



HAL
open science

Régulation des interactions entre monocytes et cellules endothéliales après irradiation à forte dose

Ségolène Ladaigue

► **To cite this version:**

Ségolène Ladaigue. Régulation des interactions entre monocytes et cellules endothéliales après irradiation à forte dose. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS060 . tel-03826175

HAL Id: tel-03826175

<https://theses.hal.science/tel-03826175>

Submitted on 24 Oct 2022

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

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

Sorbonne Université

École Doctorale 394 - Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique.

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN).

Laboratoire de Radiobiologie des expositions Médicales (LRMed).

Régulation des interactions entre monocytes et cellules endothéliales après irradiation à forte dose

Par Ségolène Ladaigue

Thèse de doctorat de biologie cellulaire et moléculaire

Dirigée par le Dr. Olivier GUIPAUD

Présentée et soutenue publiquement le 22 Avril 2022

Devant un jury composé de :

Pr Khadija El Hadri (Professeure des Universités)

Dr Stéphane Supiot (PU-PH)

Pr Fabrice Allain (Professeur des Universités)

Dr Lydia Meziani (Chargée de recherche)

Dr Alexandre Boissonnas (Directeur de recherche)

Dr Olivier Guipaud (Chercheur)

Présidente du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directeur de thèse



« Science sans conscience, n'est que ruine de l'âme. »

François Rabelais, Pantagruel (1532).

« Bats-toi, signe et persiste.

Résiste. »

France Gall, Résiste (1981).

Dédicace à Sarah.

Remerciements

En premier lieu je souhaite remercier chaque membre de mon jury :

Le professeur **Khadija El Hadri** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Le docteur **Stéphane Supiot** et le professeur **Fabrice Allain** d'avoir accepté le dur rôle de rapporteur.

Et enfin le docteur **Alexandre Boissonnas** et le docteur **Lydia Meziani** pour leur regard critique sur mon travail de thèse en tant qu'examineur.

Je n'oublie pas bien sur les deux chercheurs qui m'ont suivie chaque année durant ces presque 4 ans, le docteur **Emmanuel-laurent Gautier** et le professeur **Philippe Deterre**. Merci pour nos échanges constructifs qui m'ont fait avancer.

À présent je vais remercier la team du LRMED.

À commencer par mon directeur de thèse **Olivier Guipaud**. Olivier, je te remercie de m'avoir choisie pour mon stage de Master 2 et pour mener à bien ce projet de thèse. Merci de m'avoir intégrée dans un projet complexe, riche et passionnant. Merci de ton extrême disponibilité, de la confiance que tu as placée en moi au fil des années, ton humanité et ta gentillesse. Merci pour les encouragements lorsque les résultats n'étaient pas ce que nous espérions, car « ça fait partie de la recherche ». Merci pour ta relecture assidue de ce manuscrit et ton souci du détail, merci pour m'avoir rappelé que « la perfection n'existe pas »... Cette expérience de thèse m'a fait grandir par la force des choses, mais en partie grâce à toi aussi et je t'en suis infiniment reconnaissante.

Ma reconnaissance va aussi à **Fabien Milliat** notre directeur de laboratoire. Merci de ton accessibilité, merci pour ton écoute, tes conseils, ton regard critique sur tous les projets du labo dont le mien. Je n'oublie pas ton florilège d'expressions en tout genre bien sûr. J'aimerais à présent remercier **Agnès François** pour sa gentillesse, ses encouragements, son humour, sa grande disponibilité et son écoute à chaque fois que j'en ai eu besoin. Merci des petits passages au bureau (même si tu venais voir Sarah...) qui m'ont donné le sourire ces derniers mois. J'ai également une pensée pour **Vincent Paget**, je te remercie de m'avoir aidée plus d'une fois en cytométrie. Je garderais gravé dans ma mémoire ton débit de parole, ta dextérité avec tes tours de T25, ta délicatesse lorsque tu manipules en culture et ta blouse qui vole derrière toi quand tu te balades dans les couloirs pour avoir ta dose de caféine. Sache que tu fais un peu flipper aux premiers abords mais qu'avec le temps on finit par t'apprécier ;)

Merci à **Noëlle Mathieu**, **Christelle Demarquay**, **Claire Squiban**, **Alexandra Semont** pour les petites discussions au détour d'un café. Merci de votre joie de vivre et de vos rires qui emplissent le couloir, c'est toujours agréable ☺ Je voulais aussi remercier **Georges Tarlet** et **Valérie Buard**, merci à vous d'avoir

toujours été disponibles pour les commandes à passer en urgence (n'est-ce pas Val ?), pour avoir répondu à mes questions et pour le soutien technique. Merci pour les échanges que nous avons pu avoir et de votre extrême gentillesse. Mention spéciale à Val pour avoir écouté quelques-uns de mes états d'âmes durant cette thèse...Pour en terminer avec les « chefs » du labo, je remercie **Alain Chapel** avec qui j'ai eu partagé mon bureau durant quelques mois. Je te remercie des échanges que nous avons eu, en revanche je ne regrette pas les doux effluves de tes ptits plats. Enfin à **Christine Linard**, merci de ta bonne humeur et de ton aide lorsque j'en ai eu besoin. Enfin, je remercie **Marc Benderitter** notre chef de service pour m'avoir accueillie au sein du SERAMED.

Cette thèse ça a été beaucoup de rencontres humaines, de vrais coups de cœur pour certains. Je pense notamment à toutes l(m)es licences pro qui ont travaillées sur le projet, **Charlotte** (AKA bébé prout-prout), **Khadi, Monica** et ma petite **Emilie B** (je me souviendrais de ta consommation impressionnante de petits pains au chorizo). Je remercie chacune d'entre vous pour votre investissement, votre bonne humeur et vos encouragements (merci Khadi pour la ptite chanson du flux) ! J'ose espérer que votre passage au labo a contribué à votre envie de poursuivre en recherche et sachez que j'ai beaucoup appris de vous aussi.

Sans transition passons au gang des triplettes maléfiques ! **Sarah, Manon** (bon t'es pas vraiment LRMED mais c'est tout comme) vous le savez je pense, je vous aime d'amour. **Sarah**, (Saratatouille pour les intimes) le hasard, la bonne étoile, le destin (...ou la simple réorganisation de bureaux soyons honnêtes) t'as fait atterrir dans mon bureau au début de ta thèse. Tu le sais, j'avais des « légers » *a priori*, j'ai découvert un ptit bijou, une personne au grand cœur, aux expressions loufoques (oui le « Va manger tes morts » surprend au début). Tu es une femme extrêmement déterminée qui sait où elle va (un jour tu seras présidente je ne l'oublie pas). Merci pour le mode jukebox au bureau ça va me manquer. **Manon** (ma ptite Guillou), l'OVNI parmi la brochette de biologistes, merci de ta douceur (quoique parfois on en doute), ta gentillesse et ton soutien. Merci d'avoir répondu à mes petites réflexions en physique et bien sûr, merci pour la solidarité dans la *#teampremierdegré*. Je regrette de ne pas t'avoir construit une cabane en RPE, on devrait te mettre une plaque à ton nom là-bas pour le nombre d'heures que tu y as passé haha ... Merci à vous de m'avoir fait entrer dans vos vies, je suis extrêmement heureuse que vous fassiez partie de la mienne (et ce n'est pas fini). Je vous souhaite énormément de courage pour la fin de la thèse ! Je ne pouvais pas enchaîner avec une autre personne que **Yoann** (*#cheeselover*), tu es un peu une extension de notre gang. Merci de ta bonne humeur, ton écoute, ton soutien et ta sagesse (maître

Confucius). Ton rire résonnera encore longtemps dans ma mémoire. Je te remercie aussi pour les nombreuses irradiations à ALPHEE que je n'oublie pas.

Enfin, je remercie un soldat parti trop tôt, **Emilie L** avec qui on a passé un peu de temps à « fumer des clopes et sucrer des fraises », et à bosser un peu quand même. Merci pour ta joie, ta gentillesse, tes conseils. Je te souhaite tout le meilleur dans ta vie de jeune chercheuse (un peu *badass*) et maman.

Merci à vous quatre pour les fous rires et pour avoir écouté mes histoires avec assiduité, ma thèse n'aurait pas été la même sans vous ♥♥

À **Clément**, mon compagnon de galère de la première heure depuis le master 2, confident à l'occasion je te souhaite énormément de courage pour les derniers mois de la thèse. Ça va le faire chou chou !

Mes encouragements vont aussi aux thésards du bureau d'à côté. **Lydia, Mallia** et **Martin** je ne doute pas que vos thèses se finiront pour le mieux. Bien sûr je n'oublie pas le revenant, **Jérémy** qui a initié les affres du *single cell* au labo (je ne sais pas si on te remercie pour le casse-tête à analyser haha). Je te souhaite bon courage pour la suite. Enfin, merci à **Batoul** pour son extrême gentillesse, ses encouragements et sa bonne humeur permanente.

Une pensée pour les anciens doctorants du labo avec qui j'ai partagé une partie de ma thèse. En premier, **Fred** merci de ta bonne humeur, ton aide lorsque j'en ai eu besoin, tes bêtises (merci pour l'ordinateur scotché au plafond et les batailles de glaçons qui tournent mal) et de m'avoir tout de suite mise dans le bain en me surnommant mini prout-prout dès mon premier jour. Les filles, **Alexia, Annaïg** et **Mariam**, je vous remercie pour les moments de convivialité et le soutien dans l'intense expérience qu'est la thèse. J'ai été ravie de vous avoir à mes côtés au début de ma thèse. Je remercie également **Miray** pour avoir repris le flambeau de Yoann à l'ALPHEE, merci pour ta gentillesse et les petites discussions qui ont fait passer les irradiations plus vite.

À l'IRSN j'ai aussi eu l'occasion de faire partie de l'ADIN qui a été une aventure humaine pas toujours simple mais extrêmement enrichissante. Merci à toutes les personnes avec qui j'ai collaboré sur ce projet au fil des années, **Annaïg, Mariam, Alexia, Hugues, Kossi, Céline, Mohammed, Coralie, Marie** et **Sarah** à qui j'ai refilé le flambeau de la présidence. Sarah, tu te débrouilles tellement mieux que moi et je suis très fière des projets qui s'annoncent !

Pour finir merci à toutes les personnes que j'ai croisé durant ma thèse avec qui j'ai partagé ne serait-ce que les pauses café notamment les thésards du LRTOX **Alice, Nicolas, Céline, Léo** et **Goran** (plein de courage pour la suite de ta thèse, je ne me fais pas trop de soucis pour toi). **Lucie** et **Quentin** les thésards

du LRACC je vous envoie tout mon courage et gardez votre bonne humeur ça rend les pauses bien agréables ! Une pensée pour **Paul**, le petit intru de l'IGR, reste tel que tu es mec ! Discuter avec toi est toujours un plaisir (un peu chronophage certes), merci de ton extrême gentillesse et ouverture d'esprit.

Un mot particulier pour **Morgane Dos Santos** (*#lareinedusarpp*), je te remercie pour tes conseils, tes encouragements, les discussions scientifiques et moins scientifiques. J'aimerais un jour savoir mener ma carrière comme tu le fais, au fond je pense que beaucoup t'admirent pour ça 😊

Merci à tous les membres du **LRACC** que j'ai pu croiser ou côtoyer, merci à tous de vos retours à l'occasion de présentations et de votre bonne humeur générale.

Mention spéciale à notre inimitable **Chloé** ! Il n'y en a pas deux comme toi, merci pour les milliers de lames que tu as stérilisées pour les manip d'adhésion et de nous aider à faire tourner le labo mine de rien.

Une pensée pour l'équipe du GSEA en particulier **Amandine, Romain, Fred** et **Delphine**. Merci pour les petites pauses toujours animées, votre gentillesse, vos encouragements et votre soin quotidien aux animaux. J'aimerais aussi remercier **Guillaume Piton** du CEA, merci pour ton extrême gentillesse et ton aide pour les transductions. Merci à **Olivier Diez** pour son humour, ses encouragements et son écoute durant certains moments difficiles.

Je vais maintenant remercier deux personnes sans qui je n'aurais probablement pas poursuivi jusqu'à la thèse. À mes deux anciennes maîtres de stage, **Christine Houssin** et **Caroline Borday**, je vous exprime une extrême reconnaissance pour m'avoir encadrée, éveillée à la recherche et m'avoir aidée bien au-delà du stage. Merci tout simplement.

Alors voilà, merci à tous pour cette aventure humaine et scientifique qui se termine (vous m'excuserez si j'en ai oublié).

Je remercie à présent ma famille. **Maman** (la ligne *SOS MAMAN* a pas mal fonctionnée ces derniers mois, je sais que tu as hâte que cette thèse se finisse !), **Papa** et **Gisèle**, merci de votre soutien indéfectible. Merci de votre écoute lors les moments durs, de votre confiance et pour m'avoir donné toutes les clés pour réaliser mes ambitions, je vous aime. Cette thèse c'est un peu la vôtre aussi.

Merci à mes frères **JB** et **Louis-Étienne** pour le soutien. Vous n'aurez plus le droit de dire que je suis petite quand on m'appellera docteur !

Merci à ma meilleure amie **Alison** de m'avoir soutenue depuis le début, surtout dans l'épreuve de l'écriture. Merci à mes amis **Liam, Titien, Guillaume, Daniela & Rui**. Merci à tous d'avoir été là pour décompresser même si vous ne comprenez pas grand-chose à ce que je fais ... ;) Merci à mes amis de la fac, thésards d'autres labos **Amandine, Manon.J, Romina, Virginie, Alexis** ça a fait du bien de se décharger parfois.

À **Thomas**, merci pour ton soutien et tes encouragements infiniment précieux depuis notre rencontre.

Enfin, à **Pascal** j'espère que tu es fier de là-haut.

La recherche n'est qu'une petite pierre à l'édifice, mais si j'ai choisi cette voie c'est aussi pour toi et pour toutes les personnes qui en ont besoin ...

Table des matières

AVANT -PROPOS	1
ÉTAT DE L'ART	3
CHAPITRE I – RAYONNEMENTS IONISANTS ET RADIOTHERAPIE	3
I.1 RAYONNEMENTS IONISANTS	3
A. NATURE ET PROPRIETES	3
B. NOTION DE DOSE	4
I.2 EFFETS PHYSIQUES, CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DES RAYONNEMENTS IONISANTS	5
A. EFFETS PHYSICO-CHIMIQUES	5
B. EFFETS BIOLOGIQUES	7
I.3 USAGE DE LA RADIOTHERAPIE	11
A. PRINCIPE DE LA RADIOTHERAPIE	12
B. PROTOCOLES, FRACTIONNEMENT ET ETALEMENT	13
C. LES 6 R DE LA RADIOTHERAPIE	13
D. TECHNIQUES DE RADIOTHERAPIE	15
F. LA RADIOTHERAPIE FLASH, UNE TECHNIQUE A FORT POTENTIEL	20
G. CONCLUSIONS	21
I.4 EFFETS SECONDAIRES DE LA RADIOTHERAPIE	21
A. EFFETS AIGUS	22
B. EFFETS TARDIFS	22
C. PRISE EN CHARGE DES COMPLICATIONS TARDIVES DE LA RADIOTHERAPIE	25
CHAPITRE II – LE RECRUTEMENT IMMUNITAIRE RADIO-INDUIT : FOCUS SUR LE ROLE DU COMPARTIMENT MYELOÏDE	28
II. 1 PRESENTATION DES ACTEURS DU SYSTEME IMMUNITAIRE	28
A. LES ACTEURS CELLULAIRES DE L'IMMUNITE INNEE	29
B. LES ACTEURS MOLECULAIRES DE L'IMMUNITE INNEE	31
C. LES ACTEURS CELLULAIRES DE L'IMMUNITE ADAPTATIVE	32
II.2 LA REPONSE IMMUNITAIRE APRES IRRADIATION	34
A. MECANISMES GENERAUX	34

B. LES CELLULES IMMUNITAIRES IMPLIQUEES DANS LES COMPLICATIONS TARDIVES DE LA RADIOTHERAPIE	36
C. REPOSE IMMUNITAIRE RADIO-INDUITE TUMORALE	37
II.3 ROLE DU COMPARTIMENT MYELOÏDE DANS LES TOXICITES TARDIVES DE LA RADIOTHERAPIE	38
A. LES POPULATIONS DE MONOCYTES	38
B. ÉVIDENCES DE L'IMPLICATION DES MONOCYTES/MACROPHAGES DANS LES SEQUELLES TARDIVES DE LA RADIOTHERAPIE	40
II.4 THERAPIE OU PISTES THERAPEUTIQUES CIBLANT LE SYSTEME IMMUNITAIRE DANS LE CONTEXTE DES TOXICITES RADIO-INDUITES	43

CHAPITRE III – ROLE DE L'ENDOTHELIUM DANS LES SEQUELLES RADIO-INDUITES TARDIVES **44**

III. 1 STRUCTURE DES VAISSEAUX	44
III. 2 LES GRANDES FONCTIONS DE L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE	45
A. ANGIOGENESE	45
B. TONUS VASCULAIRE	46
C. HEMOSTASE	46
D. PERMEABILITE	46
E. INFLAMMATION	48
III.3 ENDOTHELIUM ET TOXICITES RADIO-INDUITES	50
A. MORT CELLULAIRE	51
B. SENESCENCE	52
C. TRANSITION ENDOTHELIUM-MESENCHYME	53
D. STRESS OXYDANT & HYPOXIE	53
E. COAGULATION	54
F. AUGMENTATION DE L'INFLAMMATION	55
G. CONCLUSION	56
III.4 MODIFICATION DU RECRUTEMENT MONOCYTAIRE PAR L'ENDOTHELIUM IRRADIE	57
A. ÉTAPES ET ACTEURS DU RECRUTEMENT IMMUNITAIRE	57
B. LES MODIFICATIONS RADIO-INDUITES DES MOLECULES D'INTERACTIONS MONOCYTES-ENDOTHELIUM	60
III.5 L'ENDOTHELIUM UNE CIBLE THERAPEUTIQUE POUR LIMITER L'INFILTRATION IMMUNITAIRE RADIO-INDUITE ?	61

CHAPITRE IV - LES GLYCOSYLATIONS : ROLE DANS LE RECRUTEMENT IMMUNITAIRE RADIO-INDUIT **63**

IV.1 GENERALITES	63
A. O – GLYCOSYLATIONS	65
B. N – GLYCOSYLATIONS	66
C. LES GLYCOSAMINOGLYCANES (GAGs)	67

D. LES SUCRES LIES AUX LIPIDES ET ANCRES GPI	67
IV.2 ROLES PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES DES GLYCOSYLATIONS	67
IV.3 GLYCOSYLATIONS ENDOTHELIALES ET REGULATION DU RECRUTEMENT IMMUNITAIRE	70
A. LE GLYCOCALYX ENDOTHELIAL	70
B. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES SUR LES MOLECULES ENDOTHELIALES IMPLIQUEES DANS LE RECRUTEMENT IMMUNITAIRE	70
C. MODIFICATION DU GLYCOME ENDOTHELIAL RADIO-INDUIT ET MODIFICATION DU RECRUTEMENT IMMUNITAIRE	71
IV.5 MOLECULES CIBLANT LES GLYCOSYLATIONS HAUTEMENT MANNOSYLEES	75
PROBLEMATIQUE & OBJECTIFS	77
<hr/>	
RESULTATS	79
<hr/>	
I. ARTICLE DE THESE	80
<hr/>	
II. RESULTATS COMPLEMENTAIRES <i>IN VITRO</i>	82
<hr/>	
II.1 ÉTUDE PRELIMINAIRE DU MOTIF SIALYL LEWIS X SUR LES CELLULES ENDOTHELIALES APRES IRRADIATION	82
II.2 ÉTUDE PRELIMINAIRE DU ROLE DE LA SIGNALISATION CCR2/CCL2 SUR LA TRANSMIGRATION ENDOTHELIALE POST-IRRADIATION <i>IN VITRO</i>	83
II.3 ÉTUDE PRELIMINAIRE DU ROLE DE LA SIGNALISATION CX3CR1/CX3CL1 DANS L'ADHESION ET LA TRANSMIGRATION ENDOTHELIALE POST-IRRADIATION <i>IN VITRO</i>	85
<hr/>	
III. RESULTATS COMPLEMENTAIRES <i>IN VIVO</i>	89
<hr/>	
III.1 ÉTUDES DES INTERACTIONS ENTRE LEUCOCYTES ET ENDOTHELIUM PAR MICROSCOPIE INTRAVITALE SUR LES VEINULES DU MESENTERE	89
III.2 ÉTUDE DU ROLE DES GLYCOSYLATIONS HAUTEMENT MANNOSYLEES <i>IN VIVO</i>	90
<hr/>	
DISCUSSION & PERSPECTIVES	96
<hr/>	
I. CHOIX DES MODELES	96
I.1 MODELES CELLULAIRES	96
I.2 MODELES ANIMAUX	97
I.3 LES MODALITES D'IRRADIATIONS : DOSE, TEMPS ET CIBLE	97
II. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	99
<hr/>	
CONCLUSION GENERALE	109
<hr/>	
BIBLIOGRAPHIE	110

Table des figures

Figure 1 : Effets physico-chimiques directs et indirects engendrés par les rayonnements ionisants.....	7
Figure 2 : Le cycle cellulaire, ses points de contrôle et inhibiteurs de points de contrôle.....	8
Figure 3 : Représentation schématique des voies de signalisations cellulaires principales aboutissant à la sénescence et/ou à la mort cellulaire radio-induite.....	9
Figure 4 : Notion de fenêtre thérapeutique.	12
Figure 5 : Comparaison entre la 3D-CRT et l'IMRT.....	17
Figure 6 : Comparaison du profil de dépôt de dose entre des photons à 6 MV, des protons et des ions carbone.	19
Figure 7 : Comparaison IMRT et protonthérapie.....	19
Figure 8 : Continuum d'évènements aboutissant aux complications tardives de la radiothérapie.....	25
Figure 9 : Principaux moyens de prise en charge des complications tardives de la radiothérapie.....	26
Figure 10 : Présentation des lignages immunitaires.....	29
Figure 11 : Représentation en nuages de points des sous-populations de monocytes humains à l'aide des marqueurs CD14 et CD16. Tiré de (Ziegler-Heitbrock and Hofer 2013).	39
Figure 12 : Présentation schématique des différents types de vaisseaux présents dans le corps humain.....	45
Figure 13 : Les principales jonctions existantes entre les cellules endothéliales.....	47
Figure 14 : Synthèse des fonctions de l'endothélium.....	49
Figure 15 : Coupes histologiques illustrant des dommages vasculaires post-radiothérapie. ..	50
Figure 16 : Synthèse des dysfonctions radio-induites de l'endothélium.....	57
Figure 17 : Les principales étapes du recrutement immunitaire.	58
Figure 18 : Vision schématique des molécules impliquées dans le recrutement des monocytes par l'endothélium à chaque étape du recrutement immunitaire.	61
Figure 19 : Structure de différents monosaccharides participant à la composition des oligosaccharides chez les mammifères. Tiré de (Bertozzi and Rabuka 2009).	64
Figure 20 : Les principales glycosylations chez les mammifères. Tiré de (Reily et al. 2019).	64
Figure 21 : Modèle simplifié d'une mucine portant des O-glycosylations.	65

Figure 22 : Structure des différents sous-types de N-glycosylations.....	66
Figure 23 : Principales étapes de la maturation des mannosés.....	73
Figure 24 : Présentation de l'action des mannosidases.....	74
Figure 25 : Moyens de régulation des N-glycosylations hautement mannosylées.	76
Figure 26 : Illustration schématique des différents acteurs étudiés potentiellement impliqués dans le recrutement des monocytes par l'endothélium irradié.	78

Table des tableaux

Tableau 1 : Source et utilisation des différents rayonnements ionisants.....	4
Tableau 2 : Description générale des effets stochastiques engendrés par une exposition aiguë aux rayonnements ionisants. Dose seuil, délais d'apparition, principaux effets et risques à court et long terme. D'après (IRSN 2006; UNSCEAR 2012).	11
Tableau 3 : Régulation et fonction des sous-populations de LT helper. Adapté de (Owen et al. 2014).....	34
Tableau 4 : Études expérimentales en faveur d'un rôle des macrophages dans les complications tardives de la radiothérapie.....	42
Tableau 5 : Nombre de sites de N-glycosylations sur les molécules d'adhésion endothéliales en fonction des espèces.....	71

Table des résultats complémentaires

Figure résultat complémentaire 1 : Dosage de la chimiokine CCL2 dans le surnageant d'HUVECs après irradiation.	83
Figure résultat complémentaire 2 : Effet du siRNA contre <i>ccl2</i> sur la migration transendothéliale des monocytes après irradiation.	84
Figure résultat complémentaire 3 : Dosage de la chimiokine CX3CL1 dans le surnageant d'HUVECs après irradiation.	85
Figure résultat complémentaire 4 : Effet du siRNA contre <i>cx3cl1</i> sur migration transendothéliale des monocytes après irradiation.	87
Figure résultat complémentaire 5 : Effet de la fractalkine/CX3CL1 sur l'adhésion des THP-1 en condition de flux <i>in vitro</i> après irradiation des HUVECs.	88
Figure résultat complémentaire 6 : Schéma expérimental de la technique de microscopie intravitale sur les veinules du mésentère.	90
Figure résultat complémentaire 7 : Schéma expérimental de l'évaluation du rôle des N-glycosylations hautement mannosylées dans l'infiltration macrophagique et dans les lésions radio-induites intestinales <i>in vivo</i>	92
Figure résultat complémentaire 8 : Vue schématique de la structure intestinale.	93
Figure résultat complémentaire 9 : Illustration des lésions et de l'infiltration des macrophages de l'intestin grêle chez la souris 3 jours post-irradiation à 18 Gy.	94
Figure résultat complémentaire 10 : Illustration des lésions et de l'infiltration de macrophages de l'intestin grêle chez la souris à 7 jours post-irradiation à 18 Gy.	95

