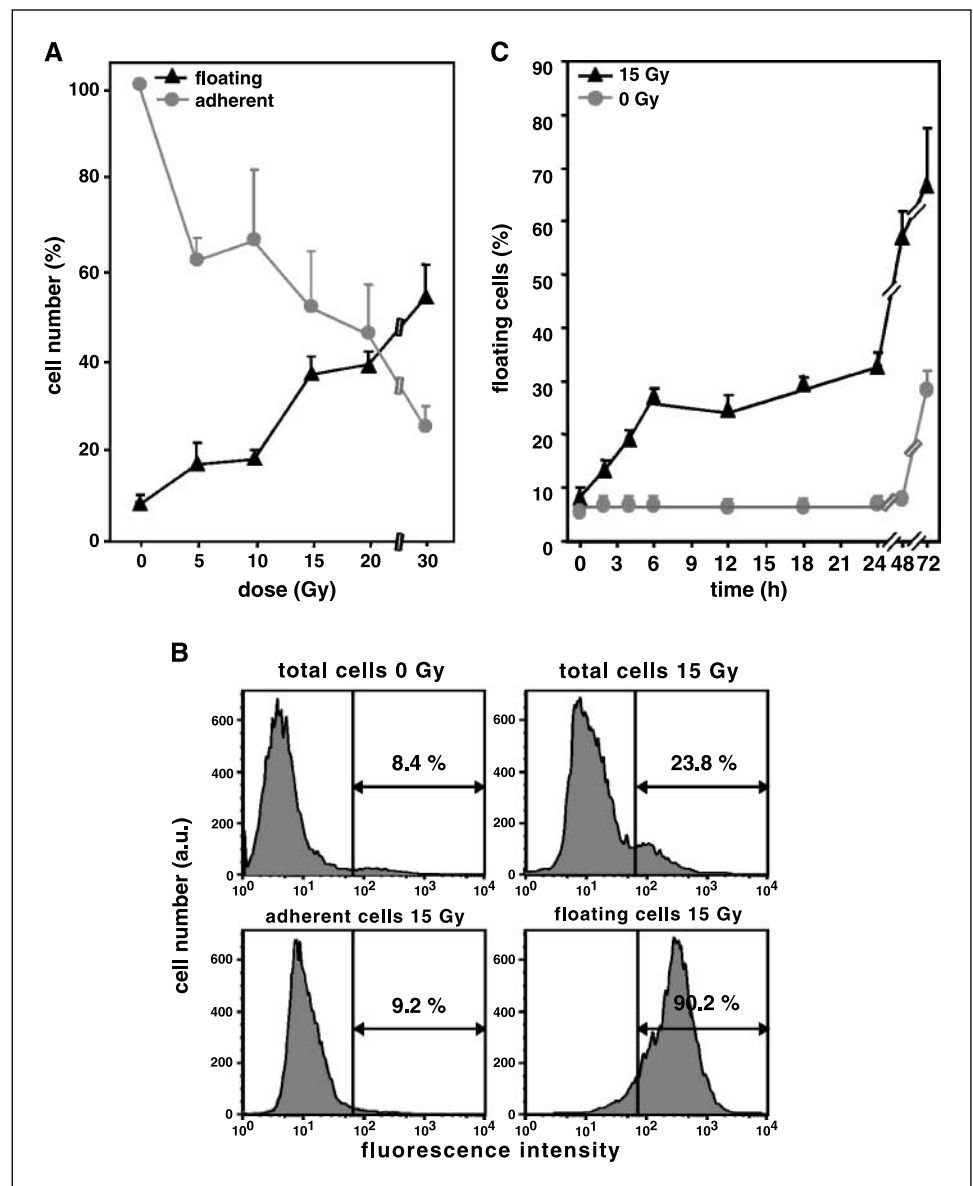
Irradiation induces endothelial cell apoptosis in a dose- and time-dependent manner.

Exposure of subconfluent HMEC-1 to

X-rays results in a dose- and time-dependent decrease in the number of adherent cells and increase in the number of floating cells. Twenty-four hours after radiation, $38.3 \pm 4.9\%$, $48.6 \pm 12.2\%$, and $75.2 \pm 4.9\%$ less adherent cells were quantified, respectively, in 5, 15, or 30 Gy irradiated cells compared with unirradiated cells. Floating cells in the culture medium increased with dose. Compared with control, 2-, 4.5-, and 6.5-fold higher floating cells were quantified in 5, 15, or 30 Gy conditions, respectively (Fig. 1A). The single dose of 15 Gy is chosen for the rest of the study because of the physiologic relevance of endothelial cell apoptosis after irradiation at high dose (13). The use of the apoptotic mitochondrial marker Apo2.7 confirms the induction of apoptotic cells after radiation (23.8% apoptotic cells 24 h after 15 Gy versus 8.4% for control; Fig. 1B). Furthermore, the fact that 90.2% of the floating cells are Apo2.7 positive validated our cell counting assay as an apoptotic assay (Fig. 1B). Similar to the dose-dependent quantification of endothelial cell death, we follow the generation of apoptotic HMEC-1 cells as a function of time. After a single 15 Gy

F1

Figure 1. Irradiation induces endothelial cell apoptosis *in vitro* in a dose- and time-dependent manner. **A**, floating (\blacktriangle) and adherent (\bullet) cell number counts from subconfluent HMEC-1 24 h after exposure to 0, 5, 10, 15, 20, and 30 Gy. Y-axis, % [floating cells / (floating cells + adherent cells)] at each dose for the floating cell curve and % [(adherent cells at *x* Gy) / (adherent cells at 0 Gy)] for the adherent cell curve. Points, mean from at least three independent experiments; bars, SE. **B**, determination of apoptotic cell death done by flow cytometry using apoptotic marker Apo2.7 24 h after 15 Gy irradiation. Original data from one of three experiments. **C**, apoptotic cell counting assay of unirradiated (\bullet) and irradiated (\blacktriangle) HMEC-1 incubated 0, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 48, and 72 h after 15 Gy radiation exposure. Values are mean \pm SD from three to eight independent experiments ($P < 0.001$).



irradiation, two waves of floating cells were observed: the first one reached a plateau at 25% of apoptotic cells 6 h postradiation until 24 h; the second one started 24 h postradiation increasing to $66 \pm 20.2\%$ of floating cells at 72 h (Fig. 1C) and reaching a peak of $>86\%$ at 92 h (data not shown).

Inhibition of ceramide pathway by S1P or desipramine blocks early apoptosis but not late death. To confirm that radiation-induced apoptosis in HMEC-1 cells is mediated by acid sphingomyelinase activation-induced ceramide generation, as shown in endothelial cells *in vivo* in the central nervous system (16) or in gastrointestinal syndrome (13), experiments were carried out using the acid sphingomyelinase inhibitor desipramine. Apoptotic counting assay done 24 h postirradiation shows that

50 $\mu\text{mol/L}$ desipramine pretreatment significantly decreased apoptosis by 52.4%, compared with the 15 Gy control ($P = 0.003$), to background level of nonirradiated cells (Fig. 2A). Nevertheless, desipramine treatment does not inhibit the late apoptosis observed at 72 h during the second wave of death ($39.4 \pm 1.4\%$ of apoptosis for control and $42.5 \pm 1.4\%$ for desipramine-treated cells; $P > 0.1$). Besides the acid sphingomyelinase pathway, *de novo* biosynthesis by ceramide synthase represents another major ceramide generation pathway activated in endothelial cells after radiation (26, 32). To evaluate the specificity of the acid sphingomyelinase pathway, the ceramide synthase inhibitor fumonisins B1 was used. We observed no difference between radiation-induced apoptosis of 1 $\mu\text{mol/L}$ fumonisins B1-treated HMEC-1 and untreated cells, 24 and

F2

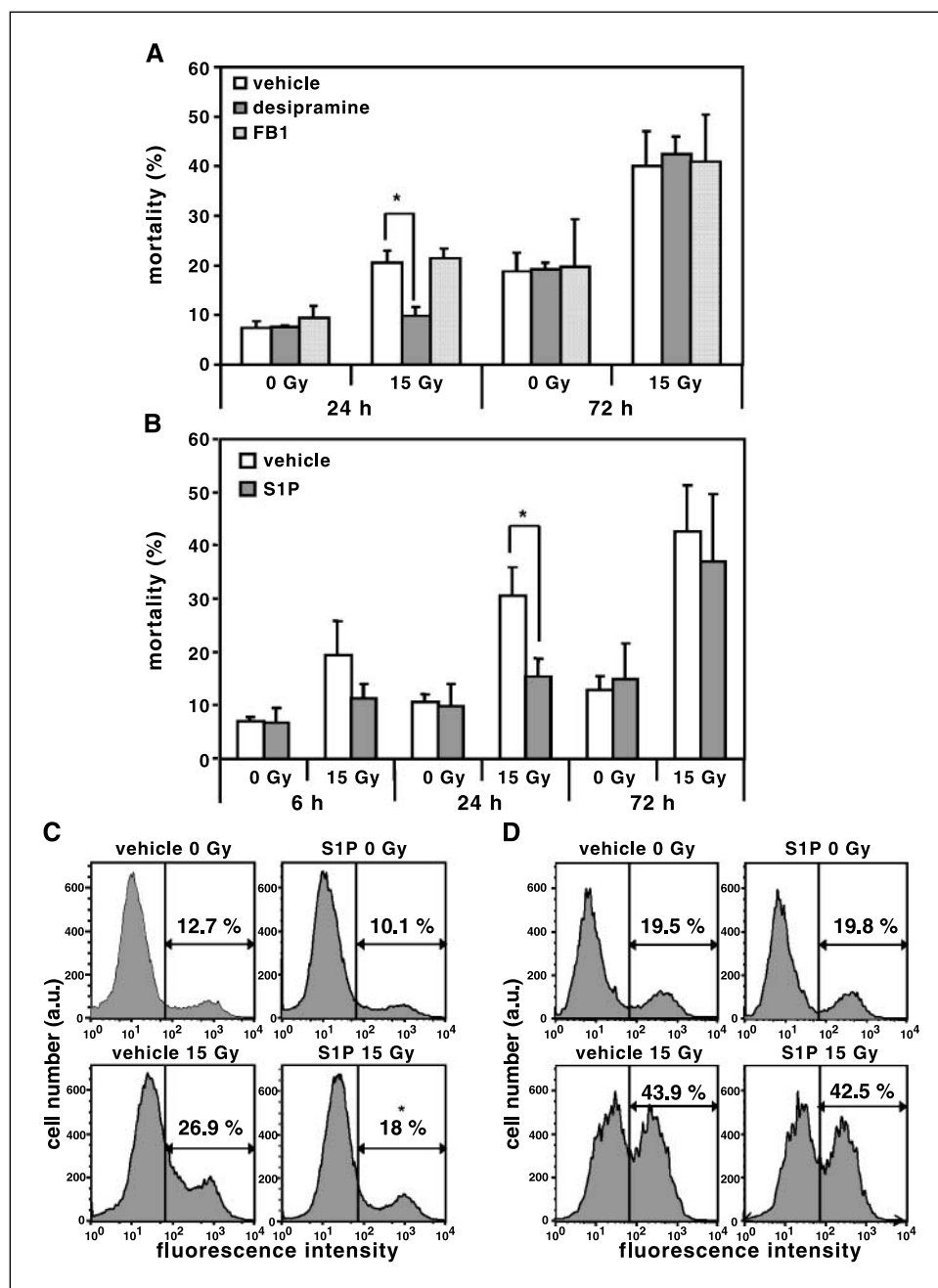


Figure 2. Inhibition of ceramide pathway by S1P blocks early apoptosis but not late death. A, comparison of apoptotic cell counting assay of HMEC-1 24 h after exposure to 15 Gy radiation treated either with 50 $\mu\text{mol/L}$ desipramine (filled columns), 1 $\mu\text{mol/L}$ fumonisins B1 treatment (shaded columns), or control (empty columns). Columns, mean from two independent experiments carried out in triplicates; bars, SD ($P < 0.005$). B, apoptotic cell counting of 1 $\mu\text{mol/L}$ S1P-pretreated (filled columns) or vehicle-pretreated (empty columns) HMEC-1 incubated for 6, 24, and 72 h after exposure to 15 Gy radiation. Columns, mean from three independent experiments; bars, SD ($P < 0.05$). C and D, determination of apoptotic cell death done by flow cytometry using the apoptotic marker Apo2.7 of 15 Gy irradiated HMEC-1 incubated 24 h (C) or 72 h (D). Values are mean \pm SE from three independent experiments done in duplicates ($P \leq 0.001$). Original FACS data from one of three experiments.

72 h after 15 Gy irradiation (Fig. 2A), proving the major role of the acid sphingomyelinase and ceramide pair in HMEC-1 early radiosensitivity.

Because of the ceramide/S1P rheostat model, we investigated if S1P could protect HMEC-1 from radiation-induced apoptosis mediated by ceramide generation. Two hours of pretreatment with 1 $\mu\text{mol/L}$ S1P lowered the number of apoptotic cells by 2-fold, 24 h after 15 Gy, nearly to the background level ($30.5 \pm 5.2\%$ of apoptosis for control and $15.3 \pm 3.4\%$ for S1P-treated cells, $P = 0.013$; Fig. 2B). Apo2.7 staining (Fig. 2C) and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling (TUNEL) assay (data not shown) confirmed S1P radioprotection, which pointed out a significant 33.3% and 21.2% decrease in apoptotic HMEC-1 cell percentage in 15 Gy irradiated condition pretreated with 1 $\mu\text{mol/L}$ S1P compared with the 15 Gy control, respectively. The specificity of the S1P radioprotection was determined by dihydro-S1P, a sphingolipid related to S1P. Indeed, 2 h of 1 $\mu\text{mol/L}$ dihydro-S1P pretreatment does not inhibit the HMEC-1 apoptosis rate 24 h after 15 Gy (data not shown).