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
<i>3D-CRT</i>	Three dimensional - conformational radiotherapy
<i>4D-CRT</i>	Four dimensional - conformational radiotherapy
<i>ADN</i>	Acide désoxyribonucléique
<i>AINS</i>	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
<i>AKT (PKB)</i>	Protein kinase B
<i>Antigène Tn</i>	Antigène Thomsen-nouveau
<i>AP-1</i>	Activating protein 1
<i>ARN</i>	Acide ribonucléique
<i>ASMase</i>	Sphingomyélinase acide
<i>ATM</i>	Ataxia telangectasia mutated
<i>ATP</i>	Adénosine triphosphate
<i>BAEC</i>	Bovine aortic endothelial cell
<i>BCR</i>	B cell receptor
<i>bFGF</i>	Basic fibroblast growth factor
<i>BNCT</i>	Boron neutron capture therapy
<i>C57, C57Bl/6</i>	Souris C57 black 6
<i>CAPK</i>	Ceramide-activated protein kinase
<i>CCL2 / CCR2</i>	C-C motif chemokine ligand 2 / C-C motif chemokine receptor 2
<i>CCL5 / CCR5</i>	C-C motif chemokine ligand 5 / C-C motif chemokine receptor 5
<i>CD</i>	Cluster of differentiation
<i>CDK4/6</i>	Cyclin-dependent kinase 4 / 6
<i>CDKN1A (p21)</i>	Inhibiteur de kinase cycline-dépendante 1
<i>CDKN2A (p16)</i>	Inhibiteur de kinase cycline-dépendante 2A
<i>CIRT</i>	Carbon ions radiation therapy
<i>CLR</i>	c-type lectin receptor
<i>CMH</i>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<i>CO₂</i>	Dioxyde de carbone
<i>Con A</i>	Concanavaleine A
<i>COX 2</i>	Cyclooxygénase 2
<i>CPA</i>	Cellule présentatrice d'antigène
<i>CSF</i>	Colony stimulating factor
<i>CSF 1R</i>	Colony stimulating factor 1 receptor
<i>CTGF</i>	Connective tissue growth factor
<i>CTLA-4</i>	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
<i>CV-N</i>	Cyanovirine-N
<i>CX3CL1/CX3CR1</i>	Chemokine [C-X3-C motif] ligand 1 / Chemokine [C-X3-C motif] receptor 1
<i>DAMPs</i>	Danger or Damage associated molecular danger associated patterns
<i>DDR</i>	DNA damage response
<i>e-</i>	Électron

<i>e-aq</i>	Électron aqueux
<i>EBR</i>	Efficacité biologique relative
<i>EDEM</i>	ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein
<i>EDHF</i>	Endothelium derived hyperpolarizing factor
<i>ELISA</i>	Enzyme linked immunosorbent assay
<i>EMT</i>	Epithelial-mesenchymal transition
<i>EndoMT</i>	Endothelial-mesenchymal transition
<i>Eph</i>	Ephrine
<i>ET-1</i>	Endothéline 1
<i>FAS/FAS-L</i>	Récepteur de mort FAS / FAS ligand
<i>FGF</i>	Fibroblast growth factor
<i>FK</i>	Fratalkine (CX3CL1)
<i>FSP-1</i>	Fibroblast-specific protein-1
<i>Fuc</i>	Fucose
<i>GAG</i>	Glycosaminoglycane
<i>Gal</i>	Galactose
<i>GalNac</i>	N-acétylgalactosamine
<i>GalNac-Ts</i>	N-acétylgalactosamine transférases
<i>GANIL</i>	Grand accélérateur national d'ions lourds
<i>GlcA</i>	Acide glucuronique
<i>GlcNac</i>	N-acétylglucosamine
<i>Glu</i>	Glucose
<i>GM-CSF</i>	Granulocytes macrophages colony stimulating factor
<i>GPCR</i>	G protein-coupled receptor
<i>GPI</i>	Glycosylphosphatidylinositol
<i>GRO α (CXCL1)</i>	Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 1
<i>Gy</i>	Grays
<i>H</i>	Dose équivalente
<i>HDMEC</i>	Human dermal microvascular endothelial cells
<i>HES</i>	Hemalun eosine safran
<i>HGF</i>	Hepatocyte growth factor
<i>HHL</i>	Hippeastrum hybrid Lectin
<i>HIF α/β</i>	Hypoxia inducible factor alpha / bêta
<i>HMGB1</i>	High mobility group box 1
<i>HR</i>	Homologous recombination
<i>HRP</i>	Horseradish peroxidase
<i>HUVECs</i>	Human umbilical vein endothelial cells
<i>ICAM-1 ou 2</i>	InterCellular adhesion molecule 1 ou 2
<i>IFN</i>	Interferon
<i>IL-</i>	Interleukine
<i>IMRT</i>	Intensity modulated radiation therapy
<i>iNOS</i>	Inducible oxyde nitrique synthase
<i>IRF</i>	Interferon-regulatory factor
<i>IRM</i>	Imagerie à résonance magnétique

<i>IRSN</i>	Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire
<i>J</i>	Joule
<i>JAM</i>	Junctional adhesion molecule
<i>JNK</i>	Jun amino-terminal kinase
<i>KO</i>	Knock-out
<i>LB</i>	Lymphocyte B
<i>LBRC</i>	Lateral border recycling compartment
<i>LDL</i>	Lipoprotein lipase
<i>LFA-1</i>	Lymphocyte function-associated antigen 1
<i>LINAC</i>	Linear accelerator
<i>LPS</i>	Lipopolysaccharides
<i>LRMED</i>	Laboratoire de radiobiologie des expositions médicales
<i>LRP-1</i>	Low-density lipoprotein receptor related protein 1
<i>LRP-1</i>	Low density lipoprotein receptor-related protein 1
<i>LT</i>	Lymphocyte T
<i>LTh</i>	Lymphocyte T CD4 helper
<i>Mal II</i>	Maackia amurensis leukoagglutinin
<i>Man</i>	Mannose
<i>MAN1A1</i>	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA
<i>MAN1A2</i>	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IB
<i>MAN1B1</i>	Endoplasmic reticulum mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase
<i>MAN1C1</i>	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IC
<i>MAPK</i>	Mitogen activated protein kinase
<i>MCP-1</i>	Monocyte chemoattractant protein 1
<i>MDCs</i>	Myeloid derived cells
<i>MDM2</i>	Murine double minute 2
<i>MEC</i>	Matrice extracellulaire
<i>MIP-2</i>	Macrophage inflammatory protein-2
<i>MLC</i>	Myosine-light-chain
<i>MMP</i>	Metalloprotéase
<i>MMT</i>	Macrophage to myofibroblast transition
<i>MnSOD</i>	Manganese superoxyde dismutase
<i>mTOR</i>	Mammalian target of rapamycin
<i>MV</i>	MegaVolt
<i>NeuAc</i>	N-acetylneuraminic acid
<i>NF-κB</i>	Nuclear factor kappa beta
<i>NHEJ</i>	Non-homologous end-joining
<i>NK</i>	Natural Killer Lymphocytes
<i>NLR</i>	Nod like receptor
<i>NO</i>	Oxyde nitrique
<i>NOX</i>	NADPH oxidase
<i>OAR</i>	Organes à risques
<i>ORL</i>	Oto-rhino-laryngo
<i>OST</i>	Oligosaccharyltransférases

<i>PAI-1</i>	Plasminogen activator inhibitor-1
<i>PAMPs</i>	Pathogen-associated molecular patterns
<i>PBS</i>	Phosphate-buffered saline
<i>PD-1 / PDL-1</i>	Programmed death -1 / Programmed death ligand 1
<i>PECAM1</i>	Platelet endothelial cell adhesion molecule
<i>PEG</i>	Polyéthylène-glycol
<i>PGI2</i>	Prostacycline
<i>PI3K</i>	Phosphoinositide 3-kinase
<i>PLC</i>	Phospholipase C
<i>PPAR</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor
<i>PRR</i>	Patterns recognition receptor
<i>PSGL-1</i>	P-selectin glycoprotein ligand-1
<i>pVHL</i>	Von Hippel Lindau protein
<i>Rb</i>	Protéine du rétinoblastome
<i>RE</i>	Réticulum endoplasmique
<i>RLR</i>	Retinoic acid inducible gene I like receptor
<i>RNS</i>	Reactive nitrogen species
<i>ROS</i>	Reactive oxygen species
<i>RT</i>	Radiothérapie
<i>SAPK</i>	Stress activated protein kinases
<i>SASP</i>	Senescence associated secretory phenotype
<i>SBRT</i>	Stereotatic body radiation
<i>SDF-1</i>	Stromal cell-derived factor
<i>Sgi</i>	Syndrome gastro-intestinal
<i>sialyl Tn</i>	Onco-foetal sialyl-Tn (sTn) antigen
<i>siRNA</i>	Small interfering RNA
<i>sLe^A</i>	Sialyl lewis A
<i>sLe^X</i>	Sialyl lewis X
<i>SNA</i>	Sambucus nigra agglutinin
<i>SNC</i>	Système nerveux central
<i>SOD</i>	Superoxide dismutase
<i>SPM</i>	Sphingomyéline
<i>SPMase</i>	Sphingomyélinase
<i>Sv</i>	Sievert
<i>TAM</i>	Tumor associated macrophages
<i>TCR</i>	T cell receptor
<i>tcu-PA</i>	Urokinase bicaténaire
<i>TEMP</i>	Tomographie d'émission monophotonique
<i>TEP</i>	Tomographie par émission de positons
<i>TGF β</i>	Transforming growth factor beta
<i>Tie 2</i>	Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains
<i>TLR</i>	Toll like receptor
<i>TNF-α</i>	Tumor necrosis factor alpha
<i>TP53</i>	Tumor protein 53

<i>t-PA</i>	Activateur tissulaire du plasminogène
<i>TPS</i>	Treatment planning system
<i>Treg (nTreg, iTreg)</i>	Lymphocytes régulateurs (naturel, induit)
<i>TXA2</i>	Thromboxane 2
<i>UDP-GalNac</i>	Uridine diphosphate N-acetylgalactosamine
<i>UNSCEAR</i>	United nations scientific committee on the effects of atomic radiation
<i>VCAM-1</i>	Vascular cell adhesion molecule 1
<i>VE-Cadh</i>	Vascular endothelial cadherin
<i>VEGF</i>	Vascular endothelial growth factor
<i>VLA-4</i>	Very late antigen-4
<i>VMAT</i>	Volumetric modulated arc therapy
<i>vWF</i>	von Willebrand factor
<i>W</i>	Dose efficace
<i>WT</i>	Wild-Type
<i>Xyl</i>	Xylose
<i>Z</i>	Numéro atomique
<i>α-SMA</i>	Alpha-smooth muscle actin
<i>γH2AX</i>	Histone H2AX phosphorylée

Valorisation de la thèse

Publications à comité de lecture

Ian Morilla, Philippe Chan, Fanny Caffin, Ljubica Svilar, Sonia Selbonne, Ségolène Ladaigue, Valérie Buard, Georges Tarlet, Béatrice Micheau, Vincent Paget, Agnès François, Maâmar Souidi, Jean-Charles Martin, David Vaudry, Mohamed-Amine Benadjaoud, Fabien Milliat, Olivier Guipaud, **Deep models of integrated multiscale molecular data decipher the endothelial cell response to ionizing radiation**, iScience, 2022, 103685, ISSN 2589-0042, <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103685>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589004221016552>).

Ségolène Ladaigue, Anne-Charlotte Lefranc, Khadidiatou Baldé, Monica Quitoco, Émilie Bacquer, Didier Busso, Guillaume Piton, Jordane Dépagne, Nathalie Deschamps, Valérie Buard, Vincent Paget, Agnès François, Fabien Milliat, Olivier Guipaud. **A role for the endothelial mannosidase MAN1C1 in radiation-induced immune cell recruitment** (soumis).

Communications orales

13-17 septembre 2020 – Ségolène Ladaigue, Anne-Charlotte Lefranc, Kadhidiatou Baldé, Monica Quitoco, Valérie Buard, Fabien Milliat, Olivier Guipaud - **Digital conference of the European Radiation Research Society (ERRS) Congress 2020** (Lund, Sweden)
« Characterization of monocytes-endothelium interactions after radiotherapy ».

20 octobre 2020 – « **3 minutes pour une thèse** » concours organisé par l'IRSN (Fontenay-aux-roses, France).

3 mars-1 avril 2021 – Ségolène Ladaigue, Anne-Charlotte Lefranc, Khadidiatou Balde, Monica Quitoco, Emilie Bacquer, Agnès François, Vincent Paget, Fabien Milliat and Olivier Guipaud - **Journées des thèses de l'IRSN** (Conférence digitale) « Régulation des interactions entre les monocytes et les cellules endothéliales dans un contexte de radiothérapie ».

14-18 juin 2021 – Ségolène Ladaigue, Anne-Charlotte Lefranc, Khadidiatou Baldé, Monica Quitoco, Emilie Bacquer, Agnès Francois, Vincent Paget, Fabien Milliat and Olivier Guipaud - **Congrès national de radioprotection de la SFRP 13^{ème} édition « e-SFRP2021 » (Conférence digitale)** « Caractérisation des interactions entre monocytes et cellules endothéliales après irradiation ».

27-31 août 2021 – Ségolène Ladaigue, Anne-Charlotte Lefranc, Khadidiatou Baldé, Monica Quitoco, Emilie Bacquer, Agnès Francois, Vincent Paget, Fabien Milliat and Olivier Guipaud - **European Society for Radiotherapy and Oncology (ESTRO) annual congress (Madrid, Spain)** « MAN1C1, a potential regulator of monocyte – endothelial cell interactions after irradiation ».

Communications affichées

1-4 avril 2019 – Ségolène Ladaigue, Anne-Charlotte Lefranc, Khadidiatou Baldé, Fabien Milliat, Olivier Guipaud. **Journées des thèses de l'IRSN (La Grande Motte, France)** « Étude des interactions entre monocytes et cellules endothéliales dans un contexte de radiothérapie ».

20-21 mai 2019 – Ségolène Ladaigue, Anne-Charlotte Lefranc, Khadidiatou Baldé, Fabien Milliat, Olivier Guipaud - **Journées des thèses de l'école doctorale ED 394 : Physiologie, Physiopathologie et thérapeutique (Paris, France)** « Study of interaction between monocytes and endothelium in a radiotherapy context ». *Poster teasing* (1 minute, 1 slide).

12-14 novembre 2019 – Ségolène Ladaigue, Anne-Charlotte Lefranc, Khadidiatou Baldé, Valérie Buard, Fabien Milliat, Olivier Guipaud - **52th annual meeting of the French Society for Immunology (SFI) (Nantes, France)** « Regulation of monocyte-endothelium interactions in a radiotherapy context ».

27-28 mai 2021 – Ségolène Ladaigue, Anne-Charlotte Lefranc, Khadidiatou Baldé, Monica Quitoco, Emilie Bacquer, Agnès François, Vincent Paget, Fabien Milliat, Olivier Guipaud. **Journées des thèses de l'école doctorale ED 394 : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique (Evènement digital)** « Characterization of monocyte and endothelium interactions in a radiotherapy context ».

29 -30 novembre 2021 – Ségolène Ladaigue, Anne-Charlotte Lefranc, Khadidiatou Baldé, Monica Quitoco, Emilie Bacquer, Agnès Francois, Vincent Paget, Fabien Milliat and Olivier Guipaud - **46th annual meeting of the European Radiation Research Society (ERRS) (Caen, France)** « Regulation of monocyte-endothelial cell interactions after irradiation ».

7-9 décembre 2021 - Olivier Guipaud, Ségolène Ladaigue, Anne-Charlotte Lefranc, Khadidiatou Baldé, Monica Quitoco, Emilie Bacquer, Agnès Francois, Vincent Paget, Fabien Milliat - **53th annual meeting of the French Society for Immunology (SFI) (Paris, France)**.
“Regulation of monocyte – endothelial cell interactions after irradiation”.

Prix et distinction

Young investigator Award - Digital conference of the European Radiation Research Society (ERRS) Congress 2020.

Formations complémentaires durant la thèse

Février 2019 - Formation pratique en cytométrie en flux (Sorbonne Université).

Septembre 2019 - Expérimentation animale, éthique et bien-être, formation générale des concepteurs de projets scientifiques (Rongeurs et Lagomorphes).

Octobre 2019 - Formation réglementaire de base en chirurgie chez le rongeur de laboratoire.

Avant-Propos

La découverte de la radioactivité puis des rayons X à la fin du XIX^{ème} siècle ont ouvert un champ des possibles dans le domaine médical, d'abord en imagerie, puis dans le traitement de pathologies comme les cancers. Aujourd'hui, souvent combinée à la chirurgie et la chimiothérapie, la radiothérapie est l'un des traitements antitumoraux principaux délivrés à plus de la moitié des patients atteints de cancers dans les pays développés. Si la radiothérapie est un traitement efficace, il n'est pas sans conséquences sur les organes sains situés dans le champ de l'irradiation. Cette atteinte des organes sains est à l'origine des effets secondaires de la radiothérapie qui impactent parfois durablement la qualité de vie des patients.

L'ensemble des mécanismes mis en jeu à l'échelle moléculaire, cellulaire et tissulaire dans les complications radio-induites sont encore insuffisamment connus. Le laboratoire de radiobiologie des expositions médicales (LRMED) de l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN) étudie depuis plusieurs années la réponse des tissus sains à l'irradiation en utilisant des cellules en culture et des modèles expérimentaux chez l'animal. L'équipe s'intéresse également à des solutions thérapeutiques innovantes comme le traitement par les cellules stromales mésenchymateuses, l'utilisation de probiotiques ou encore la transplantation fécale pour limiter ou traiter les toxicités radio-induites. Dans cette problématique générale, le laboratoire s'est plus particulièrement intéressé à la réponse de l'endothélium vasculaire en tant que cible collatérale de l'irradiation lors de la radiothérapie.

Plusieurs travaux, dont ceux du LRMED, ont mis en évidence le rôle des dommages endothéliaux dans le développement des pathologies radio-induites tardives. L'endothélium vasculaire est la couche la plus interne des vaisseaux sanguins, en interaction directe avec la circulation sanguine, et présente des réponses multiples à l'irradiation. Dans le cadre d'un travail de thèse, il avait été établi que les glycosylations à la surface de l'endothélium étaient fortement modifiées par l'irradiation. Ces glycosylations sont impliquées dans les interactions entre les cellules, notamment lors du recrutement des cellules immunitaires de la circulation sanguine dans les tissus inflammés. En particulier, il avait été montré que les N-glycosylations hautement mannosylées étaient impliquées dans l'étape d'adhésion des monocytes sur l'endothélium irradié *in vitro*. Les monocytes sont des cellules immunitaires innées qui présentent un intérêt particulier dans les complications radio-induites. Plusieurs études ont en effet suggéré que les macrophages provenant de la différenciation des monocytes jouent un rôle dans la mise en place de la fibrose radio-induite. Mieux comprendre les mécanismes à l'origine

de leur recrutement pourrait faciliter la découverte de solutions pour moduler leur recrutement et ainsi limiter les séquelles radio-induites.

Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le recrutement des monocytes au sein des tissus irradiés. Nous nous sommes en particulier intéressés au rôle de la protéine MAN1C1 endothéliale, qui régule les glycosylations hautement mannosylées, dans les étapes d'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales et de la migration transendothéliale des monocytes. Nous avons utilisé un modèle d'adhésion des monocytes en condition de flux en place et nous avons développé un modèle d'imagerie en temps réel pour visualiser et quantifier la migration transendothéliale *in vitro* après irradiation. Le rôle de la mannosidase MAN1C1 a été étudié dans ces deux étapes du processus de recrutement immunitaire. Des expérimentations chez la souris ont également été menées pour évaluer le rôle de ces glycosylations dans le recrutement radio-induit des cellules myéloïdes. Le rôle d'autres acteurs comme des couples de récepteurs/ligands de la famille des chimiokines a également été étudié. Ce travail de thèse ouvre de nouvelles perspectives sur les mécanismes impliqués dans l'infiltration immunitaire des tissus endommagés lors d'une irradiation thérapeutique à fortes doses.

État de l'art

Chapitre I – Rayonnements ionisants et radiothérapie

La radiothérapie désigne toute technique utilisant des rayonnements ionisants à des fins thérapeutiques, curatives ou palliatives. Elle fait partie de l'arsenal thérapeutique anticancéreux et peut être utilisée seule ou en combinaison avec d'autres solutions thérapeutiques, comme la chirurgie, la chimiothérapie et/ou les thérapies ciblées comme les immunothérapies. Plus rarement, la radiothérapie peut être indiquée dans le traitement de pathologies non cancéreuses telles que les maladies rhumatoïdes, les malformations artério-veineuses et les tumeurs bénignes (McKeown et al. 2015).

Ce premier chapitre décrit les bases physiques, chimiques et biologiques de la radiothérapie, et présente les principales techniques actuellement utilisées, ainsi que leurs conséquences et leurs limites.

I.1 Rayonnements ionisants

a. Nature et propriétés

Un rayonnement ionisant est un rayonnement électromagnétique capable de créer, directement ou indirectement, des ions lorsqu'il traverse la matière. Les différents rayonnements ionisants ont une énergie qui peut être mise à profit dans différents domaines, notamment à des fins médicales. De nombreuses techniques d'imagerie utilisent les propriétés des rayonnements ionisants comme celle des rayons X, des rayons γ , les particules α ou encore des positons (particules β^+) pour réaliser de l'imagerie. Dans le cas de la radiographie ou du scanner, le rayonnement X traverse le patient. Ces rayonnements sont arrêtés de manière variable en fonction des types de tissus et permettent de produire une image en coupes, analysables après collecte sur un détecteur. La tomographie par émission de positons (TEP) ou la tomographie d'émission mono-photonique (TEMP), aussi appelée scintigraphie, permettent de mettre en évidence des activités métaboliques particulières en injectant un produit radioactif émetteur de positons ou de photons γ collectés sur un détecteur. Concernant les applications thérapeutiques, les rayons X et γ sont utilisés en radiothérapie anticancéreuse externe ou interne (curiethérapie). D'autres rayonnements comme les protons ou les ions lourds en hadronthérapie peuvent également être utilisés dans les stratégies thérapeutiques antitumorales. Les neutrons ont constitué un espoir d'utilisation via la *Boron Neutron Capture Therapy* (BNCT).

Cependant, cette technique s'accompagne d'un coût très élevé des installations et d'une grande toxicité (Malouff et al. 2021). Enfin, les émetteurs α sont particulièrement utilisés en radiothérapie vectorisée, couplés à des anticorps afin de cibler de manière locale les tumeurs. Le **Tableau 1** référence les principaux rayonnements ionisants, ainsi que leur origine, pénétration dans la matière et utilisations.

Type de rayonnement	Source ou mode de production	Pénétration dans la matière	Exemple d'utilisation
α (noyau d'Hélium)	Isotope radioactif émetteur alpha (ex : Uranium ²³⁵).	Très Faible	Réaction Nucléaire. Utilisation externe expérimentale. Radio-immunothérapie.
β^- (électron)	Isotope radioactif émetteur bêta - (ex : Cobalt ⁶⁰). Accélérateur linéaire	Faible	Autoradiographie. Marquage/traçage radioactif. Radiothérapie de contact.
β^+ (positon)	Isotope radioactif émetteur de positons (ex : Fluor ¹⁸).	Faible	Imagerie médicale (tomographie par émission de positons, TEP).
X (photon)	Rayonnement artificiel produit par une accélération d'électrons rencontrant une cible composé d'atomes de numéro atomique (Z) élevé.	Forte	Imagerie médicale (radiographie, scanner) et usage thérapeutique (radiothérapie).
γ (photon)	Radionucléide dont la désintégration produit un rayonnement γ (ex : Iridium ¹²⁵ , Cesium ¹³⁷ , Cobalt ⁶⁰ , Iode ¹²⁵).	Très Forte	Imagerie médicale (Tomographie d'émission monophotonique, TEMP) et usage thérapeutique (radiothérapie et curiethérapie).
Neutron	Émission secondaire suite à une fission ou fusion nucléaire.	Très Forte	Boron Neutron Capture Therapy (BNCT)
Proton	Accélérateur de proton.	Faible	Hadronthérapie.
Ion lourd chargé	Accélérateur de Carbone, Néon, Argon, Fer...	Faible	Hadronthérapie.

Tableau 1 : Source et utilisation des différents rayonnements ionisants.

Les techniques de radiothérapie exploitent la quasi-totalité des rayonnements présentés dans le **Tableau 1**. Néanmoins, la plupart des traitements sont réalisés avec des rayons X.

b. Notion de dose

La quantité de la dose absorbée est exprimée par l'unité internationale nommée gray (Gy). Un Gy correspond au dépôt d'énergie d'un joule (J) par kilogramme de matière. Le Gy est l'unité de référence en radiothérapie. Il existe d'autres grandeurs pour mesurer l'impact d'un rayonnement ionisant sur les tissus biologiques. La dose en Gy est alors pondérée par un facteur dépendant du rayonnement (dose équivalente, H) ou par des facteurs dépendant à la fois du rayonnement et de la sensibilité du tissu irradié (dose efficace, W). Ces deux grandeurs sont

exprimées en sievert (Sv). En pratique clinique ou en science expérimentale, ces grandeurs ne sont peu voire pas utilisées. En revanche, on retrouve ces grandeurs dans un contexte de radioprotection et de prévention des risques liés aux expositions terrestres, médicales (domaine de l'imagerie) ou accidentelles.

I.2 Effets physiques, chimiques et biologiques des rayonnements ionisants

Les effets des rayonnements ionisants sur la matière biologique se répartissent dans le temps et l'espace. Se succèdent des phases physiques, chimiques et biologiques à l'échelle moléculaire, cellulaire et tissulaire.

a. Effets physico-chimiques

Par définition, les rayonnements ionisants engendrent des ionisations de la matière qu'ils traversent. Dans une cellule, les rayonnements ionisants interagissent avec les molécules d'eau qui composent entre 60 et 90% du cytosol des cellules. Ils interagissent aussi avec les macromolécules biologiques comme les protéines, les lipides et les acides nucléiques tels que l'acide désoxyribonucléique (ADN). Ces macromolécules peuvent être directement impactées par les rayonnements ionisants ou indirectement via la production de radicaux libres, autrement appelées espèces réactives. Il en résulte des conséquences fonctionnelles pour la cellule qui seront abordées dans la partie [b. Effets biologiques](#).