Although S1P inhibits radiation-induced apoptosis in HMEC-1 cells 24 h after radiation, protection by S1P is not effective in the late death wave. Indeed, no statistical difference in floating cell counting assay was found 72 h after 15 Gy irradiation between the S1P-treated and untreated conditions ($36.9 \pm 12.8\%$ for S1P-treated group versus $42.7 \pm 8.5\%$ for vehicle-treated group; $P > 0.5$; Fig. 2B). Results are confirmed by Apo2.7 staining (Fig. 2D). After exposure to 15 Gy radiation, we observed percentages of death of 43.9% for control and 42.5% for S1P-pretreated cells.

S1P does not protect HMEC-1 from DNA damage and mitotic catastrophe. The fact that desipramine or S1P has no action on late death shows that the second wave of death is independent of acid sphingomyelinase activation-induced ceramide generation and membrane signaling. DNA damage-induced cell death is also a major cell death pathway after X-ray radiation (33). Cells containing γH2AX foci (each focus represents a single DNA double-strand break) were quantified by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis as a function of time, irradiation, and S1P treatment. Maximum γH2AX -positive cell ratio was observed within the window between 30 min and 1 h after exposure to 15 Gy radiation ($83.2 \pm 6.7\%$ in sham condition versus $74.3 \pm 11.2\%$ in S1P condition 30 min postradiation, $P > 0.5$; Fig. 3A). Furthermore, no difference in the mean of fluorescence intensity, representing the number of foci per cell, was observed at the different time points of the experiment (data not shown). Similar kinetic profiles of DNA double-strand break induction and their repair, represented by the increase and the decrease of γH2AX -positive cells, respectively, were observed in HMEC-1 cells treated or not by S1P (Fig. 3A).

Irradiation-induced DNA double-strand breaks leads to chromosomal rearrangements, mitotic catastrophe, and death. Radiation-induced chromosomal damage, quantified by the number of chromosomal breaks per metaphase, was studied 24 h after exposure to radiation. Because of the high level of cell death and low level of metaphases observed after exposure to 15 Gy radiation, chromosomal breaks per metaphase were analyzed in HMEC-1 cells irradiated at 0, 2, and 5 Gy. First, we observed that the percentage of breaks per metaphase increased in a dose-dependent manner, independent of treatment with S1P or its vehicle (0 Gy, $P = 0.5$; 2 Gy, $P > 0.3$; 5 Gy, $P > 0.5$; Fig. 3B). Furthermore, no difference in quality of breaks, such as multicentric, acentric, and minute chromosomal damages, was observed in irradiated

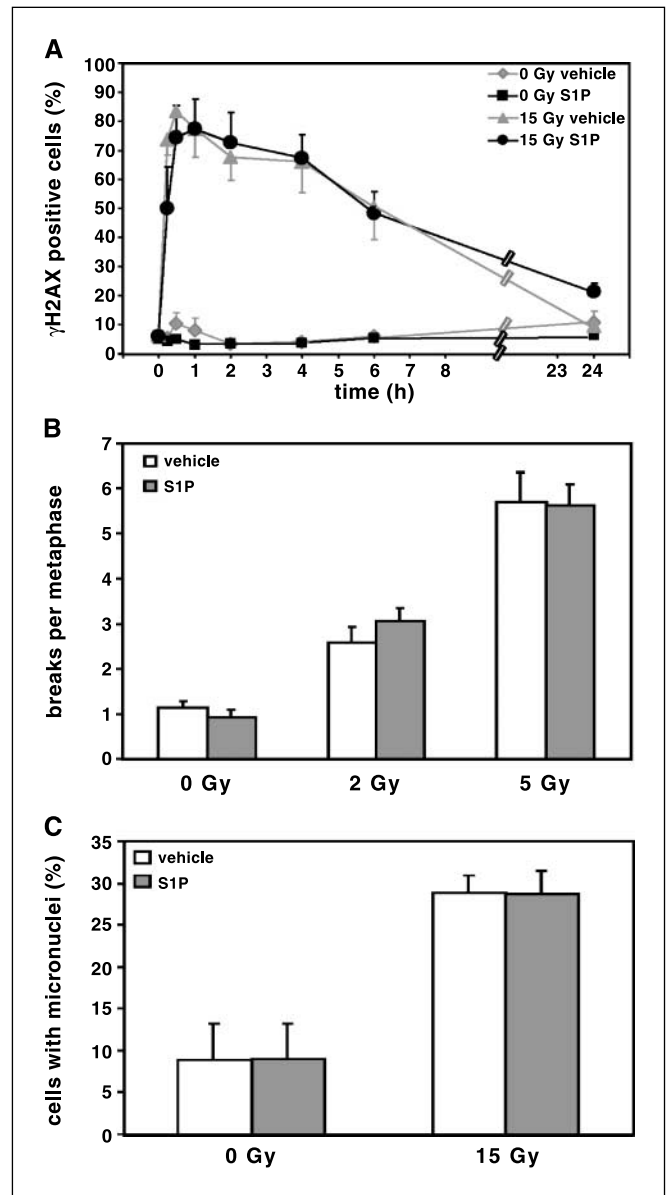


Figure 3. S1P does not protect HMEC-1 from DNA damage and mitotic catastrophe. **A**, labeling for DNA damage foci with mAb against γH2AX of HMEC-1 treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ S1P (\bullet) or vehicle (\blacktriangle) before exposure to 15 Gy radiation. Labeling occurs 0, 15, or 30 min, and 1, 2, 4, 6, or 24 h postradiation. Points, mean from four independent experiments done in duplicates or triplicates; bars, SE. **B**, chromosomal breaks of 1 $\mu\text{mol/L}$ S1P-pretreated (filled columns) or vehicle-pretreated (empty columns) HMEC-1 in metaphase by colchicine treatment exposed 24 h after 15 Gy radiation exposure. Columns, mean of 100 metaphases analyzed per condition; bars, SE. **C**, micronuclei formation of 1 $\mu\text{mol/L}$ S1P-pretreated or vehicle-pretreated HMEC-1 exposed 48 h after 15 Gy radiation exposure. Columns, mean from four independent experiments with 200 nuclei per experiment; bars, SD.

condition with or without S1P incubation (data not shown). Experiments carried out at 10 and 15 Gy irradiation showed the same rate and types of breaks per metaphase tendencies when HMEC-1 cells were treated with S1P or its vehicle (data not shown; metaphase number is too small for statistical distribution).

Severe chromosomal damage fails to produce correct chromosomal segregation after mitosis, which results in micronuclei exclusion and leads to mitotic death (1). To assess the mechanism

F3

of death during the second-wave postirradiation, micronuclei formation was quantified 48 h after exposure to 15 Gy radiation. A 3.3-fold increase of cells with one or more micronuclei was observed after radiation compared with nonirradiated cells, proving that the late death represents cells that are dying by mitotic death (Fig. 3C). Furthermore, pretreatment with SIP does not inhibit the amount of cells with one or more micronuclei after irradiation [SIP + 15 Gy treatment ($28.8 \pm 2.1\%$) versus 15 Gy treatment ($28.7 \pm 2.7\%$); $P > 0.9$; Fig. 3C].

SIP does not modulate cell cycle inhibition involved in mitotic death. Mitotic death is considered to be a slow process occurring after a variable number of cell cycles (34). To confirm the nonprotective effect of SIP during the mitotic death wave, proliferation and regulation of cell cycle were studied after irradiation. First, we ensured that SIP radioprotection into the first wave of apoptotic death is not due to an upsurge of endothelial cell proliferation using [^3H]thymidine incorporation assay. In nonirradiated HMEC-1 cells, 24 h after SIP treatment, proliferation increased by 1.2-fold compared with untreated cells, confirming the proangiogenic action of SIP (Fig. 4A; ref. 35). However, after 15 Gy irradiation, cell proliferation decreased by 7.3- and 8.9-fold for sham- and SIP-treated cells, respectively, but no difference between vehicle or SIP-treated cell proliferation was observed ($P > 0.8$; Fig. 4A). Results were confirmed by analysis of mitotic index. Twenty-four hours after a dose range of 2 to 15 Gy, HMEC-1 mitotic index decreased in a dose-dependent manner. No statistical difference between SIP-treated cell mitotic index and control was observed (for 15 Gy, $P > 0.7$; Fig. 4B).

Cell cycle distribution 24 h after 15 Gy irradiation was examined by propidium iodide incorporation (Fig. 4C). Unirradiated cultures maintained a typical cell cycle distribution of asynchronous populations (G_1 , $41 \pm 6.8\%$ for control and $43.4 \pm 4.6\%$ for SIP; S, $15.8 \pm 8\%$ for control and $18.4 \pm 6.1\%$ for SIP; G_2 -M, $23.1 \pm 11.2\%$ for control and $19.6 \pm 4.8\%$ for SIP). As already been shown, irradiation-induced G_2 -M arrest was observed in HMEC-1 since 6 h postirradiation. Moreover, SIP does not modulate the efficiency or the kinetic of the G_2 -M cell cycle control after irradiation. Twenty-four hours after exposure to 15 Gy radiation, $48.2 \pm 8.2\%$ of the control cells were arrested in G_2 -M versus $50 \pm 5.5\%$ for SIP-treated cells (Fig. 4C; $P > 0.6$).

Combination of SIP and nocodazole treatments highly protects proliferating endothelial cell by inhibiting ceramide apoptotic pathway and mitotic death, respectively. Because cell cycle has to be processed to develop mitotic death, we used nocodazole, which inhibits microtubule formation, to block or delay mitotic death. Forty-eight hours after 15 Gy irradiation, 30.6% decreased cell death was observed in nocodazole-treated HMEC-1 compared with control cells (Fig. 5A). SIP treatment showed no significant difference between SIP or sham-treated irradiated cells, thus confirming data shown in Fig. 2B and D ($P > 0.2$; Fig. 5A). To further validate that HMEC-1 radiation-induced death involves two different mechanisms (e.g., ceramide-mediated apoptosis and DNA damage-mediated mitotic death), HMEC-1 were treated with SIP before irradiation and with nocodazole after irradiation. Enhancements of radioprotection by 2- and 1.5-fold were observed when 15 Gy irradiated HMEC-1 cells were treated by SIP + nocodazole ($P \leq 0.001$) and by nocodazole alone ($P \leq 0.001$; Fig. 5A), respectively.

Because of their involvement in mitotic death, micronuclei incidence was determined in irradiated HMEC-1 to validate the protection by dual SIP + nocodazole treatments (Fig. 5B). First, as

expected, treatment by SIP did not modify the incidence of micronuclei in irradiated HMEC-1 ($P > 0.9$; Fig. 5B). Moreover, cell population irradiated and treated with nocodazole contains 40.5% fewer cells with micronuclei compared with control ($P = 0.004$; Fig. 5B). Better radioprotection was observed when cells were treated with SIP and nocodazole together. In this condition, incidence of cells with micronuclei decreased to 37.5% compared with untreated cells ($P \leq 0.001$; Fig. 5B).

F4

F5

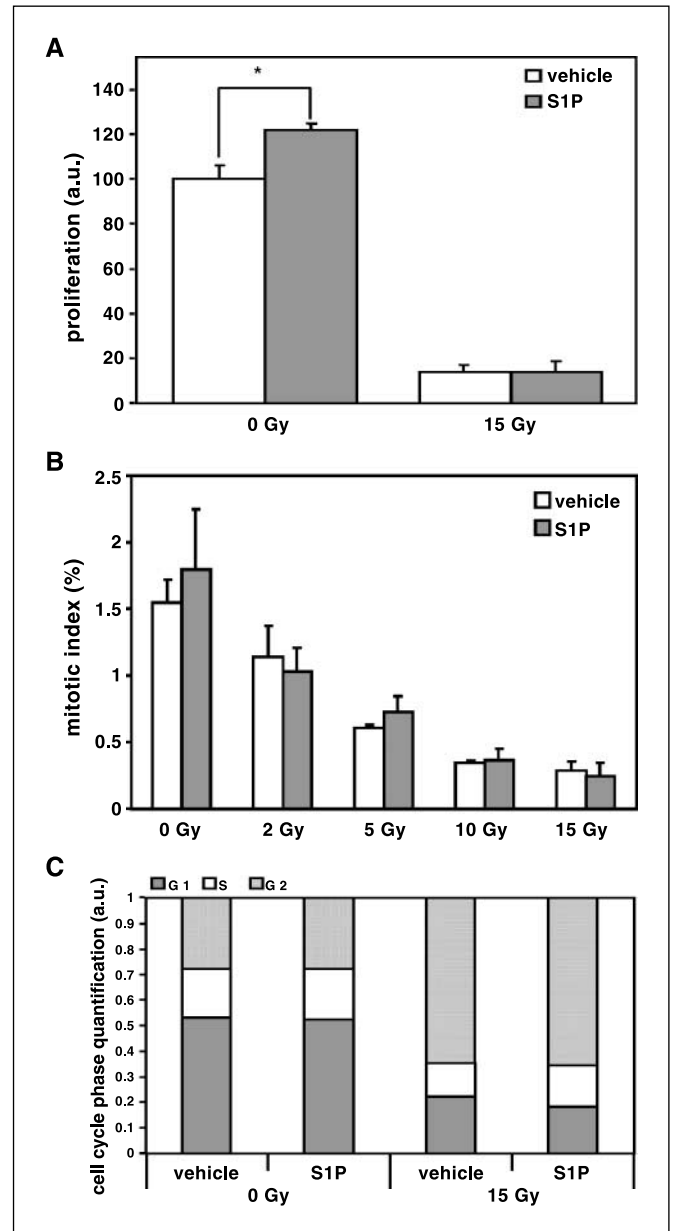


Figure 4. SIP does not modify cell cycle inhibition involved in mitotic catastrophe. A, SIP-treated (filled columns) and vehicle-treated (empty columns) HMEC-1 proliferation 24 h after 15 Gy irradiation done using [^3H]thymidine incorporation. Columns, mean from five independent experiments; bars, SD. B, mitotic index of SIP pretreatment (filled columns) or sham control cells (empty columns) HMEC-1 after 0, 2, 5, 10, and 15 Gy irradiation. Columns, mean from three independent experiments with 1,000 nuclei per experiment; bars, SD. C, cell cycle analysis using Flow Jo software after propidium iodide staining. Columns, mean from four independent experiments done in duplicates.