Les altérations directes de l'ADN et autres macromolécules sont initiées quasi instantanément lors de l'irradiation (de l'ordre de 10^{-14} à 10^{-12} secondes) (Szajek 2014). L'énergie du rayonnement est directement déposée dans les molécules, ce qui altère leur structure physico-chimique. Les altérations indirectes via les espèces réactives interviennent environ 10^{-12} à 10^{-6} secondes après irradiation. La production de radicaux libres hautement réactifs est initiée par la radiolyse de l'eau formant les espèces réactives de l'oxygène (ou ROS pour *reactive oxygen species*) et de l'azote (ou RNS pour *reactive nitrogen species*). L'énergie du rayonnement ionisant transmise à la molécule d'eau permet la création de monoxyde de dihydrogène (H_2O^+) et d'un électron aqueux (e^-_{aq}) par ionisation ou bien d'un radical hydrogène (H^\bullet) et hydroxyle ($^\bullet\text{OH}$) par excitation. Ces réactifs peuvent ensuite réagir entre eux pour former le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les électrons secondaires créés par l'irradiation ne possèdent pas l'énergie suffisante pour ioniser la matière. Ils peuvent former des électrons dits aqueux (e^-_{aq}) qui sont des électrons quasi libres entourés de molécules d'eau. Ils ne forment pas

une espèce réactive à proprement parler, mais sont capables d'interagir avec d'autres molécules pour créer des ROS, ou d'endommager directement l'ADN. Les espèces réactives induisent différents dommages aux molécules en fonction de leur réactivité. Par exemple, les radicaux libres comme l'ion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle ($\bullet OH$) sont bien plus réactifs que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) du fait de la présence d'un électron libre (noté « \bullet »). Ces espèces réactives peuvent provoquer une peroxydation des lipides, une oxydation des protéines, une altération de l'ADN nucléaire et mitochondrial ainsi qu'une inactivation de certaines enzymes (Azzam et al. 2012) (**Figure 1**).

La radiolyse de l'eau n'est pas la seule source du stress oxydant. La mitochondrie est le lieu de production énergétique de la cellule sous forme d'ATP (adénosine triphosphate) grâce à la chaîne respiratoire mitochondriale, autrement appelée chaîne de transport d'électrons. La mitochondrie possède deux membranes (membrane interne et externe) séparées par un espace intermembranaire. Les complexes protéiques constituant la chaîne respiratoire sont insérés dans la membrane interne et leur fonctionnement participe à la création d'un potentiel de membrane dans l'espace intermembranaire. Lors de son fonctionnement basal, la mitochondrie est une grande productrice de ROS, mais ces derniers restent contenus en son sein et détoxifiés par ses propres enzymes anti-oxydantes comme la *manganese superoxyde dismutase* (MnSOD). Les rayonnements ionisants affectent la mitochondrie de différentes façons. Ils peuvent induire des modifications de l'ADN mitochondrial, qui encode en partie les protéines de la chaîne respiratoire, impacter directement sa membrane ou encore la fonction des enzymes antioxydantes mitochondriales. Ces effets peuvent favoriser une désorganisation, voire une rupture, de la membrane mitochondriale, une libération de son contenu riche en ROS (Leach et al. 2001) et du gradient d'électrons contenu dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Ces électrons et ces ROS participent alors aux effets indirects en amplifiant la production d'espèces réactives qui s'ajoute à celles créées par la radiolyse de l'eau. La **Figure 1** résume les effets physico-chimiques directs et indirects des rayonnements ionisants.

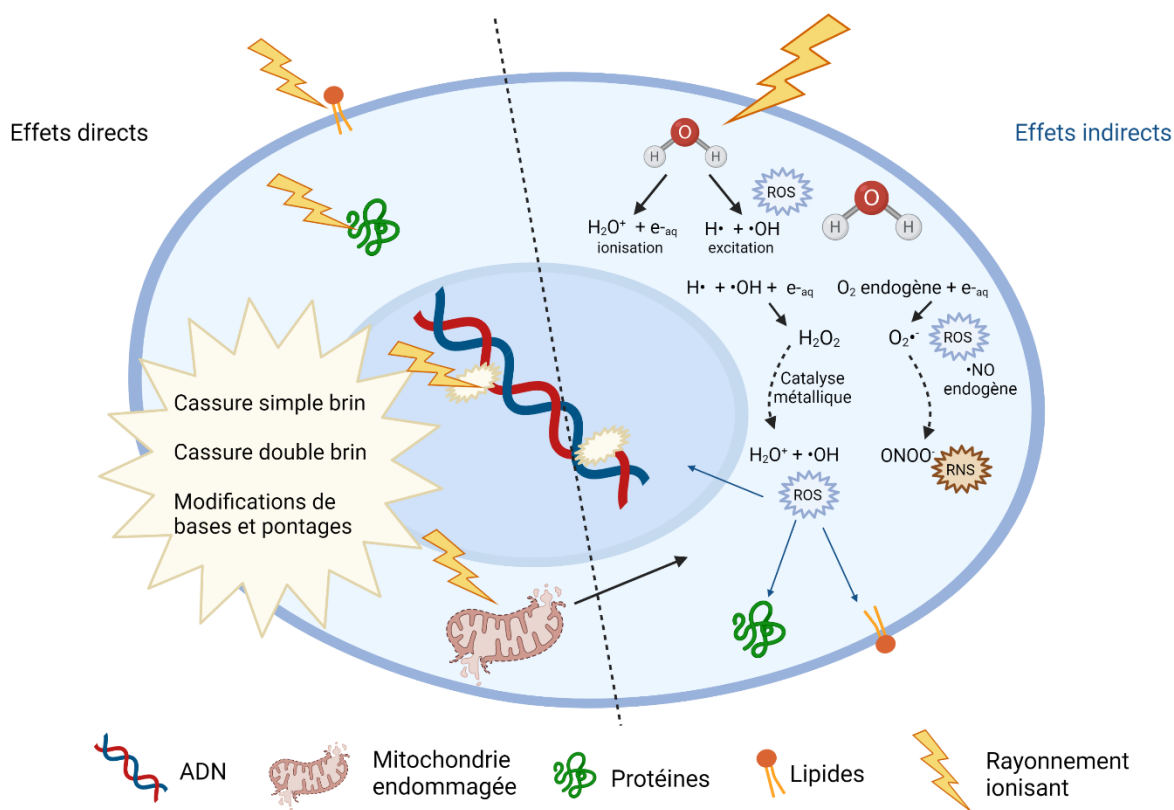


Figure 1 : Effets physico-chimiques directs et indirects engendrés par les rayonnements ionisants.
 e^-_{aq} : électron aqueux, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, $O_2^{\bullet-}$: ion superoxyde, $\bullet OH$: radical hydroxyle, H_2O^+ : monoxyde de dihydrogène, $ONOO^-$: peroxyde d'azote, H^{\bullet} : radical hydrogène, $\bullet NO$: monoxyde d'azote. ROS : reactive oxygen species, RNS : reactive nitrogen species.

Bien que les dommages à l'ADN, notamment les cassures double-brin, soient les plus délétères, chaque type de molécules directement ou indirectement modifiées par les rayonnements ionisants participe à l'induction d'un état de stress cellulaire. Ce stress peut être résolu ou non, impactant ainsi le destin de la cellule (Kim et al. 2019).

b. Effets biologiques

Les dommages moléculaires et le stress cellulaire générés par les rayonnements ionisants déterminent le destin cellulaire. Si la cellule peut gérer ce stress, elle survit et continue de proliférer. Si ce stress n'est pas résolu, la cellule peut s'engager dans une voie qui conduit à sa mort (apoptose, nécrose, mort mitotique, mort induite par les céramides) ou bien entrer en sénescence. La sénescence est un arrêt stable dans le cycle cellulaire où la cellule reste métaboliquement active. Cet état particulier est généralement associé au vieillissement cellulaire dû au raccourcissement des télomères qui a lieu à chaque division cellulaire. Ce raccourcissement entraîne une signalisation permanente des dommages à l'ADN et un arrêt

définitif du cycle cellulaire. Lors de l'irradiation, ce processus peut également se mettre en place lorsque les lésions à l'ADN, trop nombreuses ou trop complexes, ne peuvent pas être réparées.

Les processus de division cellulaire, de réplication et de réparation de l'ADN sont intimement liés. Le cycle cellulaire comporte 4 phases : la phase G_0 - G_1 , la phase S de réplication de l'ADN, la phase G_2 et la phase M qui aboutit à la séparation de la cellule en deux cellules filles. La progression dans les différentes phases du cycle cellulaire dépend d'un certain nombre de points de contrôle ou *checkpoints*, matérialisés par des couples de protéines cycline et cycline dépendant kinase (Cdk) (**Figure 2**). Ces *checkpoints* peuvent être inhibés par différentes protéines de la classe des inhibiteurs de Cdk comme p16 (ou CDKN2A), p21 (ou CDKN1A) et p27.

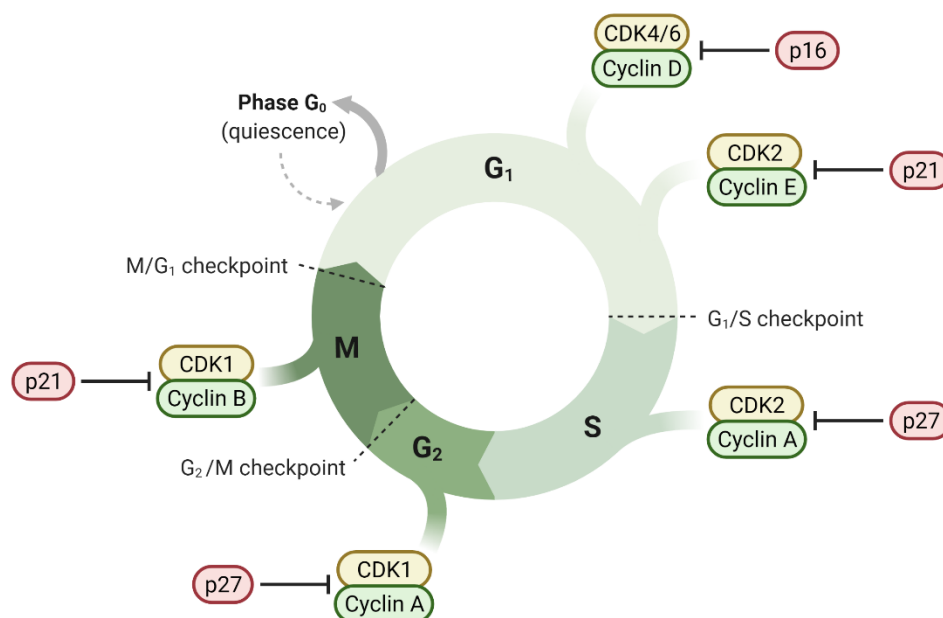


Figure 2 : Le cycle cellulaire, ses points de contrôle et inhibiteurs de points de contrôle.
Source : Biorender.

La transcription de ces protéines est régulée par des voies de signalisations actives après irradiation, liées à la réponse aux dommages à l'ADN (ou *DNA damage response*, DDR) ou à la réponse au stress oxydant (**Figure 3**).

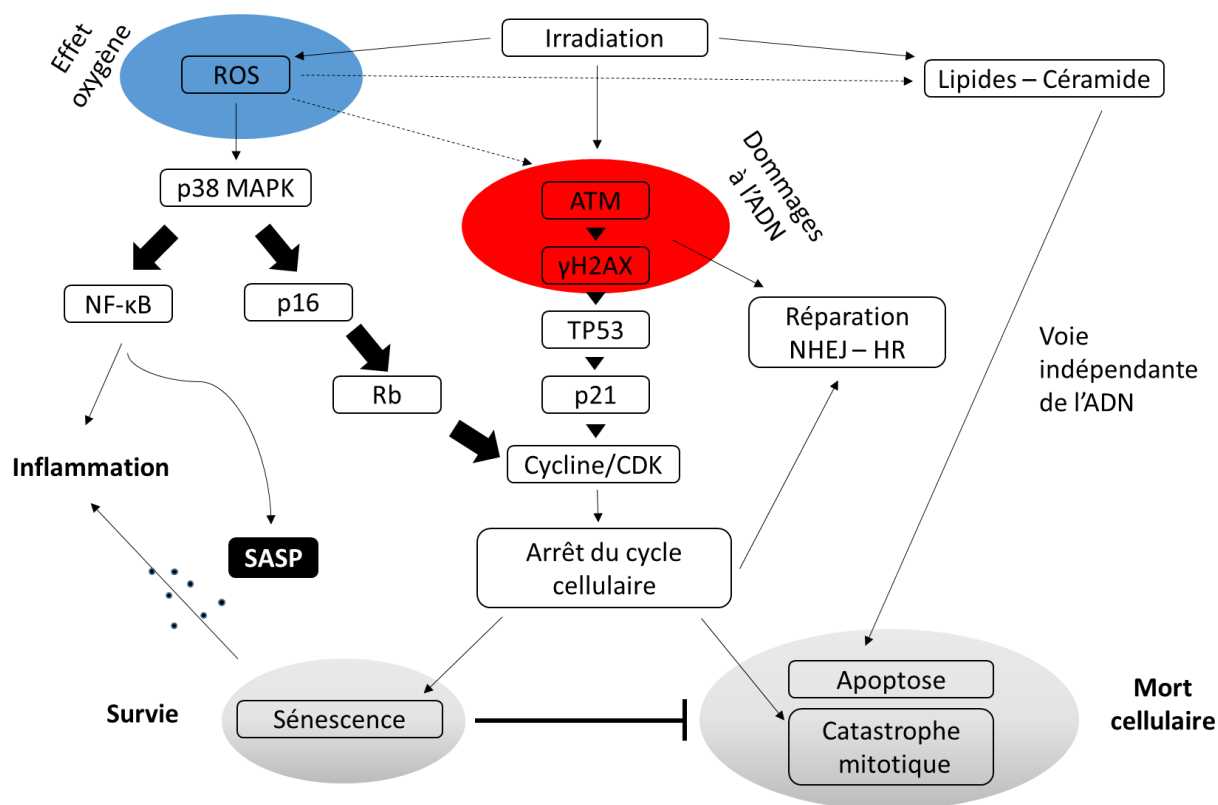


Figure 3 : Représentation schématique des voies de signalisations cellulaires principales aboutissant à la sénescence et/ou à la mort cellulaire radio-induite.
Inspiré de (Nguyen et al. 2018)

Les protéines ATM et H2AX sont deux acteurs essentiels de la DDR. La protéine sérine/thréonine kinase ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), recrutée en cas de cassures double-brin, induit la phosphorylation de l'histone H2AX aux alentours de la lésion. La forme phosphorylée de H2AX, γ H2AX, est un marqueur des cassures de l'ADN double-brin très utilisé dans les études expérimentales. Elle orchestre le recrutement des protéines de réparation de l'ADN et la signalisation sous-jacente, notamment par le suppresseur de tumeur TP53, qui mène à l'arrêt du cycle cellulaire. Dans cette voie, TP53, stabilisé en réponse aux dommages de l'ADN, induit la transcription du gène codant pour la protéine p21, qui stoppera le cycle cellulaire en inhibant les CDK. Cet arrêt du cycle est nécessaire à la réparation des lésions.

Il existe plusieurs voies de réparation de l'ADN. Les cassures double-brin sont les lésions de l'ADN les plus difficiles à réparer car elles touchent les deux brins de la double hélice. La réparation des cassures double-brin sera plus particulièrement abordée dans cette thèse. Elle fait intervenir la voie de la recombinaison homologue (*homologous recombination*, HR) ou la voie de réparation par jonction des extrémités non-homologues (*non-homologous*

end-joining, NHEJ). Le système HR est considéré comme le système de réparation le plus fidèle. Il intervient lors de la transition entre les phases S et G₂ du cycle cellulaire où l'ADN a été répliqué. Ce système utilise la chromatide sœur non endommagée comme matrice pour réparer le dommage. En revanche, le système NHEJ est considéré comme infidèle. Il ne se base pas sur une matrice pour permettre la réparation et entre en jeu tout le long du cycle cellulaire. De manière simplifiée, le NHEJ résout la cassure double-brin par ligation des extrémités de la lésion. Ce type de réparation peut induire des mutations plus ou moins invalidantes en fonction de sa localisation dans le génome (région codante ou non) (**Figure 3**). D'autres voies indépendantes de TP53 peuvent aboutir à l'expression de la protéine p16 comme la voie des MAPK (*mitogen activated protein kinase*) entre autres stimulée par le stress oxydant (**Figure 3**).

Si les lésions ne sont pas réparées ou sont mal réparées, alors la cellule peut mourir par catastrophe mitotique quand elle s'engage dans le cycle suivant, ou entrer en sénescence radio-induite. La sénescence est un état métaboliquement actif caractérisé par un phénotype sécrétoire particulier, le *senescence associated secretory phenotype* (SASP), qui participe à un état pro-inflammatoire, qui sera détaillé pour les cellules endothéliales dans le [Chapitre III](#). Le SASP est notamment stimulé par l'induction de la voie *Nuclear factor kappa beta* (NF-κB), impliquée dans l'inflammation (Ha et al. 2010). Enfin, la mort cellulaire radio-induite peut aussi se faire par une voie d'apoptose particulière induite par les céramides, ce qui sera abordé dans le [Chapitre III](#).

Les dommages macroscopiques résultant des dommages cellulaires peuvent être catégorisés en effets déterministes et stochastiques. Les effets déterministes sont les effets inévitables et attendus après une exposition aux rayonnements ionisants au-delà d'une dose seuil. Ils apparaissent d'autant plus rapidement que la dose augmente. Les effets stochastiques ont une probabilité d'apparition d'autant plus forte que la dose augmente. Cependant, leur apparition dépend de facteurs multiples comme la radiosensibilité intrinsèque des cellules touchées et, à plus grande échelle, de l'individu. Les cancers secondaires radio-induits font partie de ces effets stochastiques, notamment via le processus de transformation cellulaire. La transformation cellulaire est la première étape de la cancérogenèse. C'est un processus cellulaire qui se met en place lorsque des mutations, potentiellement radio-induites, apparaissent notamment sur un gène suppresseur de tumeur, un garde-fou de l'intégrité cellulaire (par exemple TP53 ou ATM).

L'impact des rayonnements ionisants sur le processus de prolifération cellulaire et notamment sur l'induction de la mort cellulaire explique pourquoi les effets macroscopiques d'une exposition aux rayonnements ionisants sont très rapides au niveau des tissus à fort renouvellement tels que les épithéliums (digestif, pulmonaire, cutané, etc...), les gonades et le système hématopoïétique, essentiellement regroupé dans la moelle osseuse. Le **Tableau 2** récapitule les principaux effets aigus des rayonnements ionisants sur différents compartiments de l'organisme. Les principales lésions ou syndromes pouvant entraîner une morbidité ou une mortalité lors d'une exposition aux rayonnements ionisants y sont décrits.

Effets	Organe ou tissu concerné	Signes	Délais d'apparition	Dose seuil en Gy (exposition aiguë)
Effets entraînant une morbidité				
Baisse de l'hématopoïèse	Moelle osseuse	Baisse des globules rouges	3-7 jours	0,5
Stérilité temporaire	Gonades ♀ ou ♂	Stérilité	3-9 semaines	0,1
Stérilité permanente			1 (♀) à 3 semaines (♂)	3 (♀) - 6 (♂)
Dépilation temporaire	Peau	Alopécie	2-3 semaines	4
Atteinte cutanée modérée		Erythème, desquamation	1-4 semaines	3-6
Atteinte cutanée sévère		Nécrose, ulcération	2-3 semaines	5-10
Atteinte pulmonaire aiguë	Poumon	Toux, dyspnée, douleurs thoraciques, insuffisance respiratoire	1-3 mois	6-7
Effets entraînant une mortalité certaine sans intervention médicale				
Syndrome hématopoïétique	Moelle osseuse	Aplasie, risque important d'infection et d'hémorragie	30-60 Jours	1
Syndrome gastro-intestinal (SGI)	Tractus gastro-intestinal	Diarrhées, crampes abdominales, hémorragie, septicémie	6-9 jours	6
Atteinte pulmonaire	Poumon	Toux, dyspnée, douleurs thoraciques, insuffisance respiratoire	1-7 mois	7-8
Atteinte neuro-vasculaire	SNC	Désorientation temporo spatiale, ataxie, convulsion, coma	1-2 jours	50

Tableau 2 : Description générale des effets stochastiques engendrés par une exposition aiguë aux rayonnements ionisants. Dose seuil, délais d'apparition, principaux effets et risques à court et long terme. D'après (IRSN 2006; UNSCEAR 2012).

I.3 Usage de la radiothérapie

La radiothérapie est un traitement efficace délivré à plus de 50% des patients atteints de cancer dans les pays développés. Par exemple, en France, il y a eu 382 000 nouveaux cas de cancer en 2018 dont 216 400 traités par radiothérapie, ce qui représente 56% des patients (INCa 2019). La radiothérapie peut être délivrée seule ou en association avec d'autres traitements tels que la chirurgie, la chimiothérapie ou les thérapies ciblées. Elle est le plus souvent délivrée par une source externe de rayonnements ionisants.

a. Principe de la radiothérapie

La radiothérapie est un traitement locorégional des cancers à base de rayonnements ionisants dont le but est d'induire la mort ou l'arrêt de la prolifération des cellules tumorales et de perturber, voire éliminer, le microenvironnement tumoral qui favorise le développement de la tumeur. Du fait que la radiothérapie est le plus souvent délivrée par une source externe à l'organisme, la planification du traitement doit prendre en compte l'irradiation des tissus sains non cancéreux, dits organes à risques (OAR), aux alentours de la tumeur. Ainsi, l'enjeu de la radiothérapie est de permettre un contrôle tumoral efficace tout en limitant les effets délétères sur les tissus sains, qui sont la principale limite de l'escalade de dose et de l'efficacité thérapeutique. Le traitement doit utiliser un protocole dans lequel la dose d'irradiation se situera dans une fenêtre thérapeutique où l'effet sur la tumeur sera optimal en prenant en compte la probabilité d'apparition d'effets délétères sur les tissus sains (**Figure 4**).

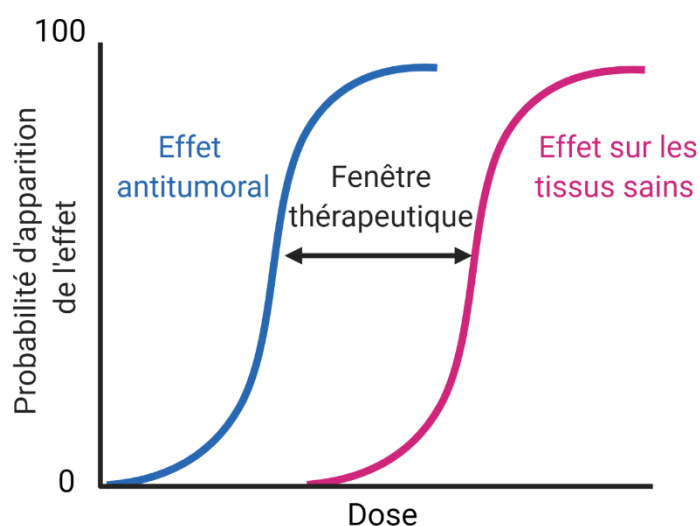


Figure 4 : Notion de fenêtre thérapeutique.
D'après (De Ruyscher et al. 2019).

b. Protocoles, fractionnement et étalement

Les protocoles de radiothérapie sont définis en fonction des caractéristiques de la tumeur (histologie, localisation, taille, degré d'invasion et grade) et de l'organe touché. La dose totale délivrée en radiothérapie n'est pas le seul paramètre à prendre en compte. La dose est en effet le plus souvent fractionnée, c'est-à-dire délivrée en plusieurs séances avec une dose par fraction, un nombre de fractions, une fréquence et un étalement précis. Le schéma classique des protocoles dits normofractionnés consiste en la délivrance de fractions de 1,8 à 2 Gy, tous les jours du lundi au vendredi sur une durée de 5 à 8 semaines.

Plus récemment, avec l'émergence de techniques comme la radiothérapie stéréotaxique permettant de limiter le volume de tissu irradié (voir le paragraphe **d. Techniques de radiothérapie**), les protocoles d'hypofractionnement sont de plus en plus fréquemment utilisés. L'hypofractionnement peut être modéré (fraction supérieure à 2-4 Gy) ou sévère (fraction allant jusqu'à 15 à 20 Gy, et parfois 30 Gy), ce qui a aussi pour avantage de réduire le nombre de séances et la durée du traitement (Sebastian et al. 2018; Zaorsky et al. 2016).

c. Les 6 R de la radiothérapie

Le schéma de traitement en fractions a été initialement mis en place pour augmenter la réponse de la tumeur et protéger les tissus sains. Ces deux types de tissus ne réagissent pas de la même manière aux rayonnements ionisants. La base de ce différentiel tient en 5 notions, les 5 R de la radiothérapie, introduits en 1975 (Withers 1975, Steel 1989). Un sixième R relatif à la réponse immunitaire au sein de la tumeur a été ajouté récemment (Boustani et al. 2019). Ces 6 notions sont brièvement présentées ci-dessous :

- **Réparation des dommages à l'ADN dans les cellules normales et tumorales**

Les capacités de réparation des dommages à l'ADN sont souvent altérées dans les cellules tumorales, ce qui n'est pas le cas pour les cellules normales. En effet, les cellules tumorales présentent fréquemment des altérations au sein des gènes codants pour des acteurs protéiques de la réparation cellulaire. Le fait de fractionner la dose permet donc aux cellules normales de réparer les dommages sublétaux occasionnés par l'irradiation, contrairement aux cellules tumorales qui n'y parviennent pas.

- **Ré-oxygénation**

Comme abordé précédemment, un des effets majeurs de l'irradiation est la production de radicaux libres par la radiolyse de l'eau. Cet effet oxygène est responsable des lésions indirectes à l'ADN. Une des caractéristiques de certaines tumeurs est la présence de zones hypoxiques les rendant radiorésistantes du fait qu'elles ne contiennent pas d'oxygène. Cette hypoxie s'explique par une faible disponibilité en oxygène due à une vascularisation anarchique et dysfonctionnelle des tumeurs, notamment au centre de la tumeur. Lors de l'irradiation, les cellules en normoxie au niveau de la périphérie de la tumeur meurent. Cette mort permet une diminution du volume tumoral et une angiogenèse réactionnelle provoquant la réoxygénation de la tumeur, ce qui restaure la radiosensibilité des cellules tumorales entre les fractions d'irradiation.