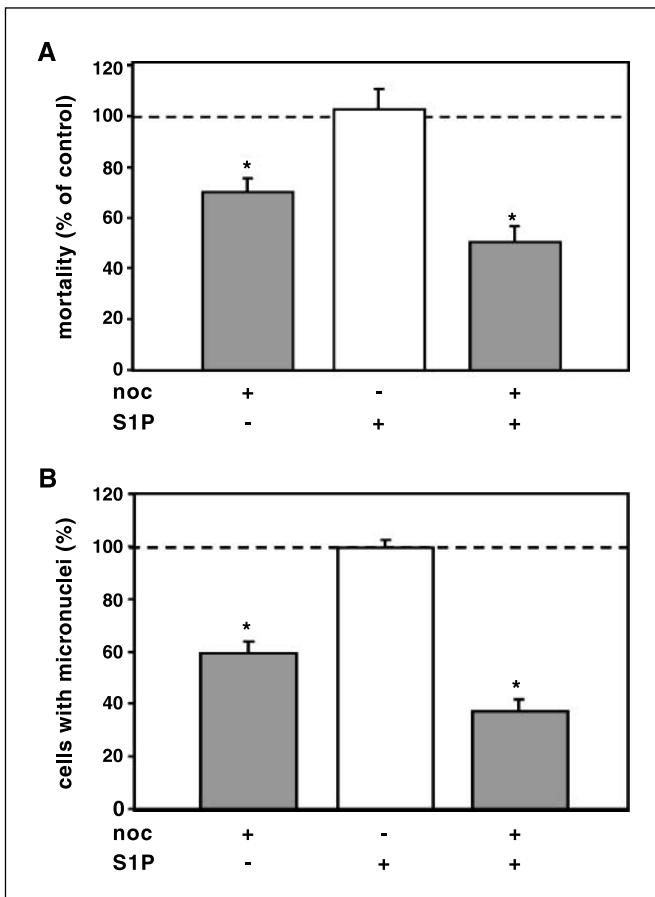


Figure 5. Arrest of ceramide pathway by S1P and mitotic catastrophe by nocodazole inhibit radiation-induced endothelial cell death. **A**, 15 Gy irradiated HMEC-1 treated 2 h before irradiation with 1 $\mu\text{mol/L}$ S1P and 24 h postradiation with 0.1 $\mu\text{g/mL}$ nocodazole, and stained 48 h postradiation with apoptotic marker Apo2.7. *Columns*, mean from four independent experiments done in duplicates or triplicates; *bars*, SE. **B**, micronuclei formation after 48 h of 15 Gy irradiated HMEC-1 treated 2 h before irradiation with 1 $\mu\text{mol/L}$ S1P and 24 h postradiation with 0.1 $\mu\text{g/mL}$ nocodazole. *Columns*, mean from four independent experiments with 200 nuclei per experiment; *bars*, SD.

Discussion

The effect of endothelial cell radiosensitivity in tissue damage and tumor regression to high-dose radiation has been previously described (13, 18, 36). Confluent endothelial cells have been shown to die after radiation through generation of proapoptotic factor ceramide (14). However, if mitotic death represents the established radiation-induced death pathway for most dividing eukaryotic cells, involvement of mitotic death in proliferating endothelial cell radiosensitivity has not been distinctly shown. In this study, we prove that proliferating endothelial cells undergo mitotic death if ceramide-mediated death is inhibited by S1P (Fig. 6).

Apoptotic cell count, Apo2.7 staining, and TUNEL assay of irradiated HMEC-1 cells showed that HMEC-1 radiosensitivity comprises two waves of death. The first wave of death, between 0 and 24 h postradiation, depended on acid sphingomyelinase activation and ceramide generation because desipramine treatment was able to inhibit this early endothelial death. The second wave of death occurring 24 h after radiation was insensitive to desipramine treatment and thus independent of acid sphingomyelinase/ceramide apoptotic pathway (Fig. 6). Chromosomal aberrations

studies and micronuclei assays correlated the second wave of death with DNA damage generation and mitotic death, the definitive involvement of which was proven by inhibition of late cell death by nocodazole, a mitosis inhibitor.

DNA damage triggers molecular pathways controlled by key molecular node, especially ceramide synthase and p53. In bovine aortic endothelial cells, fumonisins B1 blocked X-ray-induced death through inhibition of ceramide synthase, making it an attractive target to explain our late cell death phenomenon (32). In our endothelial cell model, maximum tolerated dose of fumonisins B1 was not able to inhibit the second wave of death, meaning that ceramide synthase activation does not seem to be involved in radiation-induced HMEC-1 mitotic death. The major discrepancy between Liao's study and ours is the proliferation status of the endothelial cells. X-ray experiments in bovine aortic endothelial cells have been realized using quiescent endothelial cells, excluding the mitotic death analysis, whereas our experiments allowed use of proliferating HMEC-1 cells to study the involvement of mitotic death and its molecular factors in endothelial cell radiosensitivity.

HMEC-1 cells are immortalized with SV40 large T-antigen, which inactivates p53 and might modify DNA damage-induced apoptosis and cell cycle arrest. However, previous results have shown that acid sphingomyelinase- and ceramide-mediated apoptosis induced in microvascular endothelium was independent of p53 status. At the difference of inactivation of *asmase* gene, disruption of p53 in mice neither modified high-dose radiation-induced endothelial cell apoptosis inside the lamina propria and around the crypt nor inhibited small intestine necrosis or animal death timing (13). Our first wave of death in HMEC-1 is dependent on acid sphingomyelinase activation and ceramide generation, in which SV40 is not known to be interfering with. Mitotic death occurs after cell cycle G_2 arrest. If p53 is known to regulate cell cycle after ionizing

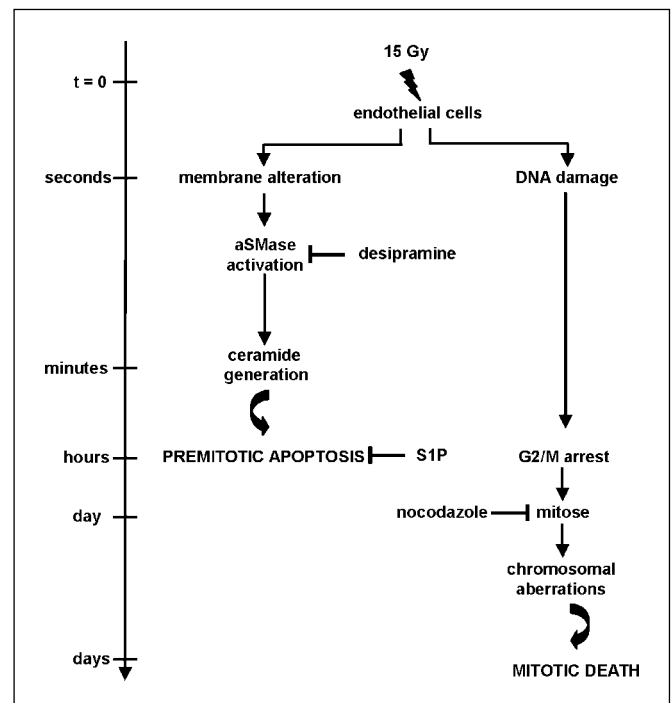


Figure 6. Schematic sequence of molecular events leading to ceramide-mediated premitotic apoptosis and DNA damage-induced mitotic death.

F6

radiation, especially by inducing G₁ arrest through increase of p21 expression, different studies also showed that X-ray-induced apoptosis occurring after G₂ arrest might be independent of p53 (37–39). We ultimately prove the relevance of the two waves of death by confirming data obtained in the SV40-immortalized endothelial cell, in human primary macrovascular endothelial cells. Indeed, SIP is able to protect human primary macrovascular endothelial cells from the first wave of radiation toxicity at 24 h but not from the second wave of death observed at 72 h (data not shown), as shown in HMEC-1. Further studies will help to better understand the molecular pathways involved in the second wave of death.

Pretreatment of HMEC-1 with a therapeutic relevant dose of SIP protects against early apoptosis, which is dependent on ceramide generation induced by radiation exposure, but not the late death, which is dependent on DNA damage. Moreover, SIP action in irradiated HMEC-1 cells seems specific, because other sphingolipids, such as dihydro-SIP, do not enhance radioprotection (data not shown). A key function of SIP is to mediate vascular growth by enhancing endothelial cell proliferation. This proproliferative action of SIP could explain its radioprotective activity. This survival mechanism has already been embodied by lovastatin, a lipid-lowering molecule, which inhibits HUVEC radiosensitivity at late time point after radiation, partially by an increase of endothelial cell proliferation (40). Our results using [³H]thymidine incorporation or mitotic index analysis showed that SIP does not protect microvascular endothelial cell by an upsurge of proliferation (Fig. 4A and B). Apo2.7 apoptotic staining definitely proves direct inhibition of ceramide-mediated apoptosis by SIP treatment (Fig. 2C). Our results fit with the main dogma of the “ceramide/SIP rheostat,” which determines the death and survival status of cells exposed to lethal stress (41). Moreover, our study is the first one to show the pharmacologic input of SIP in modulation of microvascular endothelial cell apoptosis after exposure to a high dose of ionizing radiation.

To understand the absence of SIP protection toward mitotic death, we wondered if SIP interfered with DNA damage-controlled pathway. We first studied the rate of loss of γ H2AX, a phosphorylated histone localized in a DNA repair foci (42). The fact that SIP- or vehicle-treated cells throughout expressed a similar percentage of cells with foci and a similar average number of foci per cell (mean value) proves that SIP pretreatment does not affect the rate of DNA double-strand breaks induced by ionizing radiation and does not confer an enhancement of repair machinery. Because insufficiently repaired or misrepaired double-strand breaks might lead to chromosome breaks, deletions, and translocations (43), we also analyzed the percentage of breaks per metaphase with respect to the ionizing radiation dose. SIP pretreatment did not modulate the rate of breaks by metaphase (quantitative analysis) or the types of breaks, such as ring, acentric, and multicentric (qualitative analysis), induced by increasing dose of ionizing radiation (Fig. 3B; and data not shown).

Chromosomal abnormalities, appearance of micronuclei, and cell cycle modulation, which we all validated in our endothelial cell model, are the main characteristic events of mitotic death (1). Furthermore, mitotic death requires a transient G₂-M arrest and also takes a longer incubation period (>24 h) until execution of cell death compared with premitotic apoptosis (39). As previously shown by Khodarev et al. (11), we also observed by propidium iodide staining the strong G₂-M arrest and the dead cells in sub-G₁ phase 48 h postirradiation, characteristic of the mitotic death.

Mitotic death was thought to be exhibited mainly by non-hematopoietic cell lineages, although the involvement of mitotic death in proliferating endothelial cell radiosensitivity has not been clearly shown, except when endothelial cells are irradiated after angiostatin pretreatment (10).

Modulating the early ceramide-dependent death by SIP and the late DNA damage-dependent death by nocodazole affected proliferating endothelial cell death after radiation and showed the independence of the two waves of death. Compared with sham-irradiated cells, SIP pretreatment does not reduce the amount of cells with micronuclei, a mitotic death marker, explaining the high level of mitotic death observed 48 h postirradiation in both conditions. Differences in late death and micronuclei rates (Fig. 5A and B, respectively) between nocodazole-treated and SIP + nocodazole-treated irradiated cells are explained by the fact that SIP and nocodazole treatment gives an additive protection, whereas nocodazole treatment prevents or delays endothelial cell only from late death. Other studies already showed that SIP protects cells from genotoxic agents (21, 23, 24, 44). However, none of these studies were able to discriminate protection due to inhibition of ceramide-mediated apoptosis from the one dependent on DNA damage radiosensitivity. Our extensive study on proliferating endothelial cell death after radiation represents the first study to exclude SIP radioprotection from the process involving interaction with DNA repair machinery or cell cycle modulation.

As recently pointed out (45), SIP metabolism has taken center stage in cancer development and treatment. High expression of sphingosine kinase 1, an enzyme transforming sphingosine to SIP, in tumor cell was correlated with low patient survival (46). Treatment of nude mice by sphingosine kinase 1 inhibitors reduced gastric and mammary adenocarcinoma tumor growth (47). Neutralizing by mAb, the pathophysiologic SIP secreted by cancer cells and platelets in the serum delayed the growth of the tumor by preventing angiogenesis (48). Thus, chronic secretion of SIP appears to play a major role in tumorigenesis by protecting tumor cells and by enhancing microvascularization induced by other key proangiogenic growth factors [vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor (bFGF); ref. 45]. These protumoral sides of SIP are counterbalanced by the fact that SIP radioprotection, at a therapeutic, single, relevant low dose, is specific on ceramide-dependent endothelial cell apoptosis. This offers a promising approach for pharmacologically improving the radioprotection of normal tissues. Indeed, adult normal tissue vasculature is quiescent (49) because of the equilibrium between angiogenic promoters and inhibitors (9). Because of this non-proliferative status of endothelial cells, DNA damage-induced mitotic death cannot be the main observable type of death, explaining why endothelial cells died exclusively by the acid sphingomyelinase/ceramide-mediated apoptosis: acid sphingomyelinase knockout mice have an endothelium resistant to ionizing radiation in brain, lung, and intestine tissues compared with wild-type mice or knockout mice for DNA damage-sensing factors, such as DNA-PK, ATM, or p53 (13, 16, 26). Like bFGF injection, SIP treatment should modulate ceramide in endothelial cells *in vivo* and protect normal tissues from radiation-induced toxicity. However, pathologic endothelial cells have the capacity to divide (9). This proliferating status opens the door to mitotic death, which SIP is not able to block. All of these important biological issues warrant more intensive future *in vivo* investigation. Mitotic death induced by radiotherapies and most of the chemotherapies are developed to target essentially cells with high proliferating

capacity. Our data prove that SIP radioprotection is only due to inhibition of acid sphingomyelinase/ceramide-mediated apoptosis. In this circumstance, SIP protection will not be ubiquitous: Therefore, selective protection by SIP of early apoptosis but not mitotic death may give the opportunity to define a selective radioprotector for normal tissues, in which quiescent endothelial cells represent the most sensitive target, but not tumor containing endothelial cells with high proliferating characteristics, which will be sensitive to mitotic death.

References

- Roninson IB, Broude EV, Chang BD. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* 2001;4:303-13.
- Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;33:781-96.
- Lock RB, Ross WE. Possible role for p34cdc2 kinase in etoposide-induced cell death of Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 1990;50:3767-71.
- Muller WU, Nusse M, Miller BM, Slavotinek A, Viaggi S, Streffer C. Micronuclei: a biological indicator of radiation damage. *Mutat Res* 1996;366:163-9.
- Cortez D, Guntuku S, Qin J, Elledge SJ. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* 2001;294:1713-6.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004;73:39-85.
- Hannun YA. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 1996;274:1855-9.
- Gulbins E, Li PL. Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290:R11-26.
- Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005;438:932-6.
- Hari D, Beckett MA, Sukhatme VP, et al. Angiostatin induces mitotic cell death of proliferating endothelial cells. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000;3:277-82.
- Khodarev NN, Kataoka Y, Murley JS, Weichselbaum RR, Grdina DJ. Interaction of amifostine and ionizing radiation on transcriptional patterns of apoptotic genes expressed in human microvascular endothelial cells (HMEC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;60:553-3.
- Haimovitz-Friedman A, Balaban N, McLoughlin M, et al. Protein kinase C mediates basic fibroblast growth factor protection of endothelial cells against radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 1994;54:2591-7.
- 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.
- Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, et al. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med* 1994;180:525-5.
- Santana P, Pena LA, Haimovitz-Friedman A, et al. Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* 1996;86:189-99.
- Pena LA, Fuks Z, Kolesnick RN. Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency. *Cancer Res* 2000;60:321-7.
- Li YQ, Chen P, Haimovitz-Friedman A, Reilly RM, Wong CS. Endothelial apoptosis initiates acute blood-brain barrier disruption after ionizing radiation. *Cancer Res* 2003;63:5950-6.
- Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 2003;300:1155-9.
- Hla T. Signaling and biological actions of sphingosine 1-phosphate. *Pharmacol Res* 2003;47:401-7.
- Olivera A, Rosenfeldt HM, Bektas M, et al. Sphingosine kinase type 1 induces G12/13-mediated stress fiber formation, yet promotes growth and survival independent of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 2003;278:46452-60.
- Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, et al. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 1996;381:800-3.
- Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, et al. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 1999;99:301-12.
- Morita Y, Perez GI, Paris F, et al. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med* 2000;6:1109-14.
- Paris F, Perez GI, Fuks Z, et al. Sphingosine 1-phosphate preserves fertility in irradiated female mice without propagating genomic damage in offspring. *Nat Med* 2002;8:901-2.
- Maj JG, Paris F, Haimovitz-Friedman A, Venkatraman E, Kolesnick R, Fuks Z. Microvascular function regulates intestinal crypt response to radiation. *Cancer Res* 2003;63:4338-41.
- Chang HJ, Maj JG, Paris F, et al. ATM regulates target switching to escalating doses of radiation in the intestines. *Nat Med* 2005;11:484-90.
- Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, et al. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 1992;99:683-90.
- Lawrence TS, Davis MA, Hough A, Rehemtulla A. The role of apoptosis in 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (gemcitabine)-mediated radiosensitization. *Clin Cancer Res* 2001;7:314-9.
- Zhang C, Ao Z, Seth A, Schlossman SF. A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells. *J Immunol* 1996;157:3980-7.
- Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with γ -H2AX antibody. *Radiat Res* 2002;158:486-92.
- Perry P, Wolff S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 1974;251:156-8.
- Liao WC, Haimovitz-Friedman A, Persaud RS, et al. Ataxia telangiectasia-mutated gene product inhibits DNA damage-induced apoptosis via ceramide synthase. *J Biol Chem* 1999;274:17908-17.
- Valerie K, Povirk LF. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 2003;22:5792-812.
- Ross GM. Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr Relat Cancer* 1999;6:41-4.
- Licht T, Tsurinikov L, Reuveni H, Yarnitzky T, Ben-Sasson SA. Induction of pro-angiogenic signaling by a synthetic peptide derived from the second intracellular loop of SIP3 (EDG3). *Blood* 2003;102:2099-107.
- 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 U S A* 2004;101:5553-8.
- Chang WP, Little JB. Delayed reproductive death in X-irradiated Chinese hamster ovary cells. *Int J Radiat Biol* 1991;60:483-96.
- Iwamoto K, Shinomiya N, Mochizuki H. Different cell cycle mechanisms between UV-induced and X-ray-induced apoptosis in WiDr colorectal carcinoma cells. *Apoptosis* 1999;4:59-66.
- Shinomiya N. New concepts in radiation-induced apoptosis: "premitotic apoptosis" and "postmitotic apoptosis". *J Cell Mol Med* 2001;5:240-53.
- Nubel T, Damrot J, Roos WP, Kaina B, Fritz G. Lovastatin protects human endothelial cells from killing by ionizing radiation without impairing induction and repair of DNA double-strand breaks. *Clin Cancer Res* 2006;12:933-9.
- Maceyka M, Payne SG, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002;1585:193-201.
- MacPhail SH, Banath JP, Yu TY, Chu EH, Lambur H, Olive PL. Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *Int J Radiat Biol* 2003;79:351-8.
- Dasika GK, Lin SC, Zhao S, Sung P, Tomkinson A, Lee EY. DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* 1999;18:7883-99.
- Otala M, Suomalainen L, Pentikainen MO, et al. Protection from radiation-induced male germ cell loss by sphingosine-1-phosphate. *Biol Reprod* 2004;70:759-67.
- Milstien S, Spiegel S. Targeting sphingosine-1-phosphate: a novel avenue for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2006;9:148-50.
- Van Brocklyn JR, Jackson CA, Pearl DK, Kotur MS, Snyder PJ, Prior TW. Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:695-705.
- French KJ, Schreckengost RS, Lee BD, et al. Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res* 2003;63:5962-9.
- Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, et al. Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell* 2006;9:225-38.
- Hobson B, Denekamp J. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer* 1984;49:405-13.

Acknowledgments

Received 7/28/2006; revised 10/13/2006; accepted 12/10/2006.

Grant support: Commission of the European Communities, Association Contract F16R-CT-2003-508842 RISC-RAD, and ACI «jeunes chercheuses-jeunes chercheurs». S. Bonnaud's Ph.D. fellowship was assumed by Association pour la Recherche sur le Cancer and a grant of Region Pays de la Loire and CEA.

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

We thank Dr. I. Corre for critical review of the manuscript.

RADIATION RESEARCH 167, 000–000 (2007)
 0033-7587/06 \$15.00
 © 2007 by Radiation Research Society.
 All rights of reproduction in any form reserved.

Intestinal Epithelial Cell Dysfunction is Mediated by an Endothelial-Specific Radiation-Induced Bystander Effect

Marie-Hélène Gaugler,^{a,b,1} Michel Neunlist,^c Stéphanie Bonnaud,^b Philippe Aubert,^c Marc Benderitter^a and François Paris^b

^a IRSN, DRPH, SRBE, LRPAT, Fontenay-aux-Roses, F-92260 France; ^b Inserm, U601, Nantes, F-44000 France; and ^c Inserm, U539, Nantes, F-44000 France

Gaugler, M. H., Neunlist, M., Bonnaud, S., Aubert, P., Benderitter, M. and Paris, F. Intestinal Epithelial Cell Dysfunction is Mediated by an Endothelial-Specific Radiation-Induced Bystander Effect. *Radiat. Res.* 167, 000–000 (2007).

The response of endothelial cells (EC) to high radiation doses leads to damage of normal tissue or tumor. The precise mechanisms of the endothelial-tissue linkage are still largely unknown. We investigated the possible involvement of a bystander effect, secondary to endothelial damage, in tissue response to radiation. Proliferating human intestinal epithelial T84 cells were grown in a non-contact co-culture with confluent primary human microvascular EC (HMVEC-L). The bystander response in unirradiated T84 cells co-cultured with irradiated EC was studied by evaluating cell growth, cell death and epithelial morphology. Twenty-four hours after exposure of EC to 15 Gy, unirradiated T84 cells showed a decreased cell number (29%) and percentage in mitosis (66%) as well as increased apoptosis (1.5-fold) and cell surface area (1.5-fold), highlighting the involvement of bystander effects on T84 cells after irradiation of EC. Furthermore, the responses of T84 cells were amplified when EC and T84 cells were irradiated together, indicating that the bystander response in T84 cells adds further to direct radiation damage. As opposed to direct irradiation, the T84 cell bystander response did not involve the cell cycle-related protein p21^{Waf1} (CDKN1A) and pro-apoptosis protein BAX. The bystander effect was specific to EC since the irradiation of human colon fibroblasts did not induce bystander responses in unirradiated T84 cells. These results strengthen previous *in vivo* evidence of the role of EC in tissue damage by radiation. In addition, this study provides a suitable and useful model to identify soluble factors involved in bystander effects secondary to endothelial damage. Modulating such factors may have important clinical implications.

© 2007 by Radiation Research Society

INTRODUCTION

Over the past few years there has been an escalating renewed interest in radiation endotheliology. Studies with intestinal and lung models have highlighted the relevance

¹ Address for correspondence: Inserm U601, Institut de Biologie, 9 quai Moncoussu, 44093 Nantes Cedex 01, France; e-mail: marie-helene.gaugler@nantes.inserm.fr.

of the microvascular endothelial response to the induction of tissue damage by high radiation doses (1, 2). Furthermore, microvascular damage has been implicated in the regulation of tumor cell response to high doses of radiation (3). Although the precise mechanism of the endothelial-normal tissue or -tumor linkage is still unknown, it may involve leakage of a circulating factor, a bystander effect secondary to endothelial damage, or transient local ischemia/reperfusion produced by the acute microvascular dysfunction and its rapid reversal (4). Understanding the mechanism by which microvascular damage regulates normal and tumor tissue responses to radiation may have important clinical implications since it presents the opportunity to modulate the efficacy of radiotherapy. Recently, the clinical use of high radiation doses has increased with the recent refinements in precise, image-guided radiation treatment technology. As an example, stereotactic body radiation therapy involves delivering high doses of radiation (10–20 Gy) per fraction in an abbreviated, hypofractionated regimen (5, 6). Even if this new approach maximally avoids surrounding normal tissues, the potential deleterious effects of such high doses to normal tissues close to a tumor cannot be excluded (4, 7). We chose the intestine as a model because the radiobiological response of the murine small intestine has been well described (2, 8). We explored the possibility that irradiated endothelial cells (EC) released soluble factors within the culture medium, leading to epithelial cell dysfunction. This hypothesis was supported by previous observations that (1) endothelial cell apoptosis is the primary lesion initiating the pathogenesis of damage to tissues such as lungs, intestines and brain (1, 2, 9, 10); (2) *in vitro* activation of EC induces changes in epithelial function (11); (3) impairment of endothelial function after radiation exposure involves, in part, increased production of soluble factors (12–14); and (4) soluble factors released from irradiated cells mediate some parts of the radiation-induced bystander effect (15). However, much of the experimental evidence has been obtained using epithelial cells or fibroblasts at low radiation doses (16–18). No study has examined radiation-induced bystander effects as a consequence of exposure of EC to a high radiation dose.

In mucosal tissue, such as the intestine, EC in the lamina propria are anatomically positioned close to but physically

GAUGLER ET AL.

separated from epithelial cells (19), thus providing the potential for paracrine cell-cell crosstalk. To model *in vitro* the endothelial-epithelial interaction observed in intestinal physiology, EC have to be positioned close to but not in contact with the epithelial basolateral membrane.