- **Repopulation ou régénération des cellules saines et tumorales entre les fractions**

La repopulation ou régénération désigne la capacité de prolifération en réaction à un dommage ayant entraîné des pertes cellulaires. Les rayonnements ionisants induisent une perte cellulaire, compensée par le tissu normal ou tumoral en activant des processus de régénération. Plusieurs facteurs entrent en compte : la sécrétion de facteurs de croissance et la stimulation de compartiments souches supportée par la réoxygénation des tissus favorisant la régénération. Ce processus concerne les tissus sains, mais aussi la tumeur qui peut présenter des cellules avec des propriétés de cellules souches permettant la repopulation tumorale. D'un point de vue clinique, cet aspect a son importance concernant la durée de la radiothérapie. En effet, le temps de traitement choisi doit pouvoir laisser suffisamment de temps pour que les tissus sains se régénèrent, mais pas trop pour que la tumeur réponde toujours à l'irradiation.

- **Redistribution des cellules tumorales dans les phases du cycle cellulaire**

Au sein d'une tumeur, les cellules ne prolifèrent pas de manière synchrone, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas dans la même phase du cycle cellulaire. C'est une notion déterminante pour la sensibilité à l'irradiation. Une cellule est très radiosensible lorsque la réparation la plus fidèle de l'ADN est limitée, notamment en phase G_1 /début de phase S. Lors de l'irradiation, les cellules en phase radiosensible sont les plus susceptibles de mourir laissant une fraction de cellules tumorales survivantes. Cette fraction survivante va ensuite progresser dans le cycle et se synchroniser partiellement ce qui laisse une fenêtre de sensibilité lors de la prochaine irradiation. Cependant, cette synchronisation ne perdure pas dans le temps. En ce qui concerne

les tissus sains, ce facteur joue de façon importante pour les tissus à fort renouvellement, ce qui contribue aux toxicités précoces de la radiothérapie.

- **Radiosensibilité intrinsèque**

La radiosensibilité correspond empiriquement à la vitesse de décroissance tumorale après irradiation. Ce paramètre est dépendant du type de tumeur ou de tissu sain. Ce facteur peut influencer sur l'efficacité de la radiothérapie et sur la sévérité des dommages aux tissus sains.

- **Réactivation du système immunitaire**

Le but premier de la radiothérapie est d'induire la mort cellulaire tumorale. Depuis quelques années, il devient de plus en plus évident que l'irradiation impacte également les cellules du microenvironnement tumoral qui comprend certains types de cellules immunitaires. Au sein des tumeurs, il y a un équilibre entre les cellules immunitaires stimulant la réponse immunitaire (immunostimulatrices) et les cellules immunitaires inhibant cette réponse (immunosuppressives). Cet équilibre est souvent déplacé vers les cellules aux propriétés immunosuppressives, ce qui participe à la progression tumorale. Les rayonnements ionisants ont la capacité de modifier l'équilibre immunitaire (Boustani et al. 2019). La mort cellulaire radio-induite permet notamment la libération d'antigènes tumoraux pouvant être présentés aux lymphocytes T, ce qui entraîne leur activation. On parle alors de mort immunogène. Cette notion sera abordée dans le prochain chapitre. Enfin, les rayonnements ionisants peuvent eux-mêmes modifier le phénotype des cellules immunitaires déjà infiltrées et favoriser un phénotype anti- ou pro-inflammatoire.

d. Techniques de radiothérapie

En 2009, l'Institut national du cancer (INCA) estimait que la radiothérapie externe représentait 93% des actes réalisés (Inca 2011). Les autres actes de radiothérapie sont délivrés par curiethérapie, qui nécessite de placer la source chirurgicalement au foyer de la tumeur, ou encore concerne la radiothérapie intra-opératoire et la radio-immunothérapie (ou radiothérapie vectorisée).

Il existe différents types d'appareils de radiothérapie, un domaine innovant en perpétuelle amélioration, notamment au niveau balistique. Cette innovation est nécessaire afin de garantir le meilleur ciblage de la tumeur et une atteinte minimale des organes sains environnants. Les appareils de radiothérapie sont pour la plupart des accélérateurs linéaires de

particules (ou *linear accelerator*, LINAC). Ils sont constitués d'un tube à rayon X suivi d'une section accélératrice d'électrons permettant la production de rayons X par interaction sur une cible de conversion par rayonnement de freinage. La radiothérapie est toujours précédée d'une imagerie de la tumeur à traiter par scanner ou imagerie par résonance magnétique (IRM), ce qui permet au radiothérapeute et au physicien médical d'établir un plan de traitement à l'aide d'un logiciel de calcul de plan de traitement (ou *Treatment planning system*, TPS). Il s'agira ainsi de définir les volumes à traiter, les volumes à protéger, la balistique et la répartition prévisionnelle de la dose par dosimétrie.

Les principales techniques de radiothérapie externe actuellement ainsi que les techniques moins conventionnelles et certaines innovations à fort potentiel sont présentées ci-après.

La radiothérapie conformationnelle en trois dimensions ou 3D-CRT

La radiothérapie conformationnelle en trois dimensions (3D-CRT) était la technique la plus utilisée en France jusque dans les années 2010-2015, supplantée aujourd'hui par l'IMRT (*Intensity modulated radiation therapy*). Cette technique utilise des images de la tumeur et des organes alentour obtenues par scanner afin d'adapter la forme des faisceaux d'irradiation au plus proche de la tumeur via des outils de simulation. Au cours du traitement par 3D-CRT, le faisceau provenant d'un collimateur multi-lames est fixe et la dose est homogène dans le champ de traitement. On parle de 4D-CRT lorsque les mouvements respiratoires sont pris en compte lors de l'irradiation, par exemple lors du traitement de cancers pulmonaires.

La radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité ou IMRT

L'IMRT est une technique utilisée en France depuis le début des années 2000. Contrairement à la 3D-CRT, le bras du collimateur multi-lames est mobile autour du patient et les lames peuvent bouger afin de moduler l'intensité du faisceau d'irradiation au cours du tir. Ainsi, les tumeurs à formes complexes sont mieux ciblées et cela apporte une protection supplémentaire pour les OAR. Il existe deux types d'IMRT : l'arthérapie volumétrique modulée (VMAT[®], RapidArc[®]) et la radiothérapie hélicoïdale (TomotherapyTM[®] ou RadixactTM[®]) (ICRU 2016). La VMAT utilise une tête d'irradiation couplée à un bras en rotation autour du patient permettant une délivrance du traitement sur un arc complet de 360°. La tomothérapie couple rotation de la tête d'irradiation et déplacement de la table sur laquelle repose le patient durant l'irradiation. Cette technique permet la délivrance du traitement coupe par coupe. Ces techniques sont associées à une imagerie scanner à chaque séance apportant une

précision du traitement. Ces techniques permettent une conformation importante à la tumeur et donc une personnalisation du traitement, mais elles n'empêchent pas l'irradiation d'un volume de tissu sain, qui reste cependant moins important comparé à la 3D-CRT (**Figure 5**).

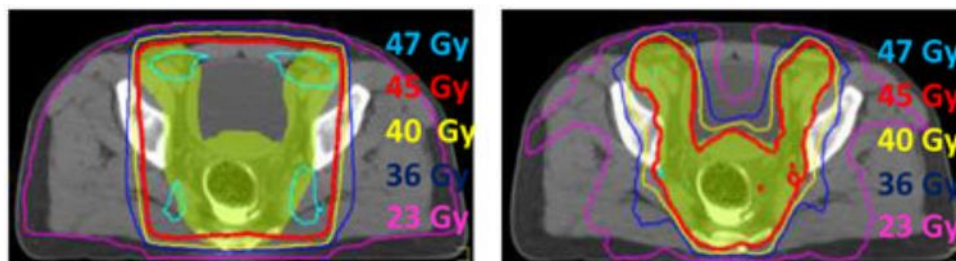


Figure 5 : Comparaison entre la 3D-CRT et l'IMRT.

Traitement d'un cancer anal. Le volume cible inclut l'anus, le rectum, les ganglions lymphatiques dans le mésorectum, les zones iliaques et inguinales. L'avantage de l'IMRT (à droite) comparé à la 3D-CRT (à gauche) est particulièrement visible au niveau de la courbe isodose 45 Gy (en rouge), mieux adaptée au volume tumoral ce qui préserve les tissus non tumoraux. Image reproduite de (Liauw et al. 2013).

La radiothérapie stéréotaxique ou SBRT

La radiothérapie stéréotaxique est une technique moins largement utilisée que les deux techniques précédentes dans le domaine du traitement antitumoral du fait d'un plus petit nombre d'installations disponibles. Cette technique a d'abord été utilisée en radiochirurgie, principalement au niveau cérébral (stéréotaxie intracrânienne). Elle utilise des faisceaux d'une précision submillimétrique permettant de réséquer de petites tumeurs difficiles d'accès ou des anomalies artério-veineuses au niveau du cerveau. Aujourd'hui, le traitement par stéréotaxie est indiqué pour certains cancers du poumon de stade précoce, des cancers de la prostate ou des métastases dans diverses localisations. Cette technique est commercialisée sous le nom de GammaKnife® ou encore CyberKnife® pour la version robotisée avec la particularité de pouvoir combiner une table pour le patient ainsi qu'un bras mobile, et de tirer avec des faisceaux multiples non coplanaires. Un asservissement des mouvements respiratoires du patient est également possible comme avec les techniques précédentes.

Du fait de sa précision, un des avantages de cette technique est de pouvoir augmenter la dose par fractions (> 2 Gy par fractions en clinique) sur de très petits volumes. Cela permet ainsi un contrôle tumoral efficace, meilleur que la radiothérapie conventionnelle, et une protection des OAR plus importante (Nyman et al. 2016). La SBRT a ouvert un champ de possibilités en termes de protocoles d'hypofractionnement, mais cela tend à changer les dogmes en radiobiologie, notamment pour ce qui concerne les 6 R.

La radiothérapie guidée par IRM

L'imagerie est un point critique dans l'établissement du TPS. Elle est un des garants de la protection des tissus sains et du bon ciblage de la tumeur. Le couplage d'un LINAC avec une imagerie à résonance magnétique (IRM) permet d'obtenir une résolution bien supérieure au scanner. Elle permet également d'éviter les irradiations supplémentaires, bien qu'apportant peu de dose additionnelle, dues aux imageries à base de rayons X (de l'ordre de 10 à 100 mGy) (Pollard et al. 2017). Dans le parc actuel d'appareils de radiothérapie en France, il existe quelques appareils de ce type en service à Marseille, Dijon, Montpellier, Lyon et Paris.

Usage des différentes techniques de radiothérapie

Il est difficile de trouver des chiffres récents sur le pourcentage de traitements réalisés par une technique plutôt qu'une autre. Les derniers chiffres officiels datent de 2011 (Inca 2011) et ne représentent pas la répartition actuelle des traitements (3D-CRT, IMRT, stéréotaxie). Cependant on peut s'appuyer sur le pourcentage de l'utilisation de telle ou telle technique dans les centres de radiothérapie pour illustrer l'évolution des pratiques de radiothérapie en France. En 2018, la RCMi était utilisée dans 97 % des centres et les irradiations stéréotaxiques intra- ou extra-crâniennes ont été pratiquées par respectivement 54% et 47% des centres en 2018 (Inca 2020). Ce rapport reflète l'évolution des pratiques vers des techniques plus précises comme la VMAT, ou encore la SBRT.

e. L'hadronthérapie

Si la majorité de traitements utilise les rayons X, certaines techniques comme la protonthérapie et la carbonothérapie utilisent des rayonnements corpusculaires (**Tableau 1**). Le dépôt de la dose engendrée par ces particules suit un profil caractérisé par un pic de Bragg (**Figure 6**), ce qui les rend intéressantes pour certaines indications de cancer. La dose n'est pas déposée de manière homogène dans la matière : le maximum de dépôt de dose est atteint dans une zone spatialement réduite (pic de Bragg) avec une décroissance de dose très rapide après le pic. Cela permet de mieux protéger les tissus en dehors du volume cible. Ces particules ont une pénétration limitée dans la matière ce qui a pour avantage d'éviter l'irradiation des tissus en aval de la zone tumorale. Cependant cette caractéristique limite aussi leur utilisation pour quelques indications tumorales, peu profondes.

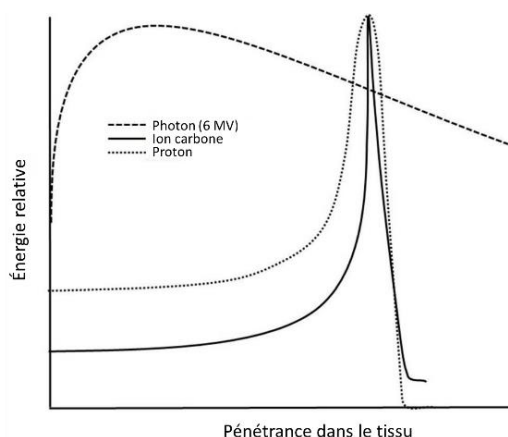


Figure 6 : Comparaison du profil de dépôt de dose entre des photons à 6 MV, des protons et des ions carbone.
D'après (Malouff et al. 2020).

La protonthérapie

La protonthérapie utilise des faisceaux de protons accélérés. Cette technique est indiquée essentiellement pour des tumeurs cérébrales et oculaires. Parmi ces tumeurs, on retrouve une majorité de cancers pédiatriques afin de minimiser les atteintes pouvant entraîner des troubles sévères du développement neurocognitif (Pellizzon 2017). La **Figure 7** montre l'intérêt de la protonthérapie en comparaison à l'IMRT pour minimiser la dose en dehors du volume cible. En France, il existe trois centres de protonthérapie à Nice (Centre Lacassagne), Orsay (Centre de protonthérapie de l'Institut Curie) et Caen (Centre François Baclesse).

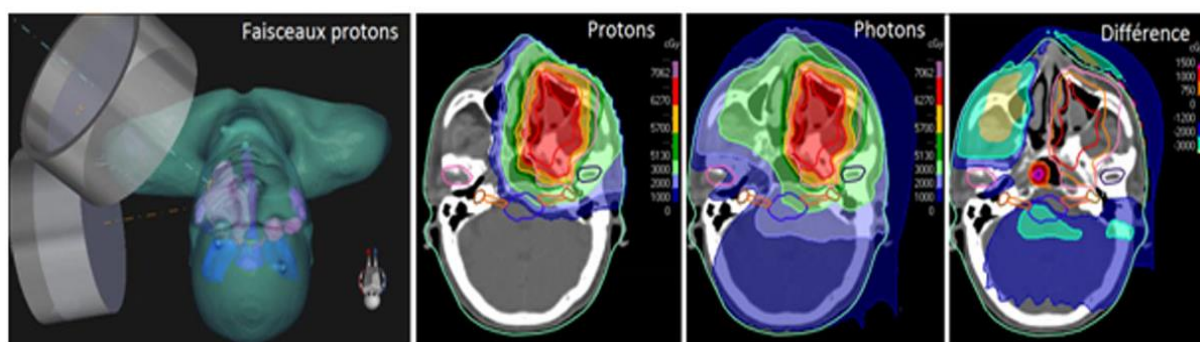


Figure 7 : Comparaison IMRT et protonthérapie.
Carcinome adénoïde kystique traité par radiothérapie, faisceaux de traitements (image de gauche) et planimétrie comparée montrant les différences entre un traitement à base de photons (IMRT) et de protons (protonthérapie en modulation d'intensité). Mise en évidence de l'excès de dose périphérique en photons. Tirée de (CentreFrançoisBaclesse).

L'irradiation aux ions carbonés ou CIRT

Les ions lourds comme le carbone peuvent être utilisés en radiothérapie. Comparés aux protons, les ions carbone possèdent une efficacité biologique relative (EBR) bien supérieure aux rayons X. L'EBR est un rapport de doses permettant de comparer l'effet biologique d'un rayonnement d'intérêt par rapport à un rayonnement de référence (Cobalt 60 ou X à 200-220 kV). Pour les ions carbone, l'EBR est estimée entre 2,5 et 5 (Malouff et al. 2020). Comme pour les protons, les ions carbone ont un profil de dose comportant un pic de Bragg. Cette modalité d'irradiation est donc intéressante pour le traitement des tumeurs et la préservation des OAR. Il existe quelques centres de traitement de carbonothérapie (ou *carbon ions radiation therapy*, CIRT) dans le monde, notamment au Japon, aux USA, en Italie, en Allemagne et en Autriche. Ils permettent de traiter des tumeurs tête et cou, du système nerveux central, de la base du crâne, mais aussi des tumeurs gastro-intestinales, de la prostate et des sarcomes (Malouff et al. 2020). Cependant, cette thérapie demande des infrastructures lourdes et très coûteuses. L'irradiation thérapeutique par des ions carbone en France n'est pas d'actualité. En revanche, le centre du GANIL (Grand Accélérateur National d'Ions Lourds) de Caen permet des activités de recherche dans ce domaine.

f. La radiothérapie Flash, une technique à fort potentiel

Cette technique consiste en l'utilisation de rayonnements ionisants délivrés à ultra haut débit de dose (plus de 40 Gy/s contre 0.04 Gy/s en radiothérapie conventionnelle) et à très forte dose en une fraction unique. Cette technique est essentiellement expérimentale. Pour l'instant, les appareils ne permettent pas de déposer la dose en profondeur, ce qui limite les indications. Un seul patient a été traité par radiothérapie FLASH, il y a 4 ans (Bourhis et al. 2019) : un homme de 75 ans présentant un lymphome cutané étendu résistant aux thérapies classiques. Plusieurs études suggèrent que la radiothérapie FLASH induit un contrôle tumoral au moins aussi efficace que la radiothérapie conventionnelle tout en préservant les tissus sains aux alentours (Bourhis et al. 2019; Favaudon et al. 2014; Montay-Gruel et al. 2017). Les causes de cet effet différentiel ne sont pas connues. Il est possible que cette réponse réside dans une différence dans le type de lésions à l'ADN induite par une irradiation FLASH. Une autre théorie est que, étant donné la rapidité de délivrance de la dose et le fait qu'elle soit délivrée en dose unique, celle-ci induirait une consommation d'oxygène instantanée dans la matière et une conversion en peroxyde d'hydrogène très rapide. L'effet différentiel entre cellules normales et tumorales résiderait dans la capacité plus élevée des cellules normales à détoxifier le peroxyde

d'hydrogène (Lin et al. 2021). Enfin, Jin et al. théorisent que l'irradiation en conditions FLASH empêche la déplétion des cellules immunitaires circulantes, contrairement à l'irradiation conventionnelle, ce qui favoriserait le contrôle tumoral et limiterait les toxicités aux tissus sains (J. Y. Jin et al. 2020).

g. Conclusions

Les nouvelles techniques de radiothérapie constituent une avancée majeure dans la prise en charge des patients afin de mieux cibler la tumeur, mais également de protéger les OAR, source d'effets secondaires. L'utilisation croissante des techniques de stéréotaxie et le développement de la radiothérapie FLASH mènent à penser que les protocoles d'hypofractionnement seront davantage utilisés à l'avenir. L'hypofractionnement permet de délivrer des doses plus fortes en un nombre plus réduit de fractions. Cela favorise également une meilleure fluidité de l'utilisation des plateformes d'irradiation en diminuant le temps d'occupation par patient, et apporte du confort au patient en limitant le nombre de séances de traitement. Ces techniques d'hypofractionnement ont une pratique clinique jeune pour la SBRT ou inexistante pour le FLASH. Les schémas de fractionnement (nombres de fractions et doses par fractions) utilisés sont en constante évolution et ne font pas encore l'objet d'un consensus clinique. Si ces techniques semblent offrir un bon contrôle tumoral et une diminution des toxicités aux OAR, les mécanismes radiobiologiques sous-jacents sont encore méconnus et requièrent de plus amples investigations.

I.4 Effets secondaires de la radiothérapie

La radiothérapie peut engendrer des effets secondaires. Un volume de tissu sain non cancéreux est inévitablement touché lors du traitement de la tumeur malgré les avancées techniques des machines qui permettent une réduction de ce volume. Si l'efficacité antitumorale augmente avec la dose d'irradiation, l'atteinte des tissus sains également (**Figure 4**). Les conséquences de l'irradiation des tissus sains constituent la principale limite de l'escalade de dose en radiothérapie et donc de l'efficacité thérapeutique.

Cette atteinte des tissus sains peut engendrer des toxicités variées, aiguës et tardives. La quasi-totalité des patients présente des atteintes aiguës durant et à la fin des sessions de radiothérapie, mais elles disparaissent avec le temps. Les effets tardifs, en revanche, apparaissent des mois, voire des années après le traitement et peuvent altérer la qualité de vie des patients de façon durable. La partie suivante a pour but de récapituler de manière générale

et non exhaustive les complications observées après radiothérapie selon les principales localisations anatomiques ainsi que les prises en charge des complications tardives de la radiothérapie.

a. Effets aigus

Les effets aigus de la radiothérapie sont majoritairement dus à l'atteinte de la capacité proliférative des tissus touchés par l'irradiation. Comme discuté précédemment, les épithéliums sont les plus sensibles et subissent des dommages d'autant plus importants que le volume irradié et la dose délivrée sont grands. Il existe aussi une part de radiosensibilité individuelle qu'il est difficile de prévoir. De manière générale, les symptômes les plus fréquents sont la fatigue, l'anémie, la nausée, le manque d'appétit et des atteintes cutanées plus ou moins sévères (Inca 2008).

Il existe des spécificités selon les localisations anatomiques. En voici quelques exemples par zone :

- Cérébrale : hypertension intracrânienne.
- ORL : radiomucite aiguë, œdème laryngé, altération ou perte du goût, sécheresse buccale.
- Pulmonaire : pneumopathie aiguë radique.
- Pelvienne : nausées, vomissements, diarrhées, crampes intestinales, poussées hémorroïdaires, cystite.

La prise en charge de ces complications est uniquement symptomatique, par prise de médicaments (anti-émétiques, antalgiques, anti-inflammatoires, corticoïdes, antibiotiques) ou par une adaptation de l'hygiène de vie (par exemple par le maintien d'apports nutritionnels suffisants).

b. Effets tardifs

Il est souvent mentionné dans les publications que les complications tardives concernent 5 à 10 %, et parfois jusqu'à 20%, des patients traités par radiothérapie. Ce chiffre est en réalité difficile à évaluer et non généralisable, car les complications sont dépendantes du protocole, de la technique d'irradiation ou encore de la localisation de la tumeur traitée. Il est possible que ces chiffres soient sous-estimés du fait du temps de latence entre les séances de traitements et l'apparition des symptômes, qui se compte parfois en dizaines d'années. Les patients atteints de séquelles tardives aujourd'hui ont été traités plusieurs années auparavant par des techniques

qui sont moins utilisées aujourd'hui (notamment la 3D-CRT). Du fait de l'évolution des techniques et d'une meilleure survie des patients atteints de cancer, il est difficile de prévoir la proportion de patients qui développeront des effets secondaires dans le futur.

La fibrose radio-induite est l'effet secondaire tardif le plus délétère et le plus étudié. Cette pathologie peut toucher un grand nombre d'organes comme la peau, les poumons, le tractus gastro-intestinal ou uro-génital et plus généralement tout organe situé dans le champ de l'irradiation au cours de la radiothérapie. La fibrose est définie comme un phénomène de cicatrisation imparfait et incomplet qui apparaît lorsqu'un dommage est trop sévère ou répété. Son installation est intimement liée à un environnement cellulaire et moléculaire inflammatoire chronique qui favorise la transdifférenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Une des caractéristiques de la fibrose est notamment le remplacement de cellules fonctionnelles endommagées par un dépôt excessif de fibres de collagène et d'autres composants de la matrice extracellulaire (MEC) sécrétés par les myofibroblastes. Ce remplacement des cellules fonctionnelles par un tissu fibreux induit une diminution de la plasticité de l'organe concerné et impacte profondément sa fonction jusqu'à une potentielle défaillance. La nécrose radio-induite est une autre séquelle tardive de la radiothérapie.

La nécrose est une forme de mort cellulaire anarchique, source d'inflammation. Elle apparaît dans les tissus à renouvellement lent comme les tissus nerveux (radionécrose cérébrale) et osseux (ostéoradionécrose).

Ces effets secondaires apparaissent après un temps de latence plus ou moins variable et sont la résultante de mécanismes complexes générés par l'irradiation. L'ensemble des mécanismes aboutissant au développement de ces séquelles est encore insuffisamment connu. Trois grands mécanismes participent au développement des toxicités tardives de la radiothérapie : le stress oxydatif, la réponse inflammatoire et la cicatrisation (**Figure 8**). Ces mécanismes se mettent en place dès l'irradiation. Leur persistance dans le temps et leur dérégulation favorisent la fibrose.

- **Le stress oxydatif chronique**

La production de ROS et de RNS est une réponse quasi instantanée après une exposition aux rayonnements ionisants. La cellule possède des moyens de réguler ce stress oxydant par des systèmes antioxydants. Par exemple, la superoxyde dismutase (SOD) catalyse la conversion de l'ion superoxyde en H₂O₂ dont le pouvoir oxydant est plus faible qu'un radical libre. Cependant, lorsque le déséquilibre est trop important, ces systèmes ne sont pas suffisants et

favorisent la persistance de ce stress (Zhao et al. 2007). Le stress oxydatif est intimement connecté à l'inflammation et la fibrose car un certain nombre de cellules immunitaires utilisent les ROS pour leur fonction de nettoyage des lésions ou phagocytaire. D'autre part, les ROS sont capables d'induire la transcription de gènes codants pour des protéines pro-fibrosantes comme le TGF- β (Vujaskovic et al. 2001). Au niveau cellulaire, la forte production de ROS induit également une consommation de l'oxygène très importante et favorise un état d'hypoxie. L'hypoxie stimule notamment la stabilisation du facteur de transcription HIF (*Hypoxia inducible factor*) qui joue un rôle dans la fibrose.

- **La réponse inflammatoire chronique**

La réponse inflammatoire après un dommage radio-induit est stimulée par différents mécanismes tels que les dommages à l'ADN, la production de ROS et la mort cellulaire. Ces réponses peuvent persister longtemps après irradiation et favorisent la production de molécules pro-inflammatoires, ce qui est illustré par leur présence au niveau systémique longtemps après irradiation (Rubin et al. 1995). La réponse inflammatoire chronique s'illustre également par la persistance de l'accumulation de cellules immunitaires dans le tissu lésé comme les neutrophiles, les mastocytes et/ou les macrophages. Ce point sera détaillé dans le **Chapitre II**.

- **La persistance du phénomène pathologique de cicatrisation/remodelage**

Le processus fibrotique est favorisé par le stress oxydatif chronique et la réponse inflammatoire, notamment car les deux phénomènes activent le TGF- β (Liu and Desai 2015). Le TGF- β joue un rôle central dans l'établissement de la fibrose. Il a des actions sur la production de ROS (Liu and Desai 2015), l'induction de signaux anti-inflammatoires pro-fibrosants et promeut la transition phénotypique fibroblaste – myofibroblaste.