Therefore, in the present study, we used a Transwell® insert culture dish to co-culture epithelial cells of the human intestinal crypt cell line T84 that were not in contact with EC. The hanging design of the insert keeps the Transwell® porous membrane about 1 mm off the bottom of the well, preventing the endothelial cell monolayer at the bottom of the well from being in contact with T84 cells on the membrane of the Transwell® insert. Because the pathogenesis of the gastrointestinal syndrome is associated with crypt clonogens with intense proliferative activity (20), proliferating T84 cells were used. We examined whether irradiation of EC induced bystander responses in unirradiated T84 cells using cell growth, cell death and morphological criteria as end points. Cells were co-cultured for 24 h since intestinal damage related to radiation-induced EC injury was observed in a previous study within 24 h after radiation exposure (2). Because changes in the expression of genes important for both cell cycle arrest, such as p21^{Waf1} (also called Cip1 or *CDKN1A*) (21), cyclin E (22), Cdc25C (23) and cyclin A2 (24), and cell death, i.e., *BAX* (25) and survivin (26), have been described as cellular responses to DNA-damaging insults such as ionizing radiation, we tested whether the bystander responses of T84 cells involved the same or different molecular mechanisms. Finally, to assess the specificity of the endothelial-mediated bystander effect, non-contact co-culturing was also performed with human colon fibroblasts, since these cells are among the numerous subepithelial cell types present in the mucosa of the intestine.

METHODS AND MATERIALS

Cell Cultures

Primary human lung microvascular EC (HMVEC-L) were obtained from Clonetics (Cambrex, France). HMVEC-L were seeded at 1×10^4 cells/cm² in 12-well culture plates and allowed to reach confluence at 37°C in 95% air/5% CO₂ in the supplier's endothelial cell growth culture medium (EGM-2-MV), referred to here as EC medium. Confluent EC cultures contained $1.1 \times 10^5 \pm 0.05$ cells.

Normal human colon fibroblasts (CCD-18Co) (ATCC, Manassas, VA) were seeded at 1×10^4 cells/cm² in 12-well culture plates and cultured in MEM (Gibco, France) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino-acid (Gibco), 50 IU/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin until they reached confluence. The number of confluent fibroblasts was $1.2 \times 10^5 \pm 0.1$.

Cells of the human colon epithelial cell line T84 (ECACC) were seeded onto the porous membrane of a Transwell® insert (12-well Transwell®-Clear, 0.4 µm pore size, Corning, Netherlands) at 1×10^5 cells/cm² and grown in DMEM:F12 (1:1, Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 50 IU/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin at 37°C in 95% air/5% CO₂ for 2 days prior to the experiment.

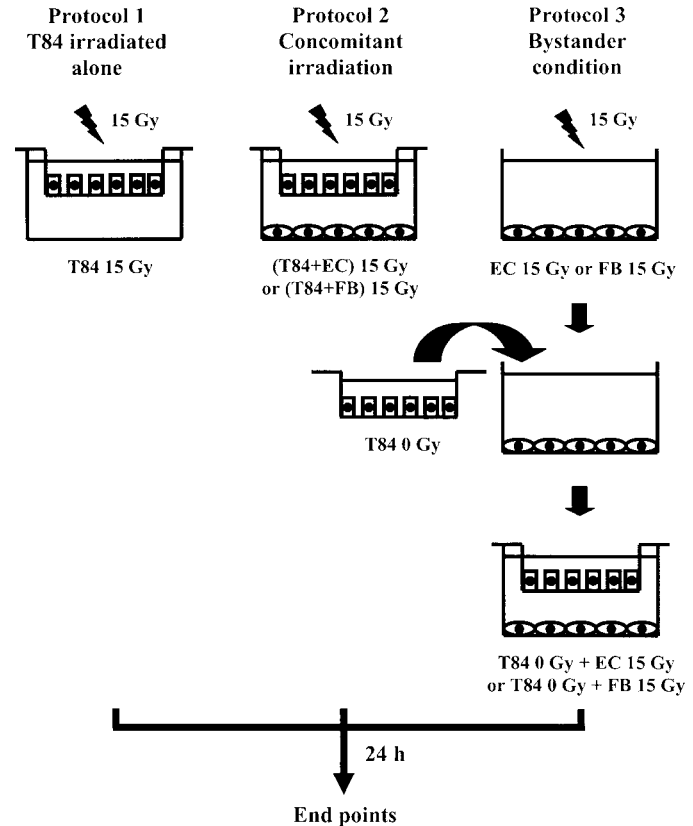


FIG. 1. Experimental protocols. In protocol 1, proliferating T84 cells were irradiated in the absence of confluent EC or fibroblasts. In protocol 2, both proliferating T84 cells and confluent EC or fibroblasts were irradiated together. In protocol 3, immediately after irradiation of confluent EC or fibroblasts, the Transwell® inserts containing unirradiated proliferating bystander T84 cells were transferred into the wells containing irradiated EC or fibroblasts.

Irradiation Protocol

Immediately prior to irradiation, the culture medium of Transwell® inserts was replaced with 0.5 and 1.5 ml of EC medium, respectively, in the upper and lower compartments. Cells were irradiated with a single 15-Gy dose of 6 MV X rays delivered at a rate of 2 Gy/min using a General Electric Medical System megavoltage linear accelerator. The source-to-culture plate distance was 115 cm including a 15-cm phantom for the electronic balance, and the field size was 40 × 40 cm. Sham-irradiated cells were removed from the incubator and handled under the same conditions as the irradiated cells except for the irradiation.

Co-culture Model

Three protocols were established (Fig. 1). In protocol 1, just before irradiation, the Transwell® inserts with proliferating T84 cells were transferred into the 12-well plates containing only EC medium (T84 15 or 0 Gy). In protocol 2, just before irradiation, the Transwell® inserts with proliferating T84 cells were transferred into the 12-well plates containing confluent EC or fibroblasts. Thus both T84 cells and EC or fibroblasts were irradiated together. These conditions are referred to as (T84 + EC) 15 or 0 Gy and (T84 + fibroblasts) 15 or 0 Gy. In protocol 3, just after irradiation of confluent EC or fibroblasts, the Transwell® inserts with unirradiated proliferating bystander T84 cells were transferred into the 12-well plates containing irradiated EC or fibroblasts. These conditions are referred to as T84 0 Gy + EC 15 Gy and T84 0 Gy + fibroblasts 15 Gy. All co-cultures were further incubated for 24 h at 37°C in 95% air/5% CO₂.

IRRADIATED ENDOTHELIAL CELLS INDUCE EPITHELIAL BYSTANDER RESPONSE

Epithelial Cell Growth and Death

Epithelial cell numbers. Twenty-four hours after exposure, T84 cells were washed twice with PBS and trypsinized. Cells were counted using Malassez slides to determine the number of cells. All data points were determined from triplicate experiments.

Detection of mitosis. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 (pH3) was used as a marker for mitosis (27). T84 cells on a Transwell® membrane were washed in PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS (1 h, room temperature), and permeabilized with PBS/4% horse serum/0.5% Triton X-100 (PBS+) (30 min, room temperature). T84 cells were incubated with primary Ab to pH3 (1:100; Santa Cruz Biotechnology) diluted in PBS+ (1 h, room temperature), washed and probed with Cy3 (1:500; Beckman Coulter, France)-conjugated secondary Ab diluted in PBS+ (30 min, room temperature). Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich, France). The Transwell® membrane with the fixed and stained T84 cells was removed from the Transwell® insert by carefully cutting around the membrane edges with a scalpel, placed on a glass slide, and mounted with glycerol and a cover glass. Fluorescence images were recorded using an Olympus IX 50 fluorescence microscope connected to a digital camera (Olympus DP50). pH3-positive cells and DAPI-stained nuclei (30–200 per field of view) were counted in at least 10 randomly chosen fields per experiment to determine the proportion of T84 cells in mitosis.

Detection of apoptosis. T84 cell apoptosis was quantified by using a Cell Death Detection ELISA^{plus} kit (Roche Diagnostics, France). This immunoassay specifically detects histone-associated DNA fragments (mono- and oligonucleosomes) released in the cytoplasm during apoptosis. Twenty-four hours after radiation exposure, T84 cells were washed with PBS, trypsinized and centrifuged, and the pellet was incubated in the supplier's lysate buffer. Apoptosis was measured in the cell lysate. All data points were determined from triplicate experiments.

Epithelial Cell Morphology

Twenty-four hours after exposure, T84 cells were fixed using paraformaldehyde and processed for immunohistochemistry as described above for the detection of pH3. The primary Ab used was a mouse Ab against zonula-occludens (ZO)-1, a peripheral membrane protein of the tight-junctions (1:500; Zymed). Cy3-conjugated secondary Ab was used at 1:500. In addition, T84 cells were co-stained with DAPI. Fluorescence images were recorded using an Olympus IX 50 fluorescence microscope connected to a digital camera (Olympus DP50). Staining revealed ZO-1 expression in the apical membrane of T84 cells and was used as a marker of the cell perimeter. For each T84 cell visualized on the fluorescence images, the perimeter was delimited manually offline using the DP-Soft image analysis software (Olympus) in at least 10 fields per experiment chosen randomly. The apical cell surface area was then quantified automatically by the DP-Soft image analysis software.

RT-PCR

Total RNA from T84 was extracted with RNABle® (Eurobio, France) and reverse transcribed using M-MLV Reverse Transcriptase (Gibco). The primer sequences, designed by the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program from NCBI, were as follows: BAX (forward, 5'-AGGATGCGTCCACCAAGAAG-3'; reverse, 5'-ATCATCTCTGCAGCTCCATGT-3'), survivin (forward, 5'-ACGACCCCATAGAGGAA CATAAAA-3'; reverse, 5'-GGGTAAATCTTCAAACCTGCTTCT TG-3'), Cdc25C (forward, 5'-CCAACAGGCTACCAACTTGTAT CC-3'; reverse, 5'-AGGACTCTGCCACCAGCTTTC-3'), p21^{Waf1} (forward, 5'-ACACCTTCCAGCTCCTGTAACATACT-3'; reverse, 5'-GAA ACGGGAACCAGGACACAT-3'), cyclin E (forward, 5'-GCAGAGCT GTTGGATCTCTGTGT-3'; reverse, 5'-GGCCGAAGCAGCAAGTATA CC-3'), cyclin A2 (forward, 5'-TGGACCCAGAAAACCATTTGG-3'; reverse, 5'-ACATGTCCATAGTATGTGGTGACTCAA-3'), GAPD (forward, 5'-GGAGTCAACGGATTTGGTCGTA-3'; reverse, 5'-GGCAAC AATATCCACTTTACCAGAGT-3'). PCRs were run in triplicate on an

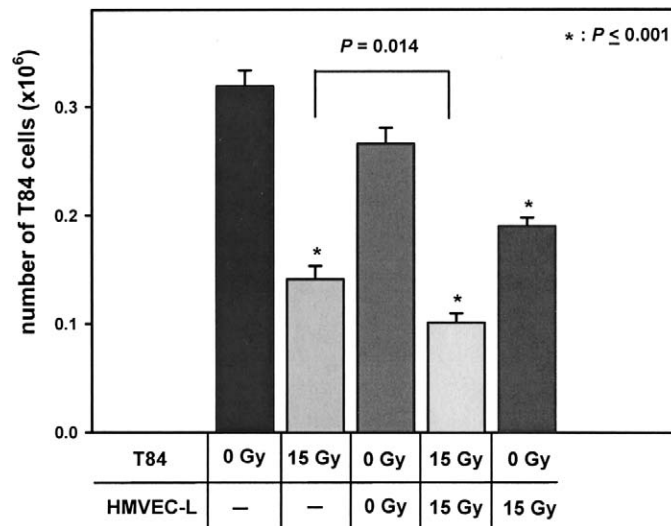


FIG. 2. Effect of irradiation of EC and/or T84 cells on the number of T84 cells 24 h after exposure. Histograms represent means ± SEM of five separate experiments performed in triplicate. **P* ≤ 0.001 compared with unirradiated T84 cells or co-cultures.

ABI Prism® 7000 sequence detection system (Applied Biosystems, France) with SYBR Green® according to the manufacturer's guidelines in a final volume of 20 µl containing samples of cDNA equivalent to 15.6 ng of total RNA and 500 nM of each primer. The specificity of amplification was checked using the standard melting dissociation curve method. The number of cycles at which the fluorescent signal crossed a threshold in the exponential phase of the PCR is defined as the cycle threshold (Ct) and is correlated to the initial amount of template cDNA in the sample. The relative quantification of mRNA was determined by the comparative Ct method (ΔΔCt) using GAPD as the reference gene. The relative amount of the target mRNA was determined in irradiated T84 cells in comparison to unirradiated T84 cells and was obtained by the following formula: 2^{-(ΔCt_{irrad}-[ΔCt_{non-irrad}])}, where ΔCt is the difference between Ct target mRNA and Ct GAPD.

Quantification of Cytokine Production

Quantitative determinations of IL8 and IL6 in the cell supernatants harvested from the lower compartment of the Transwell® inserts were performed 24 h after exposure using a sandwich ELISA according to the manufacturer's recommendations (R & D Systems, UK).

Statistical Analysis

All values are means ± SEM. The data were analyzed using the Student's *t* test or the Mann-Whitney rank-sum test (SigmaStat software, Jandel Scientific). Significance level was set at *P* < 0.05.