D'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales et les cellules épithéliales peuvent aussi alimenter le pool de myofibroblastes sécréteurs de MEC par la transition endothélium-mésenchyme (ou *Endothelial-mesenchymal transition*, EndoMT) ou la transition épithélium-mésenchyme (ou *Epithelial-mesenchymal transition*, EMT).

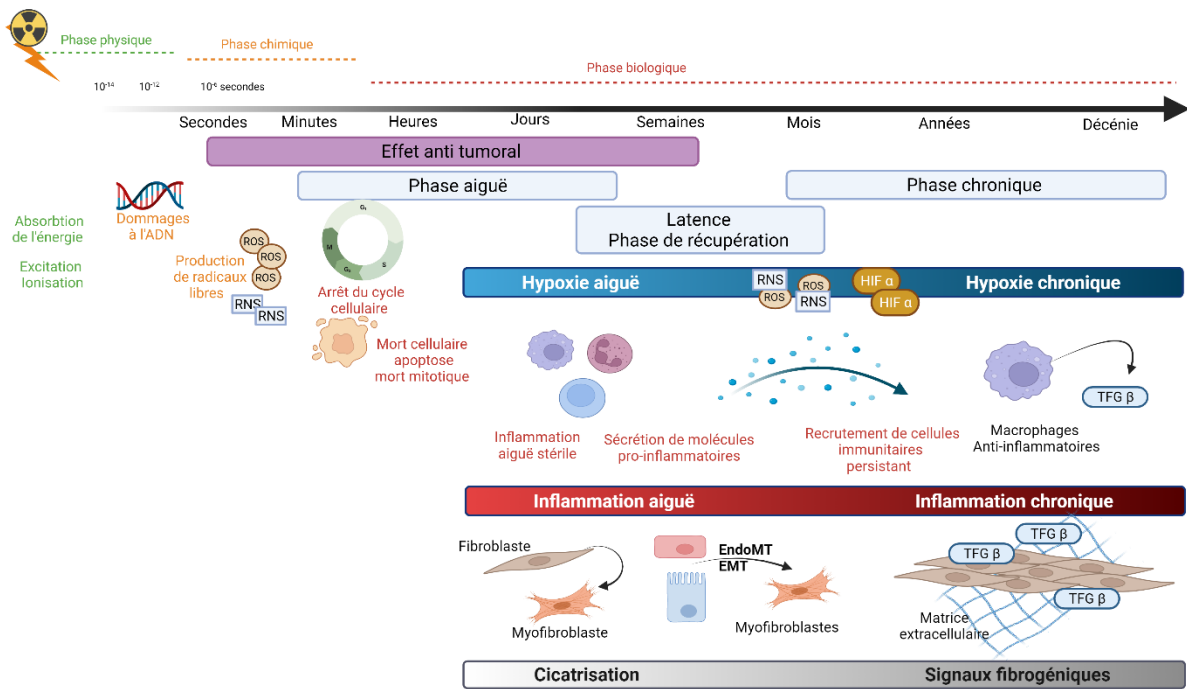


Figure 8 : Continuum d'évènements aboutissant aux complications tardives de la radiothérapie. Inspiré de (Montay-Gruel et al. 2019).

Les pathologies radio-induites tardives sont la conséquence de réponses complexes impliquées dans différents mécanismes plus ou moins interdépendants comme le stress oxydant et l'hypoxie, l'inflammation, et les signaux fibrogéniques. L'apparition de ces complications est dépendante de la dose et du volume de tissu irradié, mais de nombreux facteurs comme l'âge, le sexe, les autres traitements et d'éventuelles comorbidités peuvent influencer le développement de ces lésions. La protection des tissus sains est un enjeu de taille pour augmenter le taux de guérison des patients atteints de cancer et améliorer leur qualité de vie. La recherche en radiobiologie a un rôle central pour le développement de thérapies permettant de prévenir ou guérir les complications radio-induites.

c. Prise en charge des complications tardives de la radiothérapie

Il n'existe pas de solutions thérapeutiques durables et curatives. Seuls les symptômes sont pris en charge et pas toujours de manière efficace. La **Figure 9** résume les principaux moyens actuellement disponibles et mis en place en clinique pour gérer les complications tardives selon les organes touchés.

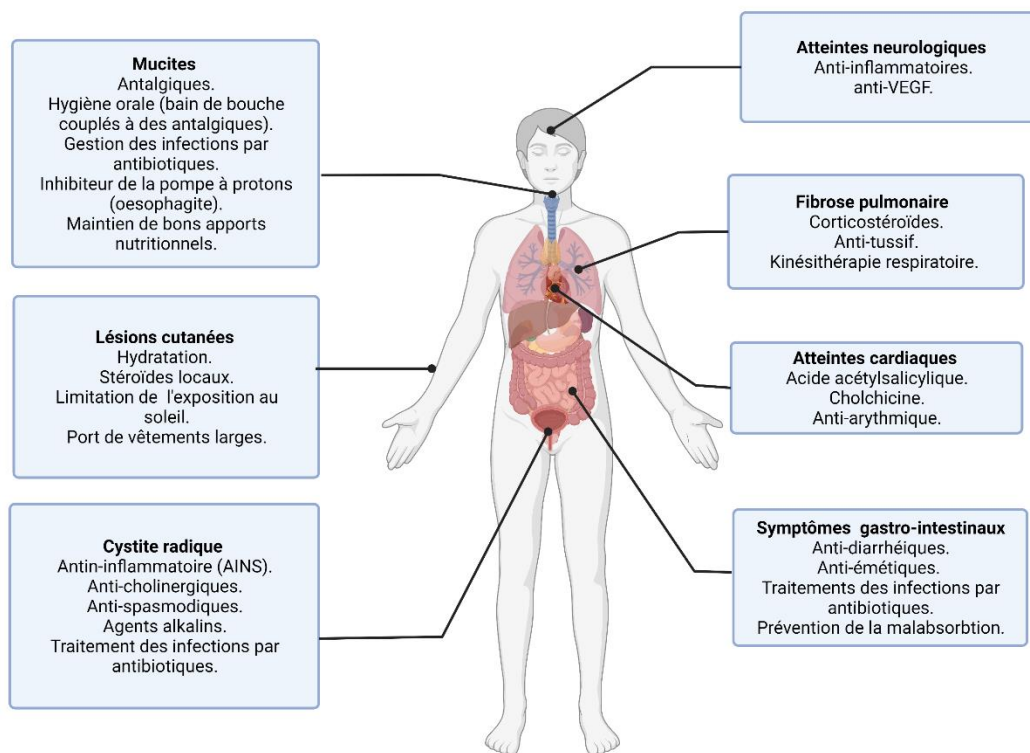


Figure 9 : Principaux moyens de prise en charge des complications tardives de la radiothérapie. Inspiré de (Montay-Gruel et al. 2019).

Le recours à la chirurgie est aussi un moyen de prise en charge des fibroses dans les cas les plus sévères. Cependant, elle peut elle-même favoriser l'apparition de fibroses. L'utilisation de caissons hyperbares permet d'augmenter l'oxygénation des tissus par stimulation de l'angiogenèse, l'hypoxie étant un facteur profibrosant. Cependant, les effets de cette oxygénation ne sont pas durables et la logistique de ce traitement est lourde pour le patient.

Un certain nombre de solutions thérapeutiques à visée curative font l'objet d'essais cliniques. Voici quelques exemples à titre d'illustration. Des molécules anti-oxydantes et anti-fibrotiques ont montré des effets prometteurs. Par exemple, l'association d'un anti-TNF α une cytokine pro-inflammatoire, la pentoxifylline, et de la vitamine E (tocophérol) comme réducteur du stress oxydatif a montré des résultats intéressants dans le cas de fibrose radio-induite (Delanian et al. 1999), et de l'ostéoradionécrose (Fan et al. 2014) ou de la nécrose cérébrale (Williamson et al. 2008). D'autres types de traitements prometteurs font l'objet de recherches précliniques et d'essais cliniques, comme l'utilisation de cellules stromales mésenchymateuses (Voswinkel et al. 2013), l'administration de probiotiques (Ciorba and

Stenson 2009) et la transplantation fécale pour ce qui concerne les complications du tractus digestif (Ding et al. 2020).

Les études fondamentales et précliniques constituent un vivier de pistes thérapeutiques intéressantes, malgré les limites qu'elles comportent. Investiguer les mécanismes précis aboutissant à la toxicité de la radiothérapie constitue un enjeu majeur pour trouver des solutions thérapeutiques ou préventives. C'est dans ce contexte que s'inscrit ma thèse. Mon projet s'est intéressé à la mise en place du recrutement immunitaire des monocytes médié par l'endothélium irradié. Les prochains chapitres de ce manuscrit ont pour objectif de présenter le rôle des compartiments immunitaires, notamment myéloïde et endothélial, dans les complications radio-induites. Je finirai par aborder l'importance des glycosylations dans les interactions cellules immunitaires-cellules endothéliales qui ont constitué l'intérêt principal de ma thèse.

Chapitre II – Le recrutement immunitaire radio-induit : focus sur le rôle du compartiment myéloïde

Plusieurs études suggèrent que la composante immunitaire est impliquée dans les toxicités tardives de la radiothérapie, telle que la fibrose. Ce chapitre vise à présenter succinctement les différents acteurs du système immunitaire et à décrire leur rôle. L'implication des acteurs myéloïdes (monocytes et macrophages) dans le développement des effets secondaires de la radiothérapie sera plus particulièrement abordée, car ils constituent l'objet de mon étude.

II. 1 Présentation des acteurs du système immunitaire

Le système immunitaire comporte différentes composantes cellulaires et moléculaires. Son rôle est d'assurer la protection de l'organisme et un maintien de son intégrité. Dans ce but, des moyens de surveillance, d'alerte et de résolution d'une situation pathologique sont mis en place. Toutes ces étapes font appel à une orchestration fine et complexe de différents types cellulaires immunitaires et tissulaires qui communiquent à distance, via les cytokines, les chimiokines, les anticorps, le système du complément, ou directement par des contacts récepteurs/ligands, des synapses immunitaires, des systèmes de co-activation, ou encore la présentation antigénique.

D'un point de vue développemental, les cellules immunitaires proviennent de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques localisées dans la moelle osseuse chez l'adulte (**Figure 10**). Une cellule souche hématopoïétique peut donner naissance à des cellules progénitrices myéloïdes ou lymphoïdes. Les cellules qui proviennent des progéniteurs myéloïdes participent à l'immunité innée tandis que les cellules d'origine lymphoïde constituent l'immunité adaptative, bien qu'il y ait quelques exceptions. L'immunité innée est la première ligne de défense de l'organisme. Elle est rapide et immédiate, contrairement à l'immunité adaptative, plus spécifique, qui met plusieurs jours à se mettre en place.

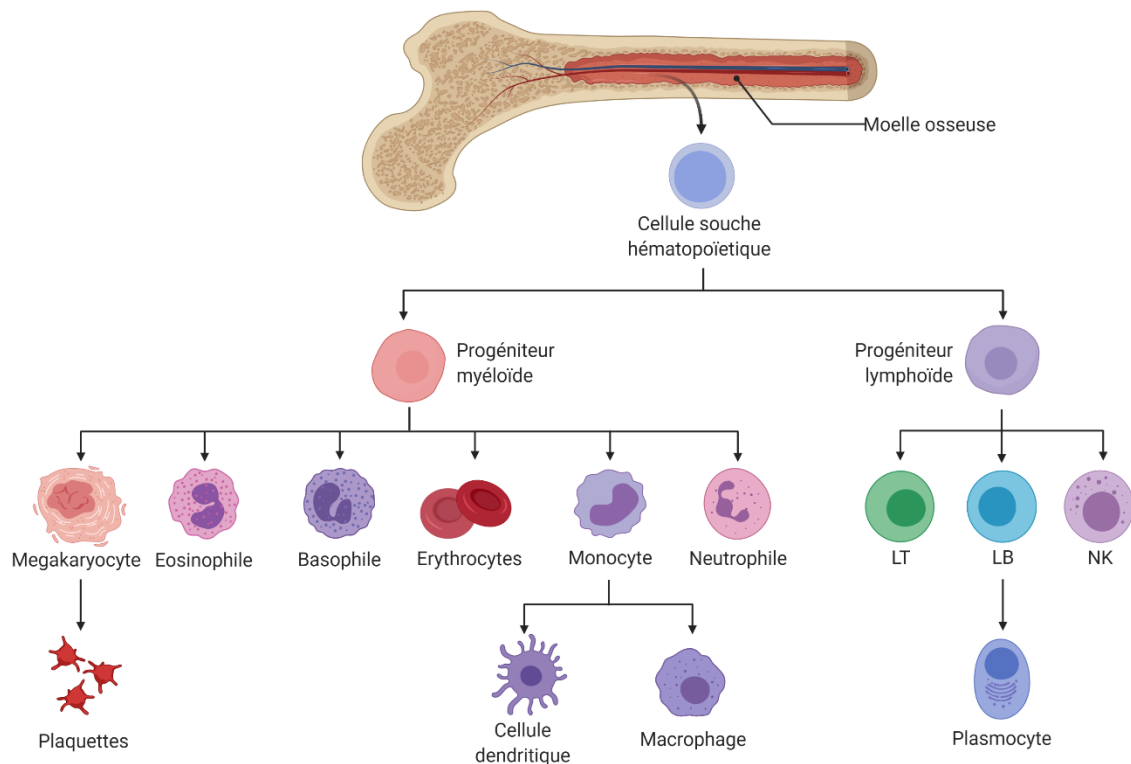


Figure 10 : Présentation des lignages immunitaires.
Source : Biorender.

a. Les acteurs cellulaires de l'immunité innée

Parmi les acteurs de l'immunité innée, on distingue d'une part les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques, et d'autre part les granulocytes, qui regroupent les neutrophiles, les basophiles, les mastocytes et les éosinophiles. Les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques possèdent la capacité de présentation antigénique, c'est-à-dire de phagocytter et présenter des antigènes aux lymphocytes afin de les activer. Les granulocytes ont globalement une fonction de résolution rapide d'une lésion ou d'une agression médiée par un pathogène. Les différents granulocytes nettoient la lésion par leur action de phagocytose ou tuent le pathogène grâce à des molécules anti-microbiennes (défensines, lysozymes), de remodelage du tissu (collagénase).

Les neutrophiles constituent la majorité des leucocytes circulants (50 à 70%). Ils circulent jusqu'à 10 h dans le sang après être sortis de la moelle osseuse et ont une durée de vie de quelques jours dans les tissus. Une fois dans les tissus, les neutrophiles phagocytent les bactéries en cas d'infection et/ou les débris cellulaires. Ils sont aussi capables de sécréter des molécules aux propriétés antibactériennes (défensines, lysozymes) et favorisent également le remodelage tissulaire (élastase, collagénase, régulateurs de protéases).

Les basophiles et les mastocytes constituent moins de 1% des leucocytes circulants et possèdent de nombreuses similarités. Ce sont des cellules non phagocytaires qui présentent au sein de leur cytoplasme de gros granules contenant notamment de l'histamine et d'autres molécules actives. L'histamine augmente la perméabilité des vaisseaux sanguins et l'activité de cellules musculaires lisses.

Les éosinophiles représentent 1 à 3% des cellules circulantes. Ce sont des cellules phagocytaires au même titre que les neutrophiles même si leur activité est moins efficace que ces derniers. On suppose que les éosinophiles jouent un rôle plus important dans la défense contre des organismes parasites pluricellulaires comme les helminthes. Les basophiles, les mastocytes et les éosinophiles sont connus pour leur contribution au phénomène d'allergie. Cependant, il est probable que dans certaines circonstances leur rôle soit légèrement différent. L'ensemble de ces cellules sécrètent des cytokines qui régulent la réponse des lymphocytes B et T.

Les autres cellules myéloïdes jouent un rôle de coordination entre l'immunité innée et l'immunité adaptative par la sécrétion des nombreuses cytokines et par leur fonction de présentation d'antigènes. La présentation d'antigènes se définit très simplement par la capacité d'activer des cellules lymphocytaires T spécifiques d'un antigène par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) chargées en peptides présentes à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

Les monocytes représentent entre 1 à 6 % des globules blancs circulants. Ces cellules présentent une hétérogénéité cellulaire : il existe des monocytes classiques dits « inflammatoires » qui peuvent se différencier en macrophages une fois dans le tissu et des monocytes non classiques dits « patrouilleurs » qui assurent une activité de surveillance, mais qui peuvent néanmoins fournir une réserve de monocytes tissulaires. Ces cellules ont fait l'objet de l'étude de ma thèse, je décrirai cette population immunitaire plus en détail dans la suite de ce manuscrit.

Les macrophages sont retrouvés dans les tissus. Il existe des macrophages résidents présents depuis la vie embryonnaire et qui jouent un rôle particulier en fonction de leur localisation. On retrouve par exemple les ostéoclastes dans l'os, les cellules microgliales dans le système nerveux central, les macrophages alvéolaires dans les poumons et les cellules de Kupffer dans le foie. Les macrophages recrutés se différencient à partir des monocytes de la circulation sous l'influence d'un stimulus inflammatoire. Ils jouent un rôle clé dans la

coordination de la réponse immunitaire et influencent fortement l'orientation pro- ou anti-inflammatoire par les cytokines qu'ils sécrètent.

Les cellules dendritiques sont un type des CPA. Elles jouent un rôle clé dans la coordination de l'immunité innée et adaptative. Les cellules dendritiques immatures jouent un rôle de sentinelle et absorbent par phagocytose ou pinocytose des antigènes appartenant à un potentiel agent pathogène ou à des cellules tumorales. Les antigènes sont ensuite présentés aux lymphocytes T naïfs dans les organes lymphoïdes pour être activés. Les cellules dendritiques folliculaires ont une appellation similaire aux cellules dendritiques, mais ne remplissent pas la même fonction. Elles se localisent dans une zone des ganglions lymphatiques appelée follicule lymphatique, très riche en lymphocytes B. Les interactions entre les cellules dendritiques folliculaires et les lymphocytes B sont très importantes dans la maturation et la différenciation des lymphocytes B (Owen et al. 2014).

Les lymphocytes Natural Killer (NK) appartiennent à la lignée lymphocytaire, mais sont communément considérés comme faisant partie de l'immunité innée. Contrairement aux lymphocytes T et B, les NK ne possèdent pas de récepteur spécifique de type *T cell receptor* (TCR) ou *B cell receptor* (BCR). Les NK représentent 5 à 10% des cellules présentes dans le sang périphérique. Ces lymphocytes ont la particularité d'induire la mort de cellules « anormales » sur la base de la non-reconnaissance des molécules de CMH de type I, par exemple des cellules tumorales qui échappent au système immunitaire car elles sous-expriment les molécules du CMH. (Owen et al. 2014)

b. Les acteurs moléculaires de l'immunité innée

Lors d'une infection ou d'un dommage, une multitude de signaux interviennent afin de monter une réponse immunitaire efficace et gérer la crise. Des molécules appelées *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) et *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) sont localement relarguées et au niveau systémique afin d'activer les cellules immunitaires. Les PAMPs appartiennent généralement à un agent infectieux bactérien, viral ou parasitaire (molécules composant la paroi des bactéries telles que les lipopolysaccharides (LPS), matériel génétique de ces agents infectieux). Les DAMPs proviennent de cellules endommagées. Ce sont le plus souvent des composés cellulaires ou nucléaires comme l'adénosine triphosphate (ATP) ou la protéine *high-mobility group box 1* (HMGB1). Ces molécules de signalisation sont reconnues par les *pattern recognition receptors* (PRR) auxquels appartiennent les *Toll-like receptors* (TLR). On connaît la plupart des ligands des TLR parmi lesquels on distingue les

récepteurs membranaires et les récepteurs intra-cytosoliques. Les autres PRR sont les *c-type lectin receptors* (CLR), les *retinoic acid-inducible gene-I-like receptors* (RLR) et les *Nod-like receptors* (NLR). La signalisation en aval des différents récepteurs PRR est variée, mais les voies NF- κ B, MAPK/AP-1 et *interferon regulatory factor* (IRF) sont bien souvent activées (Takeuchi and Akira 2010). Parmi les molécules secrétées potentiellement induites par la signalisation des PRR, on retrouve les défensines, les interférons α et β , IL-1, IL-6, TNF- α , GM-CSF, IL-12, IL-18, IL-10 et IL-8. Ces molécules jouent plutôt un rôle immunostimulateur, à l'exception de l'IL-10, plutôt anti-inflammatoire.

Le système du complément fait partie de l'immunité innée. Il constitue un ensemble de protéines sériques qui participent au mécanisme de défense contre les infections. Les protéines du complément interagissent directement avec des pathogènes, avec les cellules de l'immunité innée et adaptative ainsi qu'à la réponse anticorps. Il favorise l'élimination des pathogènes en augmentant le pouvoir de phagocytose par les phagocytes ou en créant des pores dans les parois des pathogènes.

Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote font partie de l'arsenal des molécules antimicrobiennes. Les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques possèdent de grandes capacités de production de ces espèces dans le but de détruire les pathogènes soit en les relarguant dans le milieu extérieur pour cibler des pathogènes extracellulaires, soit pour tuer les pathogènes internalisés dans les phagolysosomes des cellules phagocytaires.

c. Les acteurs cellulaires de l'immunité adaptative

Les cellules de l'immunité adaptative sont les lymphocytes T et B. Les lymphocytes T ont la particularité d'être activés en réponse à la présentation d'un antigène spécifique par les CPA. Cette présentation est essentielle pour une immunité ciblée, autrement dit l'élimination des cellules anormales, telles que des cellules infectées par un pathogène ou des cellules cancéreuses.

L'hétérogénéité phénotypique des lymphocytes T (LT) est très vaste. Ces cellules sont les acteurs principaux de l'immunité spécifique d'une cible, d'un antigène. On distingue les LT portant le co-récepteur CD4 (LT CD4) et ceux portant le co-récepteur CD8 (LT CD8), qui répondent à l'activation par les CPA via la présentation CMH I (pour les LT CD8) ou CMH II (pour les LT CD4). Les **LT CD4** naïfs sont activés et prolifèrent sous l'action de l'IL-2. Ils deviennent alors des **LT helper (LT_h)**, aussi appelés effecteurs auxiliaires. Les LT peuvent aussi devenir des cellules mémoires, mais ce cas de figure ne sera pas discuté ici. Les LT CD4

jouent un rôle indirect dans l'élimination d'un dommage par l'activation de macrophages, des cellules B et autres types cellulaires par sécrétions de cytokines. Ils ont la capacité d'augmenter la fonction de phagocytose et de présentation d'antigènes des macrophages, et de réguler l'activation et la production d'anticorps des LB. Les LT_h sont classés en sous-catégories en fonction du type de cytokines qu'ils sécrètent, comme indiqué dans le **Tableau 3**. Ils permettent d'orienter la réponse immunitaire de façon pro-inflammatoire (T_h1) ou anti-inflammatoire (T_h2) : on parle de réponse T_h1 ou T_h2 . En revanche, les **LT CD8** activés ont un rôle direct de destruction de cellules cibles par le déversement de granules contenant notamment la perforine et les granzymes. Les LT CD8 peuvent aussi induire l'apoptose des cellules cibles par l'interaction du Fas Ligand qu'ils présentent à leur membrane avec le récepteur de mort Fas de la cellule cible. On les appelle LT cytotoxiques. Ceux-ci participent aussi à l'activation des macrophages. **Les lymphocytes T_h17** sont un sous-type de LT helper qui ont la particularité de sécréter l'IL-17. Ils se différencient des T_h1 et T_h2 par le facteur de transcription ROR γ T, principalement activé lors de la différenciation (**Tableau 3**). Ces cellules sont connues pour jouer un rôle particulier dans les pathologies liées à l'inflammation chronique et les maladies auto-immunes, comme le psoriasis, la spondylarthrite ankylosante ou encore l'arthrose rhumatoïde (Miossec and Kolls 2012). **Les lymphocytes T régulateurs (Treg)** sont un sous-type de lymphocytes dont le rôle est de neutraliser la réponse immunitaire. Ces lymphocytes peuvent être naturellement régulateurs (nTreg) ou induits (iTreg), notamment par un environnement riche en IL-10 et TGF- β . Ils agissent par différents moyens sur les cellules T : en consommant l'IL-2 nécessaire à l'activation et à la prolifération des LT, en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF- β , en empêchant la présentation antigénique par inhibition des CPA et en induisant la mort des lymphocytes T.

Lymphocytes T	Cytokines polarisantes (induisent la différenciation)	Facteur de transcription régulateur	Cytokines effectrices (sécrétées par les cellules différenciées)	Conséquences
Th 1	IL-12 IFN γ , IL 18	T-bet	IFN γ , TNF α et β	Augmentation de l'activité des CPA (phagocytose, activité cytolytique, présentation). Augmentation de l'activité cytotoxique des LT CD8.
Th 2	IL-4	GATA-3	IL-4 IL-5 IL-9 IL-10 IL-13	Polarisation des macrophages vers un profil plutôt anti-inflammatoire.
Th 17	IL-1 TGF- β IL-6 IL-23	ROR γ T	IL-17A IL-17 F IL-22	Favorise l'inflammation. Impliquée dans l'auto-immunité.
T Reg	TGF- β IL-2	FoxP3	IL-10 TGF- β	Inhibe l'inflammation et l'activité des LT.

Tableau 3 : Régulation et fonction des sous-populations de LT helper. Adapté de (Owen et al. 2014).

Les lymphocytes B sont les cellules responsables de la production d'anticorps spécifiques d'un pathogène permettant son élimination par la formation de complexes immuns antigène-anticorps. Ils se différencient en plasmocytes (cellule productrice d'anticorps) ou en cellule mémoire, après activation par une CPA. Ce complexe immunitaire est ensuite reconnu par les cellules phagocytaires pour être dégradé. Les différents rôles de lymphocytes B ne seront pas abordés plus en détail car peu de choses sont connues à leur propos dans le contexte de l'inflammation radio-induite.

II.2 La réponse immunitaire après irradiation

a. Mécanismes généraux

Le recrutement immunitaire se définit par une cascade d'événements aboutissant à l'infiltration de cellules immunitaires dans une zone lésée. Il existe un concert de messagers chimiques sous forme de chimiokines et de cytokines qui permettent aux cellules de sortir de la

moelle osseuse et de circuler dans le sang pour ensuite passer du compartiment sanguin au tissu en traversant l'endothélium vasculaire, se différencier et effectuer leurs fonctions. Les interactions des leucocytes avec l'endothélium sont essentielles au passage des cellules du compartiment sanguin vers les tissus et impliquent un jeu de molécules d'interactions précis. Ce mécanisme sera détaillé dans le **Chapitre III**. Il est probablement impossible de trancher sur l'impact positif ou délétère du recrutement immunitaire et de l'inflammation après irradiation dans les tissus sains. En effet, la réponse immunitaire fait partie intégrante de la réponse à l'irradiation d'abord pour limiter les dégâts par une vague du processus de cicatrisation. Cependant, si elle persiste, elle peut induire une modification de l'homéostasie et induire un état pro-fibrosant.

Le type de réponse immunitaire à l'irradiation peut dépendre de la dose d'irradiation. Dans une revue, *Lumniczky et al* décrit que des faibles doses comprises entre 0,1 et 1 Gy auraient plutôt des effets anti-inflammatoires (Lumniczky et al. 2021). Ils relatent aussi que les fortes doses, au-dessus de 1 Gy, induiraient une immunosuppression transitoire en lien avec la radiosensibilité des leucocytes et favoriseraient des réponses pro-inflammatoires dans les temps précoces. Cependant, la réponse inflammatoire et immunitaire à l'irradiation n'est pas linéaire dans le temps. En effet, un changement progressif des signaux sécrétés (cytokines et chimiokines) et du phénotype des cellules immunitaires s'opère passant d'une réponse pro-inflammatoire (Th1) et anti-inflammatoire (Th2). Ce *shift* correspond à la transition de la phase inflammatoire (où la lésion est gérée) et la phase de remodelage (où le tissu revient à son état initial) de la réponse immunitaire. Comme abordé dans le **Chapitre I**, lorsque la lésion est trop importante ou répétée, alors la phase anti-inflammatoire peut évoluer vers une fibrose (Wynn 2004).

Pendant longtemps, l'effet de l'irradiation était considéré comme restreint aux cellules effectivement touchées par l'irradiation : c'est le concept de cellule cible (Puck and Marcus 1956). Ce concept illustre bien les réponses aiguës à l'irradiation qui sont dues à la perte des cellules fonctionnelles du tissu, cependant il ne permet pas de décrire certaines conséquences sur les tissus sains comme la chronicité de la réponse inflammatoire ou la fibrose. Il existe différents mécanismes induisant des réponses à l'irradiation hors champ d'irradiation : l'effet bystander, l'effet abscopal ou encore la production de cytokines. L'effet *bystander* est un mode de communication local par lequel les cellules irradiées sont capables d'induire les réponses cytotoxiques et génotoxiques sur des cellules non irradiées. Ce processus peut passer par des signaux sécrétés localement ou encore par des signaux passant par les jonctions cellulaires

communicantes (ou *gap junction*), comme les ROS qui sont notamment impliqués (Azzam et al. 1998; Prise et al. 2005). Les autres mécanismes font intervenir plus précisément des acteurs du recrutement immunitaires et agissent sur des longues distances. L'effet abscopal a été décrit pour la première fois en 1953 dans un contexte tumoral pour illustrer la régression d'un foyer tumoral secondaire après irradiation d'un foyer primaire (Demaria and Formenti 2020). Des années après, il a été montré que cet effet était médié par le système immunitaire. Les cellules qui meurent après irradiation relâchent des facteurs immunogéniques comme des antigènes de tumeurs qui permettent l'activation de la présentation antigénique par les CPA et le recrutement des LT CD8. Cette mort immunogène peut aussi concerner les cellules normales non tumorales car elles libèrent des DAMPS, tels que l'ATP extra-cellulaire, l'ADN extracellulaire ou encore la calréticuline, une protéine chaperonne appartenant au réticulum endoplasmique (Constanzo et al. 2021).

Enfin, les cellules irradiées produisent des cytokines inflammatoires comme les interférons, l'IL-1, IL-6, IL-8, le VEGF, EGFR et le TNF- α très rapidement après irradiation. Cette sécrétion passe en partie par l'induction de la voie NF- κ B (Dent et al. 2003). Ces molécules ont pour conséquences l'induction d'un état pro-inflammatoire. Elles favorisent le recrutement et l'activation de cellules immunitaires innées comme les neutrophiles, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques, puis de cellules adaptatives comme les LT_h1. Ces cellules ont plutôt un phénotype pro-inflammatoire par leurs actions et les cytokines/chimiokines qu'elles sécrètent. Le TGF- β est une molécule centrale dans le développement de la fibrose qui est libérée assez rapidement après irradiation par différents mécanismes. Les neutrophiles, premiers acteurs immunitaires sur le site de lésion, ont cette capacité de remodelage de la MEC, favorisant la libération de TGF- β présent sous forme latente inactive. Différents mécanismes de cette réponse immunitaire peuvent être auto-entretenus. C'est la persistance de certains signaux dans le temps que l'on suppose participer à l'établissement des complications tardives de la radiothérapie comme la fibrose.

b. Les cellules immunitaires impliquées dans les complications tardives de la radiothérapie

Plusieurs sous-types immunitaires, comme les mastocytes, les lymphocytes ou encore les macrophages, ont été impliqués dans le développement des toxicités radio-induites tardives. L'augmentation du nombre de neutrophiles dans les lésions radio-induites est souvent considérée comme un critère de sévérité des lésions. Cependant, leur rôle délétère n'est pas

toujours évident. Par exemple, l'étude de Blirando et al a montré une diminution des lésions précoces et tardives associée à une augmentation de l'infiltration de neutrophiles dans un modèle de lésion radio-induite colorectale (Blirando et al. 2011). Parmi les différentes sous-populations immunitaires, les mastocytes semblent favoriser l'inflammation en jouant sur les vaisseaux sanguins, le recrutement d'autres cellules inflammatoires, les cellules du stroma ou encore le système nerveux dans le cas des pathologies radio-induites (Milliat and Francois 2018). La revue de Milliat et François référence plusieurs études visant à évaluer le rôle des mastocytes dans les lésions radiques, soulignant que le rôle de ces cellules ne semble pas simple à évaluer. Le rôle délétère de la réponse des cellules LT CD4 dans les dommages radio-induits a été mis en évidence *in vivo* dans un modèle de lésion colorectale chez le rat (Bessout et al. 2015). Ces travaux montrent une augmentation de la colonisation par les lymphocytes T des tissus lésés lorsque les animaux irradiés reçoivent des lymphocytes provenant d'animaux irradiés par transfert adoptif, comparé à des lymphocytes provenant d'animaux non irradiés. L'administration d'anticorps dirigés contre CD3 a également permis de mettre en évidence une diminution des lésions observées.

c. Réponse immunitaire radio-induite tumorale

La radiothérapie possède la capacité d'induire la mort cellulaire des cellules tumorales et permet la mise à disposition d'antigènes par les cellules phagocytaires (CPA) qui peuvent internaliser et présenter aux LT CD8. Les conséquences de la radiothérapie sur l'immunité antitumorale sont une question qui suscite l'intérêt des chercheurs depuis des dizaines d'années. Un défaut de cette immunité est un frein considérable à l'éradication de la tumeur et à la guérison des patients. De nombreuses équipes de recherche se sont attachées à comprendre les mécanismes complexes limitant cette immunité où plusieurs éléments interviennent. La réponse immunitaire antitumorale efficace se fait notamment par la mort induite par les LT CD8+ cytotoxiques. Leur activation est dépendante du système de présentation antigénique (CMH) médiée par les CPA.

Certaines tumeurs ont la capacité de limiter cette présentation antigénique en devenant silencieuses. La présentation antigénique par les CPA est associée à l'internalisation des antigènes par phagocytose ou pinocytose. Les cellules tumorales sont capables d'exprimer un signal « *do not eat me* » matérialisé par la présence de CD47 et inhibent ce processus. Des thérapies basées sur des anticorps anti-CD47 sont des pistes intéressantes afin d'augmenter l'immunité anti-tumorale (Candas-Green et al. 2020). D'autre part, notre propre système

immunitaire possède des moyens de régulation de la réponse immunitaire notamment par les LT reg capables de désarmer les LT CD8. Ce désarmement passe par des interactions moléculaires précises telles que PD1-PDL1 ou PDL2, et CTLA-4-CD80 (B7), qui sont des *checkpoints* immunitaires. Certaines tumeurs détournent ces mécanismes en leur faveur.

Étant donné la capacité des rayonnements ionisants à favoriser la présentation antigénique, essentielle à la réponse immunitaire médiée par les LT, des associations de radiothérapie et d'immunothérapie (utilisant des anticorps monoclonaux anti-PD-1, anti-PDL-1 ou anti-CTLA-4) pourraient être une combinaison prometteuse en faveur d'un meilleur contrôle tumoral (Mondini et al. 2020). Dans le contexte tumoral, cette combinaison entre radiothérapie et inhibiteurs de *checkpoints* immunitaires pourrait également avoir un impact sur une autre population immunitaire, les *tumor-associated macrophages* (TAM), qui peuvent eux aussi exprimer PD-1 (Gordon et al. 2017). D'autre part, l'irradiation à forte dose pourrait avoir un effet sur la reprogrammation de ces cellules en faveur d'un phénotype anti-inflammatoire M2 (Chiang et al. 2012). Un autre aspect concerne le compartiment vasculaire, bien souvent anormal et dysfonctionnel dans les tumeurs. Cela induit un environnement l'hypoxique ce qui diminue la radiosensibilité des tumeurs et empêche les cellules circulantes immunitaires circulantes et les drogues anti-cancéreuses d'atteindre la tumeur.

II.3 Rôle du compartiment myéloïde dans les toxicités tardives de la radiothérapie

a. Les populations de monocytes

Le rôle des cellules myéloïdes, telles que les macrophages, dans la réponse à la radiothérapie, est une question qui suscite de l'intérêt depuis quelques années (Meziani et al. 2018a). Les macrophages jouent en effet un rôle bien particulier en faisant le lien entre immunité innée et immunité adaptative. Ces cellules possèdent des propriétés versatiles pro- ou anti-inflammatoires, et pro- ou anti-fibrogéniques, selon leur phénotype, qui est la résultante des marqueurs qu'ils présentent et des molécules qu'ils sécrètent. Les macrophages peuvent être de différentes origines : tissulaire (population résidente) ou circulatoire (provenant de la différenciation de monocytes issus de la moelle osseuse).

Les monocytes forment aussi une population de cellules immunitaires présentant une hétérogénéité particulière. Chez l'Homme, ils sont classés selon l'expression de deux molécules de surface : CD16 et CD14. La population CD14⁺ CD16⁻ correspond aux monocytes

classiques tandis que la population $CD14^+ CD16^+$ correspond aux monocytes non classiques. Il existe également une petite population intermédiaire $CD16^+ CD14^{dim}$ (**Figure 11**).

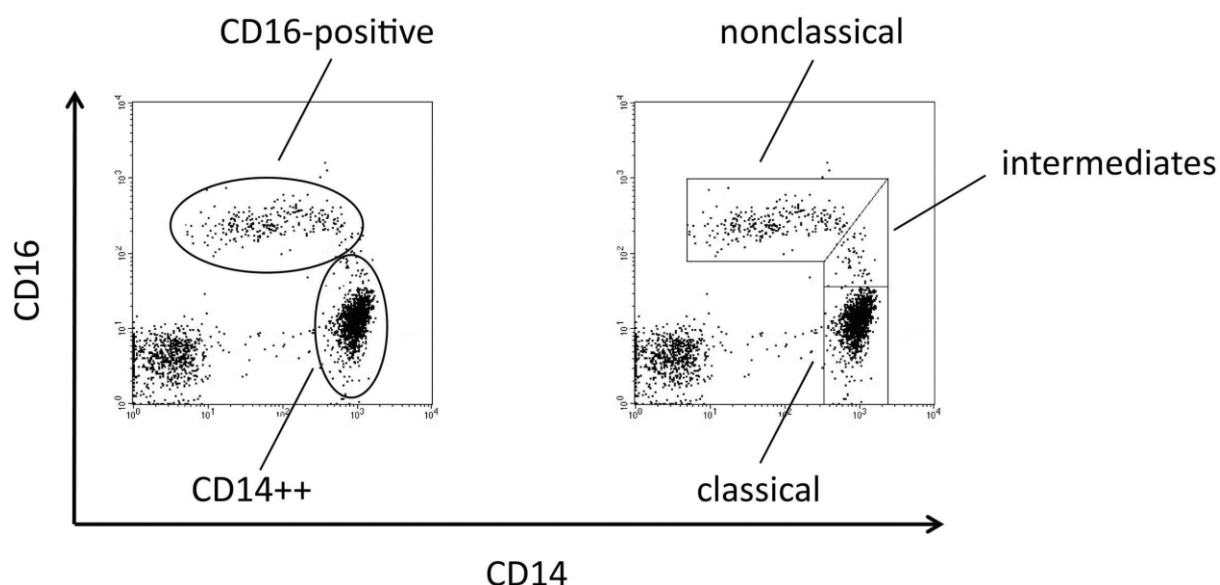


Figure 11 : Représentation en nuages de points des sous-populations de monocytes humains à l'aide des marqueurs CD14 et CD16. Tiré de (Ziegler-Heitbrock and Hofer 2013).

Chez l'Homme, à l'état basal, les monocytes classiques représentent environ 90% des monocytes, et les non-classiques et intermédiaires environ 10 %. Chez la souris, la proportion est plutôt de l'ordre de 50/50 à l'état basal. La classification des sous-populations monocytaires chez la souris se base sur le marqueur Ly6C. Les monocytes classiques sont $Ly6C^{high}$ et les non-classiques $Ly6C^{low}$. Les monocytes classiques et non classiques se distinguent également par la présence ou non des deux récepteurs aux chimiokines CCR2 et CX3CR1. Les monocytes non classiques dérivent des monocytes classiques qui sont appelés de la moelle grâce à la signalisation reçue par le récepteur CCR2. CCL2, aussi appelé MCP-1 pour *monocyte chemoattractant protein 1*, est le ligand privilégié de ce récepteur. Il guide les monocytes vers le lieu de la lésion. Les monocytes classiques sont communément considérés comme pro-inflammatoires et les monocytes non classiques comme anti-inflammatoires.

b. Évidences de l'implication des monocytes/macrophages dans les séquelles tardives de la radiothérapie

Il existe peu d'études démontrant le rôle des macrophages dans la fibrose radio-induite, et à ma connaissance, aucune étude dans le contexte de la nécrose radio-induite. Les principaux travaux sont référencés dans le **Tableau 1**. La majorité des études ne sont que des observations et des corrélations. Seules deux études permettent d'établir un lien de cause à effet entre une modification du compartiment macrophagique et un retard d'apparition, voire d'inhibition, de la fibrose radio-induite pulmonaire (Groves et al. 2018; Meziani et al. 2018b). Pour le démontrer, deux stratégies différentes ont été utilisées : des souris transgéniques invalidées pour le gène codant pour le récepteur CCR2 ($CCR2^{-/-}$) pour l'étude de Groves et al., et des souris sauvages ayant reçu des injections d'un anticorps neutralisant dirigé contre CSF-1R, un récepteur spécifique des macrophages, pour l'étude de Meziani et al. Il est à noter que le modèle pulmonaire est le plus souvent utilisé pour modéliser la fibrose radio-induite car il est relativement facile à mettre en place et que les animaux survivent suffisamment longtemps pour effectuer des études à moyen et long terme. De plus, la fibrose pulmonaire correspond à une complication qui se développe chez les patients traités par radiothérapie dans le cadre des cancers du poumon.

Modèle ou échantillon	Temps post-irradiation	Dose et modalité d'irradiation	Résultat principal	Relation de cause à effet entre macrophage et fibrose ?	Référence
Mâles C57Bl/6	6 à 30 semaines	4 x 8 Gy espacées de 12h Irradiation colorectale. Rayons X, 6 MV, 5,9 Gy.min ⁻¹ .	Marquage pan macrophage Iba1 augmenté dès 6 semaines comparé à la condition non irradiée. Persistance jusqu'à 30 semaines après irradiation.	Non	(Malipatlolla et al. 2019)
Femelles et mâles C57Bl/6 WT ou $CCR2^{-/-}$ Chimères : donneur de moelle > fond receveur C57 > C57 $CCR2^{-/-}$ > C57 C57 > $CCR2^{-/-}$ $CCR2^{-/-}$ > $CCR2^{-/-}$	12-18 semaines	12,5 Gy Irradiation thorax entier. Cs^{137} , rayons γ , 1,5 Gy.min ⁻¹	Inhibition ou retard de l'apparition de la fibrose dans tous les cas où la moelle venait de souris $CCR2^{-/-}$. Décalage de l'apparition de la fibrose de 15 à 22 semaines (dernier temps observé).	Oui	(Groves et al. 2018)

Échantillons humains de patients ayant reçus une radiothérapie thoracique entre 1981 et 2012	?	35 à 60 Gy (dose totale) Irradiation thoracique.	Infiltration de macrophages CD163 + au niveau de la lésion fibrotique.	Non	
Femelles C57Bl/6J Injection d'un anticorps monoclonal neutralisant anti CSF-1R 15 semaines après irradiation.	Jusqu'à 20 semaines	16 Gy Irradiation thorax entier. Rayons X, 1,08 Gy.min ⁻¹	Limitation de l'apparition de la fibrose pulmonaire associée à une diminution des macrophages interstitiels, mais pas des macrophages alvéolaires.	Oui	(Meziani et al. 2018b)
C57Bl/6 WT et CCR2 ^{-/-} ou C57Bl/6 WT + injection d'un inhibiteur de Ccl2 (bindarit) dans les 3 premières semaines après irradiation.	25 semaines	15 Gy Irradiation thorax entier Co ⁶⁰ , rayons γ , 0.5 Gy.min ⁻¹	L'extinction de CCR2 limite la mort cellulaire endothéliale au temps tardif et l'apparition de la fibrose radio-induite. Pas d'effet l'inhibiteur de Ccl2.	Non	(Wiesemann et al. 2019)
Femelles C57Bl/6 traitées avec un anti-CTGF à 2, 20 ou 112 jours (16 semaines) après irradiation.	Jusqu'à 48 semaines	20 Gy Irradiation thorax entier. Rayons X, 6 MV, 1,18 Gy.min ⁻¹	Effet bénéfique de l'administration de l'anti-CTGF sur la fibrose pulmonaire radio-induite, associée à une diminution des macrophages de type M2 (anti-inflammatoires, pro fibrosants).	Non	(Bickelhaupt et al. 2017)
Souris p16INK4-LUC transgéniques.	1 an	90 Gy Irradiation stéréotaxique poumon gauche (3x3 mm ²). X rays, 220 kV, 2,2 Gy.min ⁻¹	Présence de macrophages sénescents CD68/p21+/ β Gal + autour de la lésion fibreuse.	Non	(Soysouvanh et al. 2020)

Mâles C57Bl/6J	16 et 21 semaines	17 Gy Irradiation hémithorax droit. 3,12 Gy.min ⁻¹	Augmentation de l'ARNm des facteurs pro-fibrotiques TGFβ1 et Arg1, augmentation de facteurs du SASP (Ccl2, Cxcl10, Ccl-17, MMP2,-9 et -12) dans les macrophages du poumon irradié.	Non	(Su et al. 2021)
----------------	-------------------	--	--	-----	------------------

Tableau 4 : Études expérimentales en faveur d'un rôle des macrophages dans les complications tardives de la radiothérapie.

Peu d'études précisent par quels mécanismes les macrophages sont impliqués dans le développement de la fibrose radio-induite. En revanche, on peut estimer que la fibrose radio-induite, si elle présente des spécificités, a des mécanismes communs avec les autres types de fibroses. Par définition, la fibrose est décrite comme une dérégulation du processus normal de cicatrisation. Les tissus touchés présentent un excès d'accumulation de composants de la MEC, comme les fibres de collagène ou la fibronectine, altérant de manière durable l'architecture et la fonction de l'organe, ce qui peut mener à sa défaillance. Ce phénomène se produit généralement lorsque la lésion initiale est sévère ou répétée. Les fibroblastes ou myofibroblastes sont les principales cellules responsables de la production pathologique de MEC. Ils peuvent aussi sécréter des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires. Les macrophages anti-inflammatoires sont capables de sécréter du TGF-β et favoriseraient la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Aussi, sous certaines conditions, les macrophages sont capables de se différencier en myofibroblastes. Dans les premières étapes de la cicatrisation, les macrophages sécrètent du TGFβ1, molécule centrale dans le processus de fibrose. Dans d'autres contextes que l'irradiation, certaines études ont montré des liens entre macrophages et myofibroblastes. Pakshir et al. ont montré que des fibroblastes contractiles sont capables d'attirer les macrophages indépendamment de signaux chimiokiniques, par induction d'une déformation de la MEC (Pakshir et al. 2019). Dans un contexte de fibrose rénale, il a été mis en évidence que les macrophages sont capables d'effectuer une transition macrophage-myofibroblaste sous l'influence de la signalisation TGFβ1-Smad3 (Y. Y. Wang et al. 2017) .

Ces différents éléments et les études citées dans le **Tableau 4** conduisent à penser que les macrophages, notamment par leur phénotype anti-inflammatoire, jouent un rôle important

dans les lésions tardives après radiothérapie. La question de leur origine, circulante ou résidente, demeure irrésolue, de même que les mécanismes impliqués.

II.4 Thérapie ou pistes thérapeutiques ciblant le système immunitaire dans le contexte des toxicités radio-induites

Les traitements des complications tardives de la radiothérapie sont peu nombreux (voir **Chapitre I**). Les anti-inflammatoires, les corticoïdes et les antibiotiques en cas d'infection sont pratiquement les seuls moyens médicamenteux à disposition. Les études précliniques ont permis de mettre en évidence certains mécanismes impliquant directement ou indirectement les cellules immunitaires qui participent au recrutement, ce qui constitue des pistes thérapeutiques. Empêcher la mort cellulaire radio-induite dans les tissus sains et l'activation de la voie NF- κ B pourrait être une solution intéressante compte tenu de son rôle dans la production de molécules inflammatoires. Interférer avec la signalisation induite par le TGF β pourrait également être une option prometteuse. Enfin, cibler la signalisation induite par des chimiokines spécifiques de sous-types cellulaires, par exemple la voie CCR2/CCL2 ou encore CCR5 (Zhong et al. 2019), pourrait potentiellement limiter l'infiltration macrophagique que l'on suppose impliquée dans le développement de fibrose radio-induite.

Malgré la découverte de pistes thérapeutiques intéressantes, il est nécessaire de trouver un moyen de cibler le mécanisme d'intérêt dans le tissu lésé et déterminer le temps précis auquel administrer le traitement. Une des pistes intéressantes pour limiter l'infiltration immunitaire auto-entretenu dans les complications radio-induites pourrait jouer sur le processus de recrutement au niveau de la barrière endothéliale. En effet de nombreuses études, mentionnées dans le **Chapitre III** ci-après, suggèrent que l'endothélium est impliqué dans les complications tardives de la radiothérapie par différents mécanismes. L'endothélium coordonne une étape cruciale du recrutement immunitaire, le passage de la circulation sanguine vers le tissu lésé. Cibler ce mécanisme pourrait être une stratégie intéressante pour moduler l'inflammation des tissus sains irradiés.

Chapitre III – Rôle de l'endothélium dans les séquelles radio-induites tardives

L'endothélium vasculaire est un tissu épithélial spécialisé qui tapisse l'intérieur des vaisseaux sanguins en une monocouche de cellules endothéliales. Ce tissu assure différentes fonctions comme l'angiogenèse, le tonus vasculaire, l'hémostase et la perméabilité vasculaire. C'est un acteur clé de l'immunité en participant au recrutement immunitaire. Plusieurs études sont en faveur d'un rôle de l'endothélium vasculaire dans les séquelles tardives de la radiothérapie.

III. 1 Structure des vaisseaux

Le rôle principal des vaisseaux est d'assurer une bonne circulation du sang pour transporter les gaz, les nutriments et les éléments figurés qu'il contient. Le réseau vasculaire est extrêmement diversifié avec des artères et des veines, des gros et de petits vaisseaux. Les différents vaisseaux ont des spécificités anatomiques du fait qu'ils ne remplissent pas la même fonction. Le réseau artériel sortant du cœur par l'aorte, d'un diamètre de 30 mm en moyenne chez l'Homme, contient le sang riche en oxygène et délivre une partie de son contenu aux organes par le réseau capillaire (diamètre de 8 à 10 μm), qui s'invagine au plus proche des cellules fonctionnelles. Le transport du sang pauvre en oxygène, contenant notamment les déchets métaboliques, comme le dioxyde de carbone (CO_2), se fait par le réseau veineux passant par les capillaires veineux, les veinules jusqu'au plus grandes voies veineuses telles les veines caves inférieures et supérieures vers le cœur et les poumons où le sang est réoxygéné.

Les plus gros vaisseaux sont constitués de 3 tuniques : l'adventice, la média et l'intima séparées par des couches de fibres élastiques. L'adventice est un tissu fibreux. La média est constituée d'une couche de cellules musculaires lisses (plus épaisse dans les vaisseaux artériels que veineux). Enfin, l'intima est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales reposant sur une lame basale. Plus le calibre des vaisseaux diminue, plus le nombre de tuniques qui le constitue diminue. De ce fait, les capillaires les plus fins sont réduits à la seule couche de cellules endothéliales dans les organes (**Figure 12**). On retrouve aussi les péricytes étroitement liés à la lame basale dont le rôle est d'assurer la contraction des vaisseaux. À la différence des vaisseaux artériels, les vaisseaux veineux ont la particularité de présenter des valvules anti-retours.