RESULTS

Irradiated EC Induced a Decrease in Bystander T84 Cell Number

To examine whether changes in epithelial cell growth could be observed in the different co-culture conditions, we determined the numbers of T84 cells. Figure 2 shows that, 24 h after exposure, irradiation of EC induced a significant 29% decrease in bystander T84 cell numbers (T84 0 Gy + EC 15 Gy) compared to the control co-culture [(T84 + EC) 0 Gy]. In directly irradiated T84 cells, a significant decrease

GAUGLER ET AL.

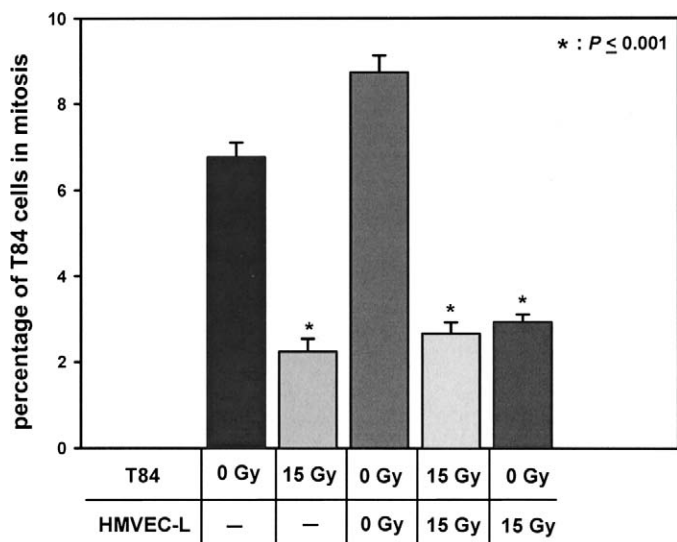


FIG. 3. Effect of irradiation of EC and/or T84 cells on T84 cell mitosis 24 h after exposure. Histograms represent the means \pm SEM of phosphorylated histone H3-positive T84 cells relative to the total number of T84 cells. Between 3200 and 7800 DAPI-stained nuclei were counted in 40–70 fields chosen randomly in two or three separate experiments. * $P \leq 0.001$ compared with unirradiated T84 cells or co-cultures.

was also observed after exposure (56%, T84 15 Gy compared to T84 0 Gy) that was significantly more pronounced in the presence of irradiated EC [62%, (T84 + EC) 15 Gy compared to (T84 + EC) 0 Gy].

Irradiated EC Decreased Mitosis in Bystander T84 Cells

To examine whether changes in the cell cycle could be involved in the decreased number of T84 cells, we measured the T84 cell mitosis ratio and the mRNA expression of cell cycle-related proteins in the different co-culture conditions. Figure 3 shows a 66–70% decrease in mitosis in bystander T84 cells and in directly irradiated T84 cells 24 h after exposure. Furthermore, an up-regulation of the expression of mRNA for p21^{Waf1} and cyclin E, which stabilizes p21^{Waf1} (28), was observed in directly irradiated T84 cells but not in bystander T84 cells 24 h after exposure (Table 1). No change in the level of mRNA for the cell cycle proteins cyclin A2 and Cdc25C was observed under any of the co-culture conditions (data not shown).

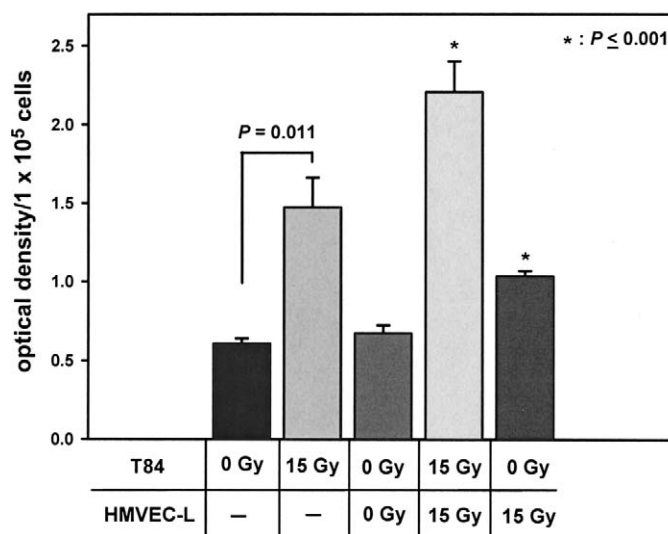


FIG. 4. Effect of irradiation of EC and/or T84 cells on the induction of T84 cell apoptosis quantified with a Cell Death Detection ELISA^{plus} kit 24 h after exposure. Histograms represent the means \pm SEM for two separate experiments performed in triplicate. * $P \leq 0.001$ compared with unirradiated T84 cells or co-cultures.

Irradiated EC Induced Apoptosis in Bystander T84 Cells

We measured the apoptosis ratio in T84 cells in the different co-culture conditions. As shown in Fig. 4, irradiation of EC induced a 1.5-fold increase in apoptosis in bystander T84 cells 24 h after exposure [T84 0 Gy + EC 15 Gy compared to (T84 + EC) 0 Gy]. This augmented apoptosis was more marked when T84 cells were directly irradiated (2.4-fold, T84 15 Gy compared to T84 0 Gy). A maximum increase [3.3-fold, (T84 + EC) 15 Gy compared to (T84 + EC) 0 Gy] was observed when T84 cells and EC were irradiated at the same time. Apoptosis involved an up-regulation of the pro-apoptosis BAX mRNA level in directly irradiated T84 cells but not in bystander T84 cells (Table 1). A down-regulation of survivin, an inhibitor of apoptosis, was observed at the mRNA level in T84 cells irradiated in the presence of EC but not in bystander T84 cells (Table 1).

Irradiated EC Increased the Surface Area of Bystander T84 Cells

Figure 5A and B shows the apical membrane of T84 cells either irradiated (Fig. 5B) or not (Fig. 5A) after staining

TABLE 1
Effect of Irradiation of EC and/or T84 Cells on mRNA Expression for Cell Cycle- or Cell-Death Related Proteins in T84 Cells 24 h after Exposure

Co-culture	Relative expression level			
	p21 ^{Waf1}	Cyclin E	BAX	Survivin
T84 15 Gy	1.4 \pm 0.1*	1.6 \pm 0.2*	1.6 \pm 0.2*	1.1 \pm 0.1
(T84 + EC) 15 Gy	1.6 \pm 0.1*	1.5 \pm 0.5	1.7 \pm 0.2*	0.8 \pm 0.1*
T84 0 Gy + EC 15 Gy	0.9 \pm 0.1	0.9 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2	1 \pm 0.1

Notes. Levels were normalized first to GAPD mRNA levels, then to mRNA levels in the unirradiated T84 cells or co-cultures. Values are means \pm SEM, $n = 4-5$. * $P < 0.05$ compared with unirradiated T84 cells or co-cultures.

IRRADIATED ENDOTHELIAL CELLS INDUCE EPITHELIAL BYSTANDER RESPONSE

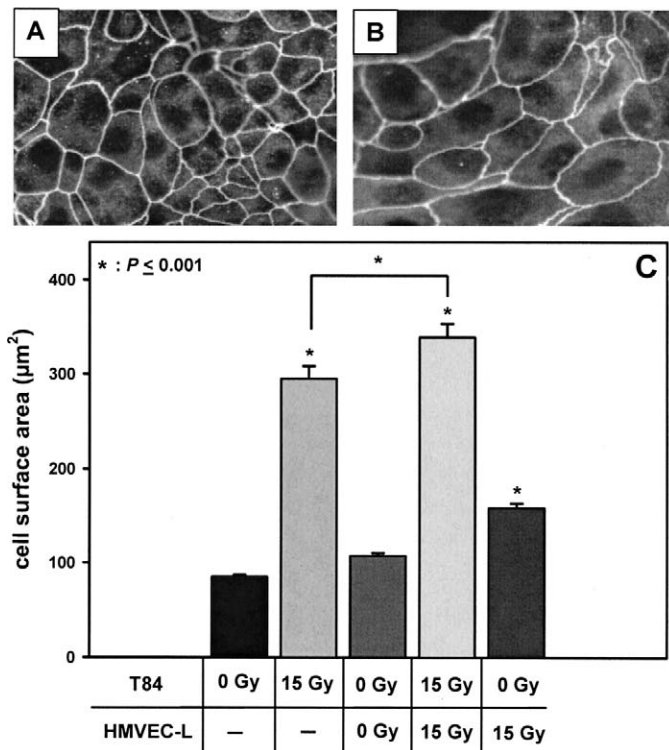


FIG. 5. Effect of irradiation of EC and/or T84 cells on T84 cell surface area. Fluorescence images of the T84 cell membrane in the different coculture conditions 24 h after exposure, after labeling with an Ab directed against ZO-1. Panel A: (T84 + EC) 0 Gy; panel B: (T84 + EC) 15 Gy; original magnification 200 \times . Panel C: Histograms represent the means \pm SEM of the cell surface areas from 500–1000 T84 cells in four separate experiments.

with an Ab against ZO-1, a peripheral membrane protein of the tight junctions. The apical surface area of T84 cells was determined as described in the Methods and Materials by using ZO-1 labeling as a marker of the apical cell perimeter. Twenty-four hours after irradiation of EC, a 1.5-fold increase in the surface area of bystander T84 cells was observed [T84 0 Gy + EC 15 Gy compared to (T84 + EC) 0 Gy] (Fig. 5C). In directly irradiated T84 cells, this augmented cell surface area was more pronounced, increasing 3.5-fold for both T84 15 Gy and (T84 + EC) 15 Gy compared to T84 0 Gy and (T84 + EC) 0 Gy, respectively (Fig. 5A–C). Irradiation of T84 cells in the presence of EC resulted in a significant additional increased surface area of T84 cells compared to T84 cells irradiated in the absence of EC (Fig. 5C).

Increased Production of IL8 and IL6 after Irradiation of EC

Figure 6A and B shows an increased production of IL8 and IL6 in both coculture conditions in which EC were irradiated [(T84 + EC) 15 Gy, T84 0 Gy + EC 15 Gy] compared with the control coculture [(T84 + EC) 0 Gy]. T84 cells produced low amounts of IL8 and IL6; the production did not change after irradiation of the T84 cells.

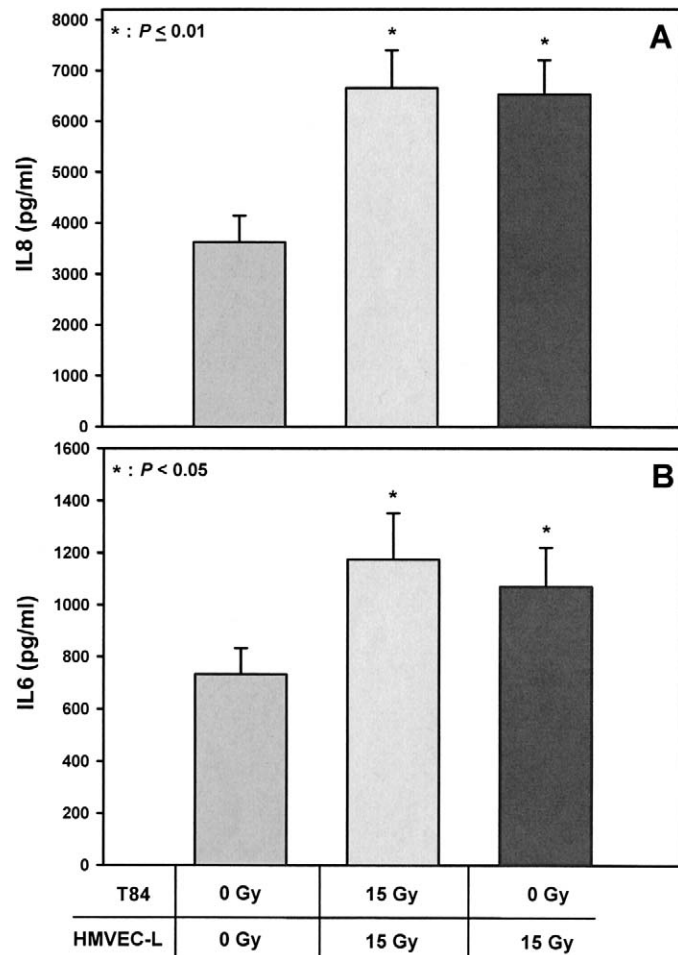


FIG. 6. Effect of irradiation of EC and/or T84 cells on IL8 (panel A) and IL6 (panel B) concentrations in the cell supernatants harvested from the lower compartment of the Transwell® inserts 24 h after exposure. Histograms represent the means \pm SEM of three to five separate experiments performed in triplicate. Statistical significance was determined by comparing the irradiated [(T84 + EC) 15 Gy] or bystander (T84 0 Gy + EC 15 Gy) cocultures to the unirradiated cocultures [(T84 + EC) 0 Gy].

Only 53 ± 3 pg/ml and 49 ± 2 pg/ml of IL8 were produced by unirradiated (T84 0 Gy) and irradiated T84 cells (T84 15 Gy), respectively. The concentrations of IL6 were 3.3 ± 0.1 pg/ml and 3.2 ± 0.1 pg/ml for unirradiated and irradiated T84 cells, respectively.

Effect of Irradiated Intestinal Fibroblasts on T84 Cell Numbers and Apoptosis

To determine whether the effect of irradiated EC on bystander T84 cells was specific, we investigated the role of irradiated fibroblasts, another major constituent of the intestinal mucosa, on T84 cells. As opposed to EC, irradiation of fibroblasts did not modify the number of bystander T84 cells (Fig. 7A) or percentage of apoptotic cells (Fig. 7B) compared to control cocultures [(T84 + fibroblasts) 0 Gy]. However, in directly irradiated T84 cells, a 51% and 55% decrease in cell numbers was observed [T84 15 Gy com-

GAUGLER ET AL.

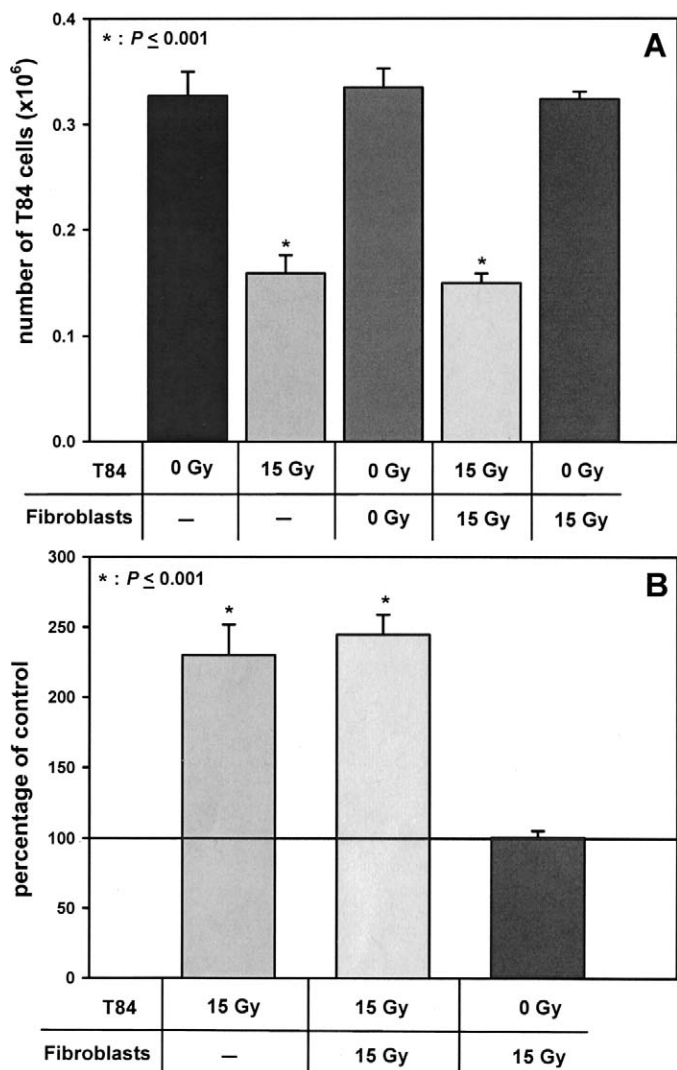


FIG. 7. Effect of irradiation of fibroblasts and/or T84 cells on the number of T84 cells (panel A) and T84 cell apoptosis (panel B) 24 h after exposure. Histograms represent the means \pm SEM from two separate experiments performed in triplicate. $*P \leq 0.001$ compared with unirradiated T84 cells or co-cultures.

pared to T84 0 Gy and (T84 + fibroblasts) 15 Gy compared to (T84 + fibroblasts) 0 Gy, respectively] (Fig. 7A), which correlated with 2.3- and 2.5-fold increases in apoptosis of T84 cells (Fig. 7B).

DISCUSSION

It is well established that soluble factors released from irradiated cells mediate some of the radiation-induced bystander effect (29–31). Much of the experimental evidence has been obtained using epithelial cells or fibroblasts at low radiation doses (29, 32–34). However, there are no data concerning radiation-induced bystander effects as a consequence of exposure of EC to high radiation doses. It is worthwhile to address this question because the role of EC in tissue damage after high radiation doses has been shown

(2, 3) and because with the recent refinements in precise, image-guided radiation treatment technology, clinical use of high radiation doses has increased.

Both co-culture and medium transfer experiments have been used to investigate the signal transmitted between irradiated and bystander cells by medium-borne factors. However, the co-culture system described in the present study was more appropriate than medium transfer experiments to model the interactions between endothelial and epithelial cells in the intestine. In fact, both cell types are present in this tissue in proximity but are not in contact through intercellular junctions. In the co-culture system, directly irradiated endothelial cells and the bystander T84 cells are two distinct populations separated by 1 mm on average and a porous membrane, but both cell types are present as in the situation *in vivo*. In contrast, in medium transfer experiments, bystander cells are incubated with the medium from irradiated cells, but these cells are not present during this incubation, unlike the situation *in vivo*. The relevance of using the co-culture system in the context of radiation-induced bystander effects to model normal tissue response to radiation has also been shown in the recent study of Hill *et al.* (35). Here we provide the first evidence that irradiation of EC at a high dose induced a bystander response of intestinal epithelial cells using cell growth, cell death and morphological criteria as end points. Furthermore, except for the results for mitosis, the intestinal epithelial cell response was amplified when EC and T84 cells were irradiated together, indicating that the bystander response of T84 cells adds to the direct radiation damage. These results strengthen previous *in vivo* evidence showing the essential role of irradiated EC in the initiation of the pathogenesis of intestinal damage to radiation, i.e., epithelial cell lethality (2), and an *in vitro* study showing the induction of tumor cell apoptosis by radiation-induced nitric oxide production in EC (36).

We also showed that this radiation-induced bystander effect is endothelial cell-specific since it was not observed with irradiated fibroblasts. Contradictory results concerning induction of a bystander effect by irradiated fibroblasts have been reported in the literature (29, 37–39). These discrepancies might be explained by differences in doses and nature of the source of irradiation, and methods of culture used, namely bystander cells co-cultured with irradiated fibroblasts or cultured with a conditioned medium from irradiated fibroblasts (29, 37–39). Therefore, no clear conclusion can be drawn from these studies. However, we also showed that irradiation of fibroblasts did not increase the deleterious effects on irradiated T84 cells, confirming that irradiated fibroblasts could not trigger a paracrine signal to epithelial cells. Previous studies using co-culture systems have shown that, in response to inflammatory conditions, EC and fibroblasts, neutrophils or eosinophils contribute to the epithelial dysfunction of T84 cells through paracrine mechanisms (11, 40–42). Thus our results underlined that the particular role of irradiated EC in the induction of ep-

IRRADIATED ENDOTHELIAL CELLS INDUCE EPITHELIAL BYSTANDER RESPONSE

ithelial damage via paracrine pathways, unlike irradiated fibroblasts, may be a cell type-specific response to radiation.

Besides epithelial cell lethality, clonogenic crypt epithelial cell dysfunction constitutes a critical element in the pathogenesis of gastrointestinal damage (43). In models of intestinal inflammatory pathologies, functional alterations in epithelial integrity are associated with morphological changes such as changes in cell size (44–46). In this study, T84 cell morphology, assessed by quantification of T84 cell surface area, was used to evaluate epithelial dysfunction. Our data clearly showed that, concomitant to cell depletion, irradiation of EC induced dysfunction of T84 cells as shown by an increase in cell surface area. Therefore, radiation-induced damage of EC may be implicated not only in epithelial cell death but also in epithelial dysfunction. Such alterations in cell morphology, i.e., epithelial cell hypertrophy after radiation exposure, have been observed in the intestinal epithelium (47–49), with concomitant functional alterations of epithelial barrier properties, i.e., increased intestinal permeability in rats (49).

Both endothelial cell death and activation after radiation exposure could occur in our co-culture model, as shown previously (12, 13, 50). A 38% decrease in endothelial cell numbers was observed ($1.1 \times 10^5 \pm 0.1$ unirradiated EC compared to $0.67 \times 10^5 \pm 0.04$ irradiated EC). Furthermore, a 1.5–1.8-fold increase in production of cytokines (IL8, IL6), illustrating the radiation-induced activation of surviving irradiated EC, was obtained. Thus medium-borne factors in our co-culture model were the result of both EC death and activation. Cytotoxic factors released from dead EC could affect T84 cell survival, whereas soluble factors such as inflammatory cytokines produced by radiation-induced activated EC could alter T84 cell dysfunction.

Our co-culture model showed an increased apoptosis in bystander T84 cells that was independent of BAX. Furthermore, T84 cell apoptosis resulting from a direct effect of radiation in the presence or absence of EC was dependent on BAX. These results underline the differences in the molecular pathways to apoptosis elicited in T84 cells by bystander or direct responses to radiation. Recently, after high-dose exposure *in vivo*, radiation-induced apoptosis in intestinal epithelial cells was described as being dependent on BAX for cells located in the base of the crypts (51–53). However, in *Bax*^{-/-} mice, radiation-induced apoptosis was still observed in intestinal epithelial cells (52), implying a BAX-independent signaling pathway. In light of our results, one could propose that the radiation-induced apoptosis observed in intestinal epithelial cells of *Bax*^{-/-} mice may be due to a BAX-independent bystander effect consequent to the radiation injury of the endothelial compartment.

In agreement with other studies showing increased p21^{Waf1} and cyclin E expression in mouse intestinal epithelium after high-dose irradiation (22, 54), the cell cycle arrest response resulting from radiation-induced direct damage of T84 cells involved the up-regulation of p21^{Waf1} and

cyclin E. However, p21^{Waf1} and cyclin E were not implicated in growth arrest of bystander T84 cells after radiation damage to EC. These results underline differences in cell cycle arrest molecular pathways elicited in T84 cells by bystander or direct responses to radiation. However, they are in contrast with the results of Azzam *et al.* (15) and Yang *et al.* (39) showing an enhanced p21^{Waf1} expression in bystander cells. A difference in the type of bystander cells, i.e., endothelial cells compared to fibroblasts (15, 39), may explain this discrepancy. Another possible explanation is that the experimental systems used are different (15). Azzam *et al.* investigated the participation of contact effects, i.e., gap junction-mediated intercellular communication, in the transmission of radiation-induced bystander effects, whereas in the present study, the participation of medium-borne factors was examined. The absence of an induction of p21^{Waf1} in bystander T84 cells might be explained by the lack of contact effects with irradiated endothelial cells, unlike the up-regulation of p21^{Waf1} in bystander fibroblasts that communicate with irradiated fibroblasts through gap junctions (15). Finally, differences in the nature of the source and dose of radiation may also explain this discrepancy (15). Our results suggest that the deleterious endothelial signal initiating intestinal radiation damage is not dependent on the expression of p21^{Waf1} in intestinal epithelial cells. Thus this may explain why p21^{Waf1}-null mice exposed to high radiation doses died from the gastrointestinal syndrome even in the absence of p21^{Waf1} (55).

In conclusion, the co-culture model described here provided a suitable and useful model to identify endothelial signaling factors mediating the bystander response of normal or tumor cells. In addition, the data presented in this study suggest that endothelial-intestinal tissue or tumor linkage after *in vivo* radiation exposure may involve an endothelial radiation-induced bystander effect. Thus modulating bystander signaling should be of interest in therapy since reducing bystander signaling would decrease radiation damage and potential carcinogenesis in normal tissues, whereas amplifying bystander responses in tumors would maximize tumor cell killing during radiotherapy.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to P. Gourmelon and P. Voisin for their support, I. Corre, P. Costet, A. L. Jarnoux, C. Bou-Hanna, B. Lardeux, C. Niaudet and M. Chérel for helpful discussions and technical assistance, and Pr. M. Mahé, A. Granier and A. Lisbonna for irradiation facilities. This work was partly funded by Electricité de France (EDF) and Action Concertée Incitative (ACI) “Jeune Chercheuse-Jeune Chercheur”.

Received: June 1, 2006; accepted: September 22, 2006

REFERENCES

1. Z. Fuks, A. Alfieri, A. Haimovitz-Friedman, A. Seddon and C. Cordon-Cardo, Intravenous basic fibroblast growth factor protects the lung but not mediastinal organs against radiation-induced apoptosis *in vivo*. *Cancer J. Sci. Am.* **1**, 62 (1995).

GAUGLER ET AL.