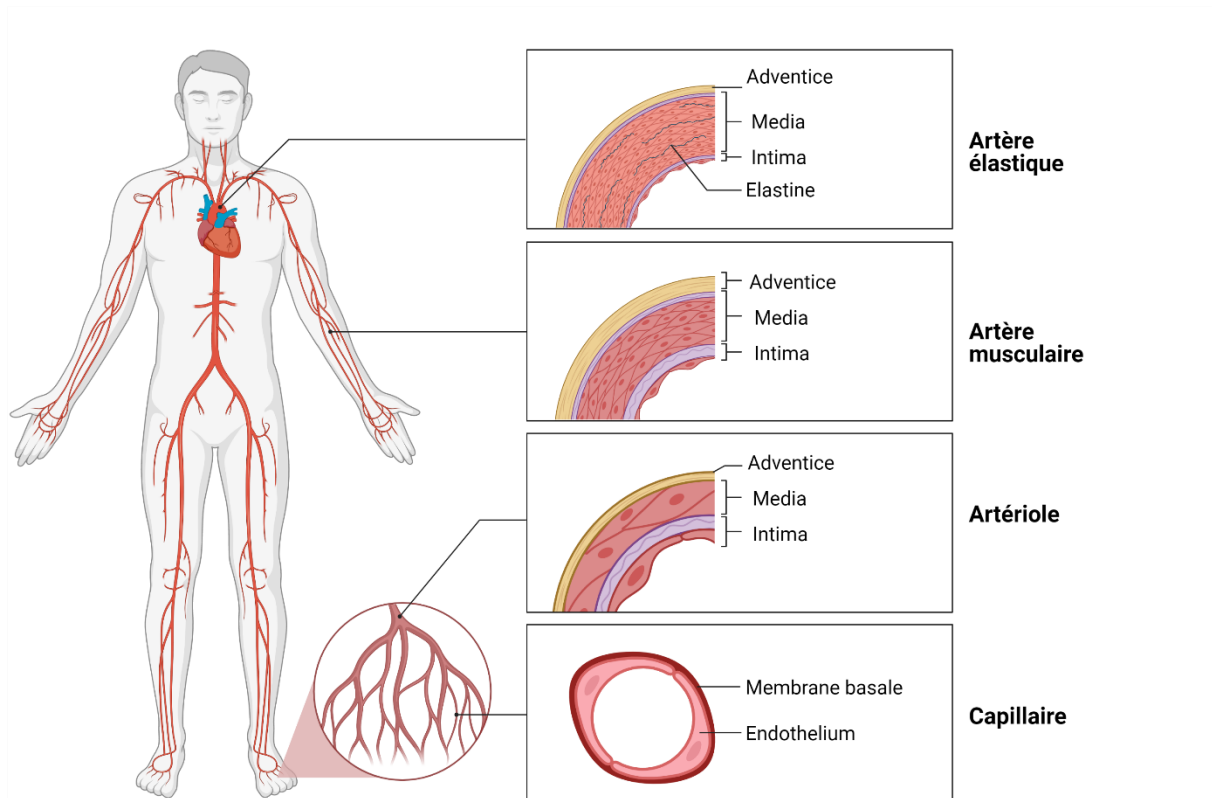


Figure 12 : Présentation schématique des différents types de vaisseaux présents dans le corps humain.
Source : Biorender.

III. 2 Les grandes fonctions de l'endothélium vasculaire

Il existe quelques spécificités au niveau de l'endothélium selon sa localisation. Par exemple, l'endothélium rénal est dit fenestré et joue un rôle de filtre moléculaire qui participe à la fonction du rein. Au contraire, l'endothélium de la barrière hémato-encéphalique présente de très nombreuses jonctions serrées limitant fortement les passages paracellulaires. De manière générale, et indépendamment de sa localisation, l'endothélium assure un certain nombre de grandes fonctions comme l'angiogenèse, la participation au tonus vasculaire et à l'hémostase. Il joue un rôle clé dans la perméabilité vasculaire et le recrutement immunitaire.

a. Angiogenèse

L'angiogenèse est définie comme le processus de formation de vaisseaux sanguins à partir d'un arbre vasculaire déjà existant. Ce mécanisme est retrouvé à la fois en condition physiologique, comme lors du développement d'un organisme ou d'un organe, mais aussi pathologique par exemple lors de la cicatrisation en réaction à un dommage (Risau 1997) ou lors du développement tumoral (Folkman 1971). Cette croissance vasculaire se fait notamment

sous la gouvernance de facteurs de croissance tels que, principalement, le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), le *fibroblast growth factor* (FGF), les angiopoïétines (Cross and Claesson-Welsh 2001) et l'éphrin (Michiels 2003). Toutefois, le *transforming growth factor* (TGF), l'*hepatocyte growth factor* (HGF), l'angiogénine (Ang) ou encore l'interleukine-8 (IL-8 ou CXCL8) peuvent aussi influencer l'angiogenèse en ciblant directement ou indirectement les cellules endothéliales (Karamysheva 2008).

b. Tonus vasculaire

Le tonus vasculaire est un facteur essentiel qui permet de maintenir la pression artérielle et le retour veineux. Bien que non contractiles, les cellules endothéliales participent au tonus vasculaire en influençant les cellules musculaires lisses vasculaires présentes dans la média. Les cellules endothéliales exercent leur influence par une variété d'hormones, neurotransmetteurs et facteurs vasoactifs. Parmi les molécules vasodilatatrices, on retrouve le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline (PGI₂) et l'*endothelium derived hyperpolarizing factor* (EDHF). Parmi les molécules vasoconstrictrices, on retrouve la thromboxane (TXA₂) et l'endothéline-1 (ET-1) (Sandoo et al. 2010).

c. Hémostase

Les cellules endothéliales jouent un rôle important dans le maintien de la bonne fluidité de la circulation sanguine et le contrôle de l'hémostase dans les zones de rupture vasculaire après un trauma. Lors d'un dommage, les cellules endothéliales répondent très rapidement grâce à des vésicules appelées corps de Weibel-Palade contenant le facteur de von Willebrand (vWF), la P-sélectine, l'IL-8, l'éotaxine-3, l'angiopoïétine-2, l'ET-1 et certains activateurs du plasminogène. Toutes ces protéines participent à l'hémostase par une activation de la coagulation et de la vasoconstriction, une prévention de la perte sanguine, et une régulation de la réponse inflammatoire et de la fibrinolyse (Greven et al. 2018).

d. Perméabilité

La propriété imperméable de l'endothélium réside dans le fait que les cellules endothéliales possèdent des jonctions intercellulaires (**Figure 13**) et régulent le passage des molécules et des cellules. L'endothélium a la capacité de faire passer de manière passive ou active des molécules de différentes tailles. La diffusion passive concerne les échanges de gaz, d'ions, d'eau et de certains lipides. Cela concerne aussi les déchets métaboliques voués à être

détoxifiés par les poumons, le foie ou les reins comme le CO₂ et l'urée. Le transport actif de molécules s'applique aux grosses molécules, comme les hormones et certains éléments nutritifs, et aux cellules inflammatoires. Ce transport actif peut se faire par deux voies, trans- ou paracellulaire, qui ne font pas intervenir les mêmes voies moléculaires. La voie transcellulaire fait jouer les mécanismes d'endocytose et d'exocytose impliquant les cavéolines. Ce mécanisme consiste à enfermer des molécules, comme le LDL, l'albumine, le fer, la transferrine, l'insuline et certaines chimiokines, voire des cellules, et à les relarguer par des vésicules à l'autre pôle de la cellule endothéliale. La voie paracellulaire consiste à faire passer des molécules ou des cellules, comme les leucocytes, entre deux cellules adjacentes en jouant sur l'assemblage et le désassemblage des jonctions intercellulaires adhérentes et serrées. Ces jonctions sont intimement liées au cytosquelette d'actine qui participe à l'ouverture de la barrière endothéliale sous l'influence, par exemple, de facteurs pro-inflammatoires. Les mécanismes moléculaires aboutissant au recrutement de cellules immunitaires par l'endothélium vasculaire seront décrits dans la suite du manuscrit.

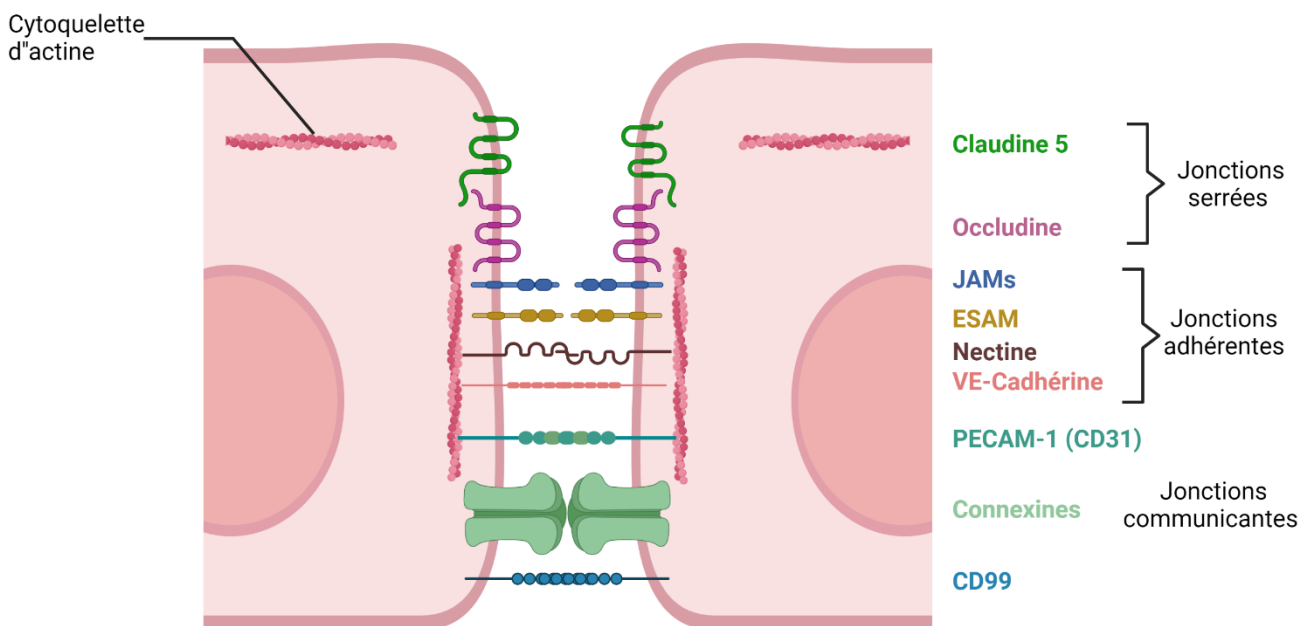


Figure 13 : Les principales jonctions existantes entre les cellules endothéliales.
Inspiré de (Duong and Vestweber 2020).

e. Inflammation

La barrière endothéliale participe à la réponse immunitaire à la suite d'un dommage stérile, comme c'est le cas pour des lésions engendrées par l'irradiation, ou non stérile, ce qui est plutôt le cas pour des lésions causées par un traumatisme qui laisse pénétrer des microorganismes. L'endothélium constitue une frontière entre les compartiments sanguins et tissulaires. Il a un rôle clé dans le passage des cellules immunitaires de la circulation vers le tissu. Outre son rôle de barrière physique, que les leucocytes doivent traverser à l'aide de molécules d'interactions, l'endothélium sécrète aussi de nombreux facteurs qui participent au recrutement et à l'activation du système immunitaire. Après un stimulus, la réponse est très rapide, de l'ordre de quelques heures. Elle se catégorise en deux phases : la phase I dite de **stimulation** et la phase II dite **d'activation** (Pober and Sessa 2007).

La phase I se caractérise par une stimulation de récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (ou GPCR) de l'endothélium. Les trois sous-unités (α , β , γ) du GPCR peuvent ainsi se désolidariser. La sous-unité α active la voie de la phospholipase C (PLC). En conséquence, il y a une augmentation de calcium intracellulaire participant à la production de PGI_2 et de NO, qui peuvent alors agir en synergie pour une action vasodilatatrice favorisant l'inflammation. Les sous-unités β et γ peuvent inactiver la *myosin-light-chain phosphatase* (MLCP) par l'intermédiaire de la petite protéine G Rho ce qui inhibe la déphosphorylation de la MLC. La forme phosphorylée de la MLC favorise la contraction des filaments en lien avec les jonctions serrées et adhérentes des cellules endothéliales et permet l'ouverture des jonctions. Cette activation de la MLC permet aussi de favoriser l'exocytose des corps de Weibel-Palade et ainsi l'exposition de la P-sélectine à la surface des cellules endothéliales, acteur moléculaire important dans l'initiation du recrutement des leucocytes. Cette stimulation par l'activation d'un GPCR est rapide et transitoire. En effet cette signalisation ne dure que quelques dizaines minutes car les GPCR sont rapidement désensibilisés pour éviter une réactivation. L'activation proprement dite des cellules endothéliales se fait durant la phase II.

Dans la phase II, les molécules initiatrices de l'activation de type II sont le *tumor necrosis factor alpha* (TNF α) et l'interleukine-1 (IL-1). Leurs signalisations vont aboutir à l'activation d'AP-1 et du facteur NF- κ B qui active la transcription des gènes codants pour la E-sélectine, les protéines CAM, comme ICAM-1 et VCAM-1, certaines chimiokines et l'enzyme COX2 responsable de la transformation de l'acide arachidonique en PGI_2 .

Les deux phases entraînent aussi des conséquences sur le cytosquelette d'actine liées aux jonctions cellulaires serrées et adhérentes. Cela aboutit à un relâchement des jonctions intercellulaires favorisant la fuite de protéines plasmatiques, comme l'albumine, et la migration transendothéliale paracellulaire des leucocytes. Ce phénomène est d'autant plus présent dans les veinules post-capillaires, car la densité de GPCR y est plus importante au niveau des cellules endothéliales.

Le recrutement de cellules immunitaires est dans un premier temps orienté vers les PNN puis vers les cellules myéloïdes tels que les monocytes. Cela peut s'expliquer par un changement dans le type de sécrétion de chimiokines. Par exemple la sécrétion de CCL2/MCP1 est un marqueur fort du recrutement des monocytes inflammatoires.

La multitude de fonctions assurées par l'endothélium (**Figure 14**) permet de concevoir pourquoi l'irradiation, par la dérégulation qu'elle provoque, engendre un environnement pro-inflammatoire et pro-fibrosant qui participe au processus lésionnel. Les principaux mécanismes par lesquels l'endothélium participe aux complications radio-induites, notamment tardives, sont présentés dans la partie suivante.

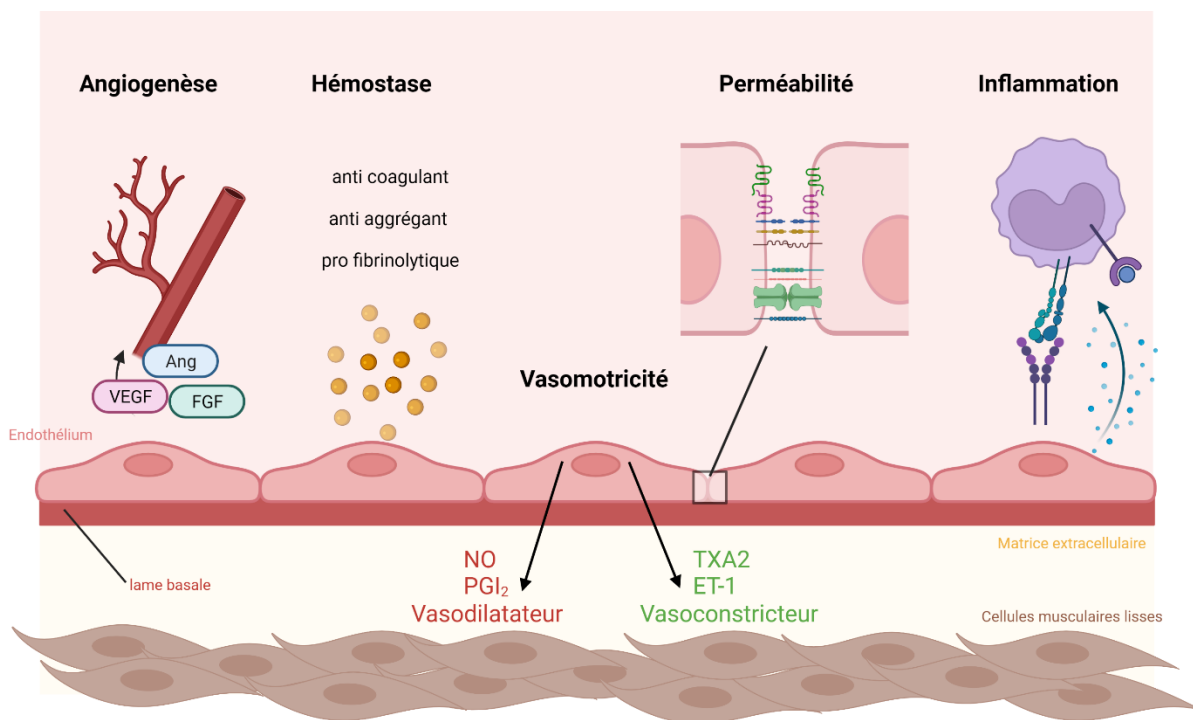


Figure 14 : Synthèse des fonctions de l'endothélium.

III.3 Endothélium et toxicités radio-induites

La radiothérapie touche les grandes voies vasculaires (Yang et al. 2021). L'atteinte vasculaire a été mise en évidence dès 1968 dans les complications aiguës et chroniques de la radiothérapie, où il a été suggéré qu'ils étaient directement impliqués dans les dommages tissulaires radio-induits (Rubin 1968). Les conséquences les plus référencées sont les pathologies coronaires radio-induites observées notamment en cas d'irradiation médiastinale. Cependant, des lésions vasculaires peuvent être présentes dans d'autres modalités d'irradiation. Les dommages radio-induits ont des caractéristiques similaires aux lésions de type athérosclérose. On retrouve l'activation du TGF- β , une augmentation du vWf, une dégénérescence des cellules musculaires lisses de la média et un épaissement de l'adventice qui présente des caractéristiques de fibrose. La présence de cellules de types macrophages spumeux est aussi associée à ces lésions. Dans les cas les plus sévères, les vaisseaux touchés peuvent présenter des obstructions très importantes, voire totales, de la lumière (sténose), empêchant la bonne circulation du sang. La **Figure 15** présente des exemples de lésions vasculaires radio-induites.

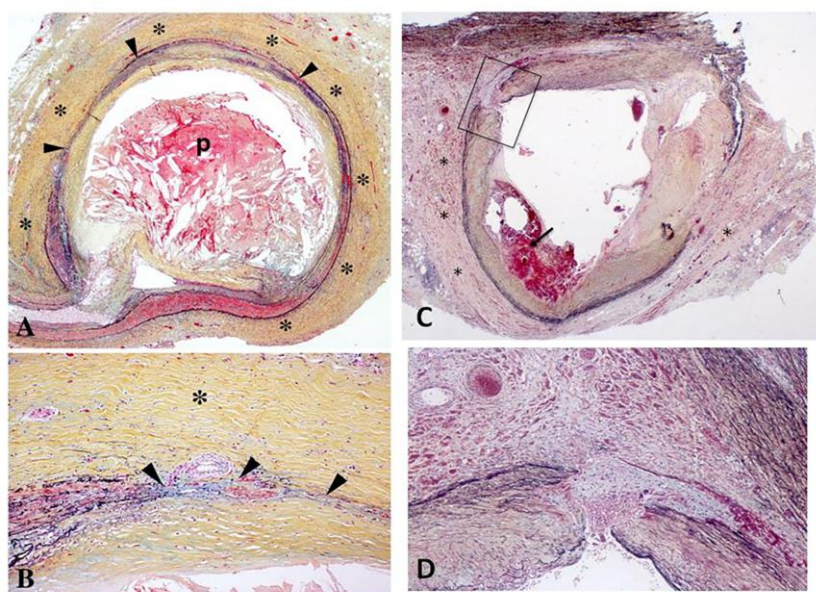


Figure 15 : Coupes histologiques illustrant des dommages vasculaires post-radiothérapie. Tirée de (Yang et al. 2021). (**A,B**) Coupes histologiques de l'artère coronaire d'un patient de 67 ans qui a reçu une radiothérapie pour un carcinome du poumon 7 ans avant sa mort . L'image **A** montre une fibrose de l'adventice sévère (*) et une destruction étendue de la média (pointes de flèches) avec une plaque intimale (p) causant 75% du rétrécissement de la lumière. La plaque est principalement constituée d'un noyau nécrotique riche en cholestérol. On note un épaissement marqué de l'adventice (*) avec destruction de la média (pointes de flèches). (**C,D**) Artère coronaire d'un homme de 62 ans ayant subi une radiothérapie médiastinale pour la maladie de Hodgkin 25 ans antemortem. A l'autopsie, il y avait un rétrécissement de 70% de la surface de la lumière (**C**) avec une hémorragie intraplaque (flèche), une fibrose de l'adventice marquée (*), et une destruction focale de la média artérielle (pointes de flèches). La zone encadrée en (**A**) est montrée à plus fort grossissement en (**B**) ; on note la destruction médiane (pointes de flèche) et le remplacement par des cellules musculaires lisses par un dépôt de collagène.

L'endothélium, présent dans tous les vaisseaux et tous les organes, est profondément impacté par les rayonnements ionisants. Il est le siège de réponses multiples qui participent aux complications radio-induites. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont mis en lumière des mécanismes précis en réponse à l'irradiation. Ils sont présentés ci-après.

a. Mort cellulaire

L'induction de la mort cellulaire est un des premiers effets de l'irradiation, comme abordée dans le **Chapitre I**. Dans les premières 24 heures qui suivent l'irradiation, une vague d'apoptose rapide survient dans différents organes tels que le poumon, le système nerveux central, le tractus gastro-intestinal, les glandes parotides et le myocarde. Deux types de morts cellulaires par apoptose ont été décrites pour les cellules endothéliales : l'apoptose médiée par la protéine TP53 et l'apoptose médiée par la voie sphingomyéline-céramide (Haimovitz-Friedman et al. 1994; Venkatesulu et al. 2018). La principale voie de mort radio-induite par apoptose des cellules endothéliales est celle induite par les céramides. Les cellules endothéliales y sont plus susceptibles car elles expriment jusqu'à 20 fois plus de sphingomyélinase acide (ASMase), en comparaison à d'autres types de cellules comme les macrophages (Marathe et al. 1998). Elles sont aussi capables d'entrer en sénescence, nous y reviendrons dans le paragraphe suivant. L'apoptose induite par la voie de la sphingomyéline (SPM)-céramide n'est pas médiée par des lésions à l'ADN et est indépendante de TP53. Cette voie consiste en une hydrolyse de la SPM membranaire par la sphingomyélinase (SPMase), directement stimulée par les rayonnements ionisants, mais aussi par certaines cytokines et médicaments anti-cancéreux. Les rayonnements ionisants induiraient la translocation de l'ASMase du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique. Il en résulte l'accumulation d'un second messager lipidique, le céramide. Les cibles du céramide sont des voies de signalisation associées à la prolifération et la différenciation cellulaire médiées par la *ceramide-activated protein kinase* (CAPK) et la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), et aussi à l'apoptose médiée par *c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase* (JNK/SAPK), AP-1 et NF-κB. L'augmentation des céramides a été observée dès les 30 premières secondes après irradiation à 10 Gy sur des cellules endothéliales aortiques bovines (*bovine aortic endothelial cells*, BAEC) (Haimovitz-Friedman et al. 1994). Quelques années plus tard, les travaux de Paris et al. ont notamment montré qu'il y avait une apoptose des cellules endothéliales microvasculaires au niveau du petit intestin après une irradiation à 15 Gy (Paris et al. 2001). Le nombre de cellules

endothéliales microvasculaires apoptotiques est fortement diminué chez des animaux invalidés pour le gène codant l'ASMase, mais pas chez les animaux invalidés pour TP53, suggérant une apoptose endothéliale par la voie SPM-céramide. Dans cette étude et ce modèle, à une dose de 16 Gy, l'invalidation de l'ASMase semble aussi provoquer une augmentation de la survie des souris, ce qui suggère que les animaux succombent à un syndrome hématopoïétique (survie moyenne de 9 jours) plutôt qu'à un syndrome gastrointestinal (survie moyenne de 6 jours). Dans cette étude, le potentiel rôle initiateur des lésions radio-induites de type SGI est abordé, mais cette notion est controversée dans d'autres travaux.

De manière générale, les stratégies visant à augmenter la survie des cellules endothéliales après irradiation favorisent la survie des animaux dans différents modèles. Par exemple, Fuks et al. ont montré que le *basic fibroblast growth factor* (bFGF) protégeait les cellules endothéliales de la mort et augmentait la survie des animaux après une irradiation du thorax entier à 22,5 Gy (Fuks et al. 1994). La combinaison du bFGF et de la déficience en ASMase augmente aussi la survie de souris irradiées en corps entier présentant un SGI (Paris et al. 2001).

b. Sénescence

La non-réparation des dommages à l'ADN peut provoquer la sénescence radio-induite. Les voies d'apoptose et de sénescence sont intimement connectées et régulées par des acteurs communs aux deux voies, comme TP53 qui peut engendrer l'activation de deux acteurs importants du cycle cellulaire que sont p16 et p21. Plusieurs études ont montré que les cellules endothéliales devenaient sénescents après irradiation (Soysouvanh et al. 2020; Y. Wang et al. 2016), mais il n'a pas été montré de lien de cause à effet entre la sénescence spécifique des cellules endothéliales et les toxicités radio-induites. En plus de l'axe TP53/p21/p16, les voies PI3K/AKT/mTOR et p38 MAPK, stimulées par l'augmentation radio-induite de la quantité de ROS intracellulaires, semblent impliquées dans la sénescence (Yentrapalli et al. 2013).