2. F. Paris, Z. Fuks, A. Kang, P. Capodiecici, G. Juan, D. Ehleiter, A. Haimovitz-Friedman, C. Cordon-Cardo and R. Kolesnick, Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* **293**, 293–297 (2001).
3. M. Garcia-Barros, F. Paris, C. Cordon-Cardo, D. Lyden, S. Rafii, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks and R. Kolesnick, Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* **300**, 1155–1159 (2003).
4. Z. Fuks and R. Kolesnick, Engaging the vascular component of the tumor response. *Cancer Cell* **8**, 89–91 (2005).
5. Y. Nagata, K. Takayama, Y. Matsuo, Y. Norihisa, T. Mizowaki, T. Sakamoto, M. Sakamoto, M. Mitsumori, K. Shibuya and M. Hiraoka, Clinical outcomes of a phase I/II study of 48 Gy of stereotactic body radiotherapy in 4 fractions for primary lung cancer using a stereotactic body frame. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **63**, 1427–1431 (2005).
6. R. D. Timmerman and B. D. Kavanagh, Stereotactic body radiation therapy. *Curr. Prob. Cancer* **29**, 120–157 (2005).
7. R. Weichselbaum, Radiation's outer limits. *Nat. Med.* **11**, 477–478 (2005).
8. C. S. Potten, A comprehensive study of the radiobiological response of the murine (BDF1) small intestine. *Int. J. Radiat. Biol.* **58**, 925–973 (1990).
9. P. Santana, L. A. Pena, A. Haimovitz-Friedman, S. Martin, D. Green, M. McLoughlin, C. Cordon-Cardo, E. H. Schuchman, Z. Fuks and R. Kolesnick, Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* **86**, 189–199 (1996).
10. L. A. Pena, Z. Fuks and R. N. Kolesnick, Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: Protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency. *Cancer Res.* **60**, 321–327 (2000).
11. E. D. Blume, C. T. Taylor, P. F. Lennon, G. L. Stahl and S. P. Colgan, Activated endothelial cells elicit paracrine induction of epithelial chloride secretion. 6-Keto-PGF1 is an epithelial secretagogue. *J. Clin. Invest.* **102**, 1161–1172 (1998).
12. M. H. Gaugler, C. Squiban, M. Claraz, K. Schweitzer, B. Weksler, P. Gourmelon and A. Van der Meeren, Characterization of the response of human bone marrow endothelial cells to *in vitro* irradiation. *Br. J. Haematol.* **103**, 980–989 (1998).
13. M. H. Gaugler, C. Squiban, M. A. Mouthon, P. Gourmelon and A. Van der Meeren, Irradiation enhances the support of haemopoietic cell transmigration, proliferation and differentiation by endothelial cells. *Br. J. Haematol.* **113**, 940–950 (2001).
14. M. H. Gaugler, V. Vereycken-Holler, C. Squiban, M. Vandamme, M. C. Vozenin-Brotans and M. Benderitter, Pravastatin limits endothelial activation after irradiation and decreases the resulting inflammatory and thrombotic responses. *Radiat. Res.* **163**, 479–487 (2005).
15. E. I. Azzam, S. M. de Toledo and J. B. Little, Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect. *Oncogene* **22**, 7050–7057 (2003).
16. C. Mothersill and C. Seymour, Radiation-induced bystander effects: Past history and future directions. *Radiat. Res.* **155**, 759–767 (2001).
17. K. M. Prise, M. Folkard and B. D. Michael, Bystander responses induced by low LET radiation. *Oncogene* **22**, 7043–7049 (2003).
18. E. I. Azzam and J. B. Little, The radiation-induced bystander effect: Evidence and significance. *Hum. Exp. Toxicol.* **23**, 61–65 (2004).
19. J. Folkman and K. Camphausen, Cancer. What does radiotherapy do to endothelial cells? *Science* **293**, 227–228 (2001).
20. J. G. Maj, F. Paris, A. Haimovitz-Friedman, E. Venkatraman, R. Kolesnick and Z. Fuks, Microvascular function regulates intestinal crypt response to radiation. *Cancer Res.* **63**, 4338–4341 (2003).
21. E. K. Balcer-Kubiczek, X. F. Zhang, G. H. Harrison, X. J. Zhou, R. M. Vigneulle, R. Ove, W. A. McCready and J. F. Xu, Delayed expression of hpS2 and prolonged expression of CIP1/WAF1/SDI1 in human tumour cells irradiated with X-rays, fission neutrons or 1 GeV/nucleon Fe ions. *Int. J. Radiat. Biol.* **75**, 529–541 (1999).
22. Y. H. Jee, W. I. Jeong, T. H. Kim, I. S. Hwang, M. J. Ahn, H. G. Joo, S. H. Hong and K. S. Jeong, p53 and cell-cycle-regulated protein expression in small intestinal cells after fast-neutron irradiation in mice. *Mol. Cell Biochem.* **270**, 21–28 (2005).
23. N. Cordes and D. van Beuningen, Arrest of human lung fibroblasts in G₂ phase after irradiation is regulated by converging phosphatidylinositol-3 kinase and beta1-integrin signaling *in vitro*. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **58**, 453–462 (2004).
24. C. Badie, J. Bourhis, J. Sobczak-Thepot, H. Haddada, M. Chiron, M. Janicot, F. Janot, T. Tursz and G. Vassal, p53-dependent G₂ arrest associated with a decrease in cyclin A2 and B1 levels in a human carcinoma cell line. *Br. J. Cancer* **82**, 642–650 (2000).
25. Q. Zhan, S. Fan, I. Bae, C. Guillouf, D. A. Liebermann, P. M. O'Connor and A. J. Fornace, Jr., Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* **9**, 3743–3751 (1994).
26. K. Asanuma, R. Moriai, T. Yajima, A. Yagihashi, M. Yamada, D. Kobayashi and N. Watanabe, Survivin as a radioresistance factor in pancreatic cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* **91**, 1204–1209 (2000).
27. M. J. Hendzel, Y. Wei, M. A. Mancini, A. Van Hooser, T. Ranalli, B. R. Brinkley, D. P. Bazett-Jones and C. D. Allis, Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G₂ and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* **106**, 348–360 (1997).
28. H. Zhu, L. Nie and C. G. Maki, Cdk2-dependent inhibition of p21 stability via a C-terminal cyclin-binding motif. *J. Biol. Chem.* **280**, 29282–29288 (2005).
29. C. Mothersill and C. Seymour, Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **71**, 421–427 (1997).
30. Z. Goldberg and B. E. Lehnert, Radiation-induced effects in unirradiated cells: A review and implications in cancer. *Int. J. Oncol.* **21**, 337–349 (2002).
31. W. F. Morgan, Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects *in vitro*. *Radiat. Res.* **159**, 567–580 (2003).
32. B. E. Lehnert, E. H. Goodwin and A. Deshpande, Extracellular factor(s) following exposure to alpha particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells. *Cancer Res.* **57**, 2164–2171 (1997).
33. K. M. Prise, O. V. Belyakov, M. Folkard and B. D. Michael, Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam. *Int. J. Radiat. Biol.* **74**, 793–798 (1998).
34. F. M. Lyng, C. B. Seymour and C. Mothersill, Production of a signal by irradiated cells which leads to a response in unirradiated cells characteristic of initiation of apoptosis. *Br. J. Cancer* **83**, 1223–1230 (2000).
35. M. A. Hill, J. R. Ford, P. Clapham, S. J. Marsden, D. L. Stevens, K. M. S. Townsend and D. T. Goodhead, Bound PCNA in nuclei of primary rat tracheal epithelial cells after exposure to very low doses of plutonium-238 α particles. *Radiat. Res.* **163**, 36–44 (2005).
36. M. Hirakawa, M. Oike, K. Masuda and Y. Ito, Tumor cell apoptosis by irradiation-induced nitric oxide production in vascular endothelium. *Cancer Res.* **62**, 1450–1457 (2002).
37. C. Shao, M. Folkard, B. D. Michael and K. M. Prise, Bystander signaling between glioma cells and fibroblasts targeted with counted particles. *Int. J. Cancer* **116**, 45–51 (2005).
38. M. V. Sokolov, L. B. Smilenov, E. J. Hall, I. G. Panyutin, W. M. Bonner and O. A. Sedelnikova, Ionizing radiation induces DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts. *Oncogene* **24**, 7257–7265 (2005).
39. H. Yang, N. Asaad and K. D. Held, Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-ray-irradiated normal human fibroblasts. *Oncogene* **24**, 2096–2103 (2005).
40. H. M. Berschneider and D. W. Powell, Fibroblasts modulate intestinal secretory responses to inflammatory mediators. *J. Clin. Invest.* **89**, 484–489 (1992).
41. J. L. Madara, T. W. Patapoff, B. Gillece-Castro, S. P. Colgan, C. A.

IRRADIATED ENDOTHELIAL CELLS INDUCE EPITHELIAL BYSTANDER RESPONSE

- Parkos, C. Delp and R. J. Mrsny, 5'-adenosine monophosphate is the neutrophil-derived paracrine factor that elicits chloride secretion from T84 intestinal epithelial cell monolayers. *J. Clin. Invest.* **91**, 2320–2325 (1993).
42. M. B. Resnick, S. P. Colgan, T. W. Patapoff, R. J. Mrsny, C. S. Awtrey, C. Delp-Archer, P. F. Weller and J. L. Madara, Activated eosinophils evoke chloride secretion in model intestinal epithelia primarily via regulated release of 5-AMP. *J. Immunol.* **151**, 5716–5723 (1993).
43. H. D. Suit and H. R. Withers, Endothelial cells and radiation gastrointestinal syndrome. *Science* **294**, 1411 (2001).
44. S. M. Fish, R. Proujansky and W. W. Reenstra, Synergistic effects of interferon gamma and tumour necrosis factor alpha on T84 cell function. *Gut* **45**, 191–198 (1999).
45. M. Bruewer, A. Luegering, T. Kucharzik, C. A. Parkos, J. L. Madara, A. M. Hopkins and A. Nusrat, Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J. Immunol.* **171**, 6164–6172 (2003).
46. M. Auli and E. Fernandez, Characterization of functional and morphological changes in a rat model of colitis induced by *Trichinella spiralis*. *Dig. Dis. Sci.* **50**, 1432–1443 (2005).
47. Z. Somosy, G. Horvath, A. Telbisz, G. Rez and Z. Palfia, Morphological aspects of ionizing radiation response of small intestine. *Micron* **33**, 167–178 (2002).
48. R. M. Vigneulle, S. Rao, A. Fasano and T. J. MacVittie, Structural and functional alterations of the gastrointestinal tract following radiation-induced injury in the rhesus monkey. *Dig. Dis. Sci.* **47**, 1480–1491 (2002).
49. I. Dublineau, F. Lebrun, S. Grison and N. M. Griffiths, Functional and structural alterations of epithelial barrier properties of rat ileum following X-irradiation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **82**, 84–93 (2004).
50. M. H. Gaugler, C. Squiban, A. Van der Meeren, J. M. Bertho, M. Vandamme and M. A. Mouthon, Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* **72**, 201–209 (1997).
51. D. M. Pritchard, C. S. Potten, S. J. Korsmeyer, S. Roberts and J. A. Hickman, Damage-induced apoptosis in intestinal epithelia from bcl-2-null and bax-null mice: Investigations of the mechanistic determinants of epithelial apoptosis in vivo. *Oncogene* **18**, 7287–7293 (1999).
52. T. G. Tessner, F. Muhale, T. E. Riehl, S. Anant and W. F. Stenson, Prostaglandin E2 reduces radiation-induced epithelial apoptosis through a mechanism involving AKT activation and bax translocation. *J. Clin. Invest.* **114**, 1676–1685 (2004).
53. W. Deng, M. J. Viar and L. R. Johnson, Polyamine depletion inhibits irradiation-induced apoptosis in intestinal epithelia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **289**, G599–606 (2005).
54. J. W. Wilson, D. M. Pritchard, J. A. Hickman and C. S. Potten, Radiation-induced p53 and p21WAF-1/CIP1 expression in the murine intestinal epithelium: apoptosis and cell cycle arrest. *Am. J. Pathol.* **153**, 899–909 (1998).
55. E. A. Komarova, R. V. Kondratov, K. Wang, K. Christov, T. V. Golovkina, J. R. Goldblum and A. V. Gudkov, Dual effect of p53 on radiation sensitivity in vivo: p53 promotes hematopoietic injury, but protects from gastro-intestinal syndrome in mice. *Oncogene* **23**, 3265–3271 (2004).

Etude *in vitro* et *in vivo* de la régulation de la mort radioinduite des cellules endothéliales par la Sphingosine-1-Phosphate

Protéger la vascularisation de la mort radioinduite est d'un intérêt majeur en radioprotection tissulaire. En développant un modèle d'étude de la radiosensibilité des cellules endothéliales, nous avons prouvé que les cellules HMEC-1 subissent 2 voies de mort après une irradiation à 15 Gy: une apoptose prémitotique précoce induite par la génération du céramide, et une mort mitotique tardive induite par les dommages de l'ADN. La Sphingosine-1-Phosphate (S1P), un métabolite du céramide, protège les HMEC-1 seulement de la mort précoce, mais pas de la mort mitotique. Nous avons confirmé *in vivo* que la S1P protège de l'apoptose radioinduite due à la génération du céramide. Cette radioprotection est partiellement dépendante de l'activation des récepteurs S1Ps. La distinction entre ces 2 types de mort pourrait permettre de définir de nouveaux radioprotecteurs spécifiques des tissus sains dont l'endothélium est quiescent, mais pas des cellules endothéliales tumorales qui sont pro-angiogéniques.

Mots-clés : *Sphingosine-1-Phosphate, radiothérapie, protection, apoptose, mort mitotique, cellules endothéliales*

***In vitro* and *in vivo* study of endothelial cells radio-induced death modulation by Sphingosine-1-Phosphate**

Protecting the vasculature from radiation-induced death is a major concern in tissue radioprotection. Developing a model of endothelial cells radiosensitivity, we proved that HMEC-1 undergo 2 waves of death after exposure to 15 Gy: an early premitotic apoptosis dependent of ceramide generation and a delayed DNA damage-induced mitotic death. Sphingosine-1-Phosphate (S1P), a ceramide antagonist, protects HMEC-1 only from early apoptosis, but not from mitotic death. We confirmed *in vivo* the S1P radioprotection from ceramide-mediated radio-induced apoptosis, and that S1P radioprotection is partially mediated by S1Ps receptors. Segregation between these 2 types of death may give the opportunity to define a new class of radioprotectors for normal tissue where quiescent endothelium represent the most sensitive target, while excluding malignant tumor containing pro-proliferating angiogenic endothelial cells, sensitive to mitotic death.

Key words: *Sphingosine-1-Phosphate, radiotherapy, protection, apoptosis, mitotic death, endothelial cells*

BONNAUD Stéphanie

INSERM U601

Institut de Biologie

9 Quai Moncoussu

44093 NANTES cedex 1