Les cellules sénescents sont bloquées dans le cycle cellulaire, mais restent métaboliquement actives. Elles présentent un sécrétome particulier, le *senescence-associated secretory phenotype* (SASP). Le phénotype sénescents des cellules endothéliales semble conférer des propriétés pro-adhésives vis-à-vis des leucocytes, notamment des monocytes (Lowe and Raj 2014), participant également à la toxicité radio-induite par l'induction de l'inflammation. La sénescence des cellules endothéliales pourrait jouer un rôle important dans les maladies cardiovasculaires radio-induites (voir plus loin, partie **e. pathologies vasculaires**

radio-induites). Limiter la sénescence des cellules endothéliales ou l'expression du phénotype sénescé pourrait permettre de prévenir certaines complications radio-induites. L'utilisation d'une drogue sénolytique dans un modèle de fibrose pulmonaire radio-induite a montré des résultats très prometteurs en induisant une réversion de la fibrose 16 semaines après irradiation (Pan et al. 2017).

c. Transition endothélium-mésenchyme

La transition phénotypique d'un type cellulaire endothélial vers un type cellulaire mésenchymateux est un phénomène physiologique lors du développement cellulaire. Cette transition peut aussi apparaître dans des cas pathologiques. En réponse à l'irradiation, les cellules endothéliales peuvent effectuer une transition phénotypique vers un type mésenchymateux (EndoMT). Durant cette transition, les cellules endothéliales perdent des marqueurs endothéliaux essentiels comme la protéine CD31 (PECAM-1), la VE-Cadhérine, Tie 2 et le vWF au profit de marqueurs mésenchymateux comme la *fibroblast-specific protein-1* (FSP-1), l'*alpha 2 smooth muscle actin* (α -SMA) et les collagènes de type I et III. Ce phénomène est connu pour être impliqué dans le développement de différentes maladies fibrotiques (Piera-Velazquez et al. 2016). En 2017, Mintet et al ont notamment identifié la présence d'EndoMT *in vitro* chez les HUVECs irradiées (Mintet et al. 2015) et *in vivo* après irradiation dans un modèle de toxicité colorectale chez la souris (Mintet et al. 2017).

d. Stress oxydant & hypoxie

Une des conséquences de l'exposition aux rayonnements ionisants est la mise en place d'un stress oxydant aigu, parfois chronique, par production de radicaux libres (Vujaskovic et al. 2001). La stabilisation du facteur de transcription HIF1- α est une étape clé de la réponse au stress oxydant. En effet, en condition de normoxie, le facteur HIF1- α cytosolique est dégradé par le protéasome après que l'HIF-prolyl hydrolase et la pVHL ont permis la phosphorylation et l'ubiquitinylation de HIF- α . Lors d'un stress oxydant, qui entraîne une hypoxie, l'HIF-prolyl hydrolase est inhibée ce qui laisse la possibilité à HIF1- α d'entrer dans le noyau et de former un dimère avec HIF1- β . Ce facteur de transcription peut alors activer la transcription de gènes en réponse à l'hypoxie. L'étude de Toullec et al. suggère un rôle de HIF1- α endothélial dans les complications radio-induites (Toullec et al. 2018). Cette étude montre que l'inactivation de HIF1- α spécifiquement dans l'endothélium protège des lésions fibrotiques radio-induites dans

un modèle d'entérite localisée à 19 Gy. En revanche, HIF- α ne serait pas impliqué dans les dommages tardifs induits par une irradiation stéréotaxique pulmonaire (Lavigne et al. 2019).

e. Coagulation

En lien avec leur fonction dans l'inflammation, les cellules endothéliales peuvent présenter des modifications dans l'expression de médiateurs de coagulation (Van der Meeren et al. 2003). Dans un groupe de patients irradiés à une dose totale de 20 à 43 Gy dans la zone pelvienne, l'activité fibrinolytique de veines prélevées dans la région irradiée était diminuée (Svanberg et al. 1976). Cette diminution a été observée entre 5 et 13 semaines et jusqu'à 2,5 ans après irradiation, suggérant un dommage permanent de cette activité. Cela pourrait expliquer les phénomènes de thrombose et de défaut de cicatrisation après irradiation. Plusieurs études suggèrent que le *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) est un acteur important dans la réponse endothéliale après irradiation (Abderrahmani et al. 2009; Abderrahmani et al. 2012; Milliat et al. 2008; Rannou et al. 2015). Le PAI-1, codé par le gène *serpin1*, est une molécule anti-fibrinolytique qui agit en inactivant les principaux activateurs du plasminogène, l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et l'urokinase bicaténaire (tcu-PA). Notamment, dans des modèles d'entéropathie radique, l'inhibition pharmacologique ou l'inactivation par transgénèse diminue la mort des cellules endothéliales et tend à diminuer les lésions précoces et/ou tardives selon les modèles. Étonnamment, aucun effet bénéfique de l'inactivation endothéliale de PAI-1 n'a été observé dans un modèle d'irradiation thoracique chez la souris (Lavigne et al. 2017). Cela suggère que l'importance du rôle de PAI-1 dans l'endothélium est peut-être dépendante du tissu irradié. Chez les souris PAI-1^{-/-}, la survie des cellules endothéliales après irradiation digestive augmente par rapport à des souris sauvages (Abderrahmani et al. 2012). Il a également été montré que l'inactivation de PAI-1 dans l'endothélium est associée à une augmentation de la survie des animaux et une diminution des lésions. De manière intéressante, une diminution de la présence de macrophages dans les tissus lésés a également été observée, associée à une inversion de la polarisation des macrophages M1/M2 au profit du phénotype M1 pro-inflammatoire (Rannou et al. 2015). Cela peut s'expliquer par le rôle de PAI-1 dans le processus de recrutement des monocytes. En effet, PAI-1 favorise la migration des macrophages via la protéine *Low-density lipoprotein receptor related protein 1* (LRP-1) et stimule leur polarisation vers un phénotype M2 par son interaction avec uPA. Dans une autre étude, il a également été montré que la déficience en PAI-1 diminue les interactions leucocytes/endothélium et plaquettes/endothélium dans un modèle d'entérite

radique (Milliat et al. 2008). Ces données suggèrent que la protection apportée par l'inactivation de PAI-1 pourrait être due à une diminution de l'infiltration macrophagique et au changement de la polarisation vers un état M1 pro-inflammatoire.

f. Augmentation de l'inflammation

L'inflammation médiée par l'endothélium peut être augmentée par des facteurs sécrétés de type chimiokines, des molécules pro-coagulantes et des facteurs membranaires tels que des molécules d'adhésions. L'irradiation augmente la sécrétion de certains acteurs de l'inflammation endothéliaux pro-inflammatoires qui font notamment partie du SASP endothélial (IL-6, IL-8, IL-1 α , IL-1 β , GRO α , CCL2 (MCP-1), TGF β , TNF α , CSFs, VEGF, EGF, IGFBNs, MMPs, PAI-1). Par exemple, il a été montré que l'irradiation stimulait l'expression de TGF β dans les cellules endothéliales en culture, ce qui leur confère un phénotype pro-inflammatoire (augmentation de l'expression de l'IL-6, IL-8, CXCL1, MIP-2 (*Macrophages inflammatory protein-2*) et MCP-1). L'état pro-inflammatoire de l'endothélium peut également se traduire par une augmentation des interactions leucocytes-endothélium nécessaires au recrutement immunitaire. Les molécules d'adhésions endothéliales sont essentielles au recrutement immunitaire. Il a été montré qu'un certain nombre d'entre elles étaient augmentées sur les cellules endothéliales irradiées, notamment ICAM-1 (D. E. Hallahan et al. 1997), V-CAM (Molla et al. 2003), PECAM-1 (Quarmby et al. 1999), P-sélectine (D. E. Hallahan et al. 1998) et E-sélectine (D. E. Hallahan et al. 1997). La combinaison de la sécrétion de molécules pro-inflammatoires, de chimiokines ainsi que l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésions par les cellules endothéliales irradiées suggère que l'endothélium participe activement à l'infiltration immunitaire radio-induite.

D'autre part, il a été montré que les interactions radio-induites entre les leucocytes et l'endothélium étaient augmentées avec l'irradiation, notamment via ICAM-1 (D. Hallahan et al. 1996) et les interactions E-sélectine/sialyl Lewis X (D. E. Hallahan et al. 1997) *in vitro* en condition d'adhésions statiques. Cela a aussi été montré *in vivo* au niveau intestinal à des temps très précoces (6 h) post-irradiation (Panes et al. 1995), ainsi qu'à des temps précoces (24 h) ou plus tardifs (14 jours) post-irradiation (Molla et al. 2003). Ces études suggèrent une implication de ICAM-1 dans l'adhésion radio-induite des leucocytes plutôt à des temps précoces et de VCAM-1 pour le temps tardif. Le modèle intestinal est souvent utilisé pour des techniques de microscopie intravitale grâce à la possibilité de visualiser les veines du mésentère après laparotomie. Les interactions leucocytes endothélium après irradiation ont cependant aussi été

étudiée dans d'autres systèmes. Par exemple, dans des modèles de lésions radio-induites de la peau (Holler et al. 2019) ou encore dans le pancréas dans l'étude de Ryschich et al, qui s'est intéressée aux interactions leucocytes-endothélium radio-induites de rat sain ou portant une tumeur induite par l'injection de cellules tumorales pancréatiques dans le péritoine (Ryschich et al. 2003; Schmidt et al. 2000). L'étude a montré que l'irradiation à 15 Gy augmentait les contacts stables des leucocytes à la paroi endothéliale dans les tissus normaux et tumoraux 5 jours après irradiation. Cela était associé à une infiltration de cellules immunitaires et une augmentation de la mort cellulaire dans les tumeurs à 12 jours post-irradiation. Enfin, il a été montré une augmentation des interactions entre les monocytes et les cellules endothéliales dans un système modélisant l'adhésion des monocytes sur des HUVECs irradiées à 20 Gy en condition de flux (Jaillet et al. 2017). Dans cette étude le rôle de N-glycosylations particulières (N-glycosylations hautement mannosylées) a été mis en évidence, suggérant que le phénotype pro-inflammatoire radio-induit de l'endothélium n'est pas uniquement médié par des protéines membranaires ou sécrétées. Cette étude suggère aussi que l'irradiation induirait l'érosion (ou *shedding*) du glycocalyx endothélial. Le glycocalyx est une couche acellulaire assimilée à un gel, composé de molécules glycosylées. Une de ses fonctions est notamment d'inhiber l'adhésion des leucocytes à l'état basal en masquant les sites de fixations aux molécules d'adhésion. Les sucres qui composent le glycocalyx sont aussi capables de fixer certaines molécules, comme le TGF β en le maintenant dans un état inactif latent (Chen et al. 2007) ou certaines chimiokines (Hoogewerf et al. 1997). La diminution de ce glycocalyx pourrait être un autre mécanisme participant à l'augmentation de l'inflammation radio-induite. Le rôle des glycosylations sera développé dans le **Chapitre IV** du manuscrit.

g. Conclusion

L'endothélium vasculaire peut être considéré comme un régulateur fort de l'inflammation radio-induite. La **Figure 16** résume l'ensemble des dysfonctions radio-induites. Sachant que cette inflammation, quand elle devient chronique, peut participer au développement des lésions tardives, il est primordial de mieux comprendre par quels mécanismes la dysfonction endothéliale se met en place. La connaissance de ces mécanismes permettra de mettre en lumière des acteurs pouvant constituer des cibles thérapeutiques afin de prévenir, limiter ou traiter certaines complications.

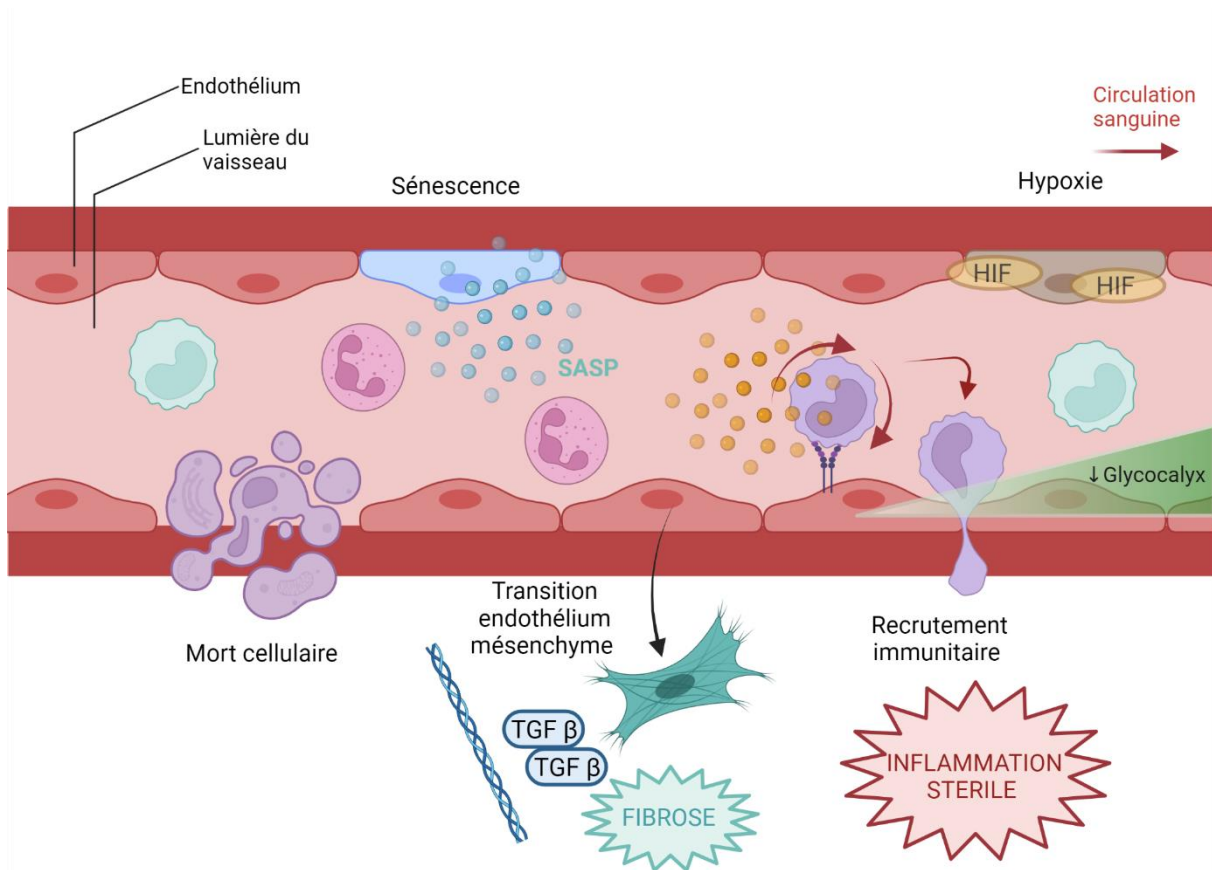


Figure 16 : Synthèse des dysfonctions radio-induites de l'endothélium.
Inspiré de (Guipaud et al. 2018).

III.4 Modification du recrutement monocytaire par l'endothélium irradié

a. Étapes et acteurs du recrutement immunitaire

L'étude du recrutement des monocytes par l'endothélium vasculaire irradié constitue le cœur de mon projet de thèse. Cette partie décrit les mécanismes cellulaires impliqués dans ce recrutement. Le passage d'une cellule immunitaire du sang vers les organes est un processus dynamique, multi-étape et orchestré par un jeu d'interactions directes ou indirectes entre les cellules immunitaires et les cellules endothéliales.

La première étape du recrutement consiste à attirer les cellules immunitaires au site de la lésion grâce à la sécrétion de chimiokines. Cette sécrétion est réalisée par différents types cellulaires, notamment par les cellules endothéliales après activation par les cytokines inflammatoires, comme IL-1 et TNF α , et par les leucocytes déjà présents dans la lésion. Au niveau des cellules endothéliales et de l'épithélium, les chimiokines sont piégées par les héparanes sulfates de la matrice extracellulaire et du glycocalyx. La concentration importante des chimiokines au niveau apical des cellules participerait à l'installation d'un gradient que les

cellules immunitaires remontent pour arriver au lieu du dommage. Le recrutement des leucocytes n'est cependant pas uniquement dépendant de facteurs sécrétés comme les chimiokines ou les cytokines, mais aussi de molécules d'adhésion comme les sélectines, les intégrines et des molécules de la superfamille des immunoglobulines. La compréhension du recrutement des leucocytes a évolué ces dernières années, mais les principales étapes restent la capture, le *rolling*, l'adhésion faible puis forte et enfin la migration transendothéliale (ou diapédèse) (**Figure 17**).

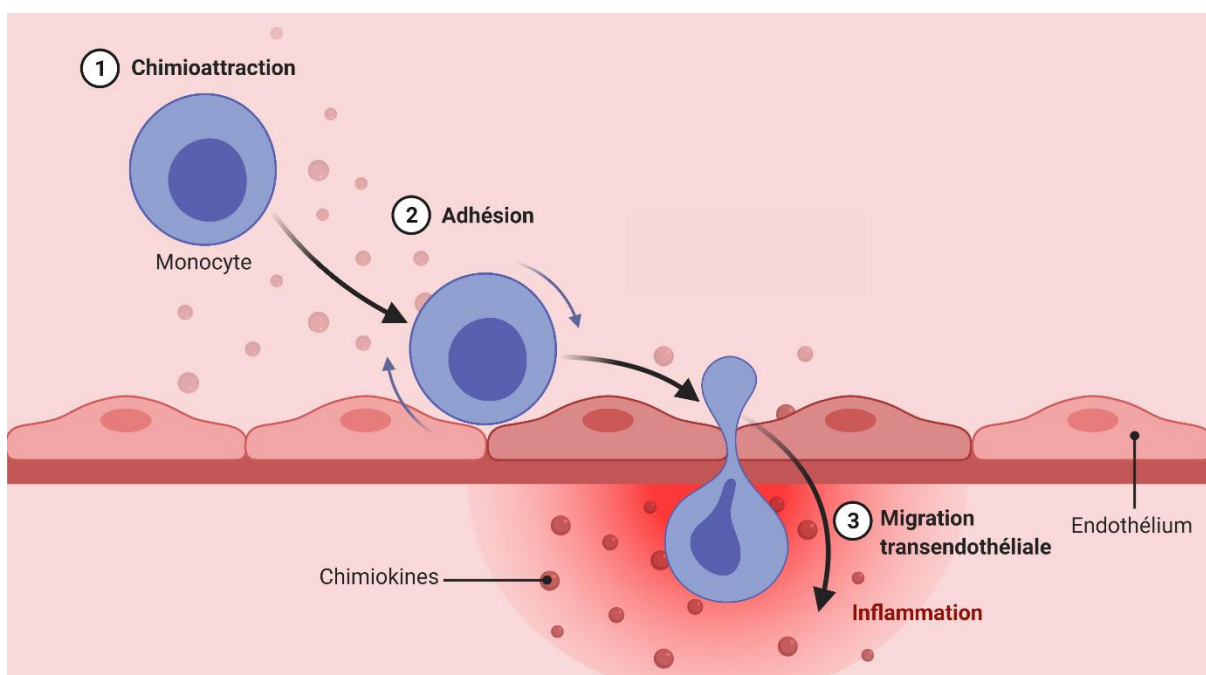


Figure 17 : Les principales étapes du recrutement immunitaire.
Source : Biorender

Le rolling

Les cellules immunitaires circulantes attirées au site de l'inflammation amorcent leur interaction avec l'endothélium par l'étape de *rolling* de manière concomitante avec l'activation cellulaire de l'endothélium et des cellules immunitaires. Cette étape fait intervenir des interactions faibles permettant aux leucocytes de rouler sur l'endothélium jusqu'au prochain site de liaison. Le *rolling* est majoritairement gouverné par des molécules appartenant à la famille des *C-type lectins* (sélectines). Il existe trois types de sélectines : E-, P- et L-sélectine. La E-sélectine est exprimée par l'endothélium alors que la P-sélectine peut aussi être exprimée par les plaquettes. La E- et le P-sélectine sont inductibles après activation cellulaire, contrairement à la L-sélectine, exprimée chez tous les leucocytes qui joue un rôle fondamental dans l'adressage (*homing*) des lymphocytes aux organes lymphoïdes secondaires. Les sélectines

sont des protéines transmembranaires avec un site de reconnaissance des sucres (domaine lectine). Leurs ligands privilégiés sont notamment des glycosylations de type Sialyl Lewis X (sLe^X) et Sialyl Lewis A (Sle^a) retrouvées en abondance sur protéines fortement O-glycosylées (mucines). Il a été montré que la force de liaison entre les sélectines et leurs ligands était dépendante de la force de cisaillement (*shear stress*) auquel les cellules sont soumises en raison du flux de circulation sanguine (Lawrence et al. 1997). L'importance des glycosylations dans le recrutement immunitaire sera abordée plus en détail dans le **Chapitre IV** de ce manuscrit.

L'adhésion

L'adhésion est l'étape qui suit le *rolling* dans le recrutement immunitaire. L'adhésion fait intervenir majoritairement deux familles de molécules : les intégrines et les molécules appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Les intégrines sont des protéines hétérodimériques composées d'une chaîne α et β associées de manière non covalente. Le génome humain et murin code pour 18 sous-unités α et 8 sous-unités β . Les intégrines sont portées par les leucocytes dans le système d'interaction leucocytes/endothélium. Les intégrines majeures impliquées dans l'adhésion des leucocytes sont le couple CD11a/CD18 autrement appelé LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*) qui reconnaît ICAM 1 et 2 (*Intercellular adhesion molecule 1 or 2*), et VLA-4 (*Very late antigen-4*) qui reconnaît V-CAM 1 (*Vascular cell adhesion molecule 1*). Les intégrines ont la capacité de changer leur niveau d'affinité pour leur ligand grâce à des changements conformationnels. Elles sont aussi capables de transduire des signaux intra et extracellulaires. La stabilité de l'adhésion dépend de la force intrinsèque de la liaison récepteur-ligand et de la densité en intégrine à la surface de la cellule, deux paramètres modulés par l'activation cellulaire, médiée par les chimiokines.

La transmigration ou diapédèse

Une fois la cellule adhérente à l'endothélium, la cellule « rampe » sur l'endothélium et émet des prolongements membranaires (protrusions) en direction du flux sanguin jusqu'à trouver un point d'accès vers le tissu. La migration trans-endothéliale peut se faire de deux manières : de manière paracellulaire ou transcellulaire. La voie paracellulaire représenterait la majeure partie des événements de transmigration. Comme évoqué précédemment, l'activation de l'endothélium aboutit à un remodelage du cytosquelette d'actine et des protéines engagées dans les jonctions cellulaires. Les interactions homophiliques entre les PECAM-1 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 ou CD31*) endothéliales et leucocytaires sont essentielles

à l'initiation de la transmigration. Cette interaction déclenche une vague de calcium nécessaire au remodelage de la membrane par le biais du *lateral border recycling compartment (LBRC)*. Ce remodelage est gouverné en partie par l'engagement des protéines ICAM-1 et VCAM-1 avec les intégrines leucocytaires ayant pour conséquence une phosphorylation de la VE-Cadhérine, son recyclage par le LBRC et un relâchement des jonctions serrées. CD99 joue également un rôle dans la finalisation de la diapédèse.

Les chimiokines jouent un rôle important dans chacune de ces étapes. Sous leur forme sécrétée, elles permettent de guider les leucocytes circulant depuis les organes lymphoïdes vers le site de lésion. Les chimiokines existent aussi sous une forme liée au glycocalyx, leur donnant la possibilité d'interagir avec les récepteurs aux chimiokines et de favoriser l'activation leucocytaire et endothéliale. Cette activation permet de moduler l'affinité et l'avidité des intégrines. La variation de la force d'interaction est un mécanisme clé du passage de l'étape de *rolling* à l'adhésion faible puis forte et enfin la diapédèse. Dans les cas des monocytes, CCL2 augmente la présence d'intégrines sur les monocytes, ce qui participe au renforcement des interactions. CX3CL1 sous forme soluble augmente l'adhésion à ICAM-1 et médie directement une adhésion sous sa forme membranaire (Goda et al. 2000).

b. Les modifications radio-induites des molécules d'interactions monocytes-endothélium

Certains couples récepteurs/ligands sont spécifiques du recrutement des monocytes (Gerhardt and Ley 2015). Le recrutement des monocytes est dans un premier temps régulé par les chimiokines sécrétées par cellules endothéliales, les cellules du stroma et les monocytes une fois activés. Le recrutement des monocytes est régulé par la liaison des chimiokines aux récepteurs CCR2 et CCR5, voire CX3CR1. L'augmentation de l'expression de l'ARNm de *ccl2* a été montrée dès 3h après irradiation dans les HUVECs *in vitro* (Hneino et al. 2012). Le *rolling* n'est pas une étape très spécifique d'un type de leucocytes. Cependant, l'augmentation radio-induite de l'expression des E- et P-sélectine de l'endothélium est associée à une augmentation de l'adhésion monocyttaire *in vitro* (D. E. Hallahan et al. 1997; D. E. Hallahan et al. 1998). La **Figure 18** résume l'ensemble de ces acteurs et les publications associées.

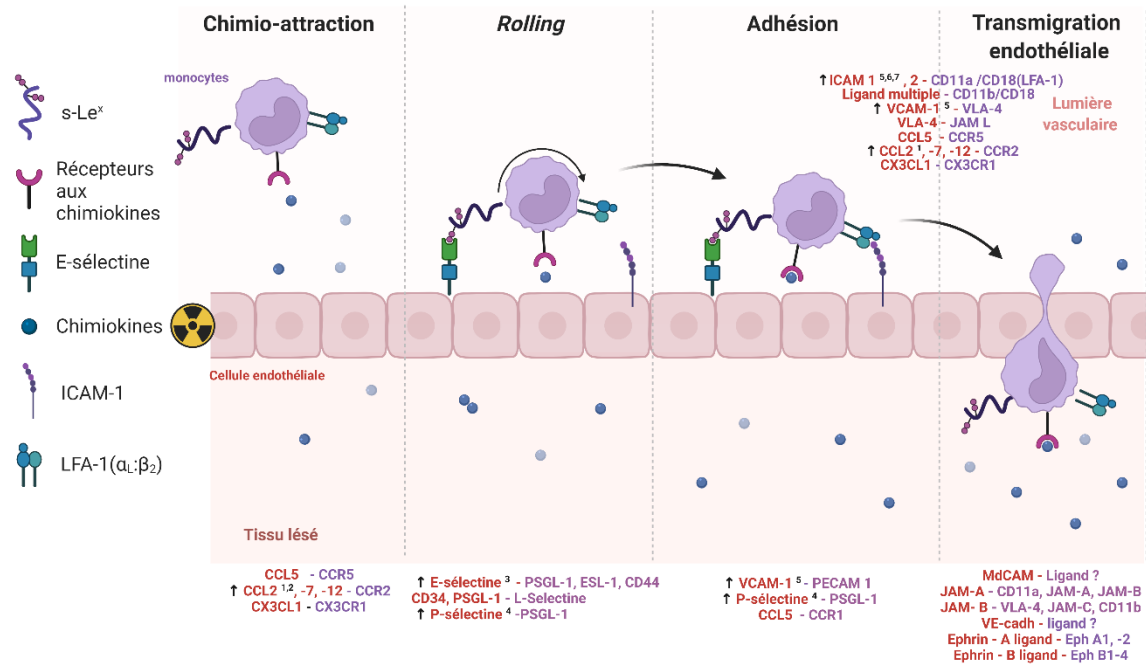


Figure 18 : Vision schématique des molécules impliquées dans le recrutement des **monocytes** par l'**endothélium** à chaque étape du recrutement immunitaire.

Inspiré de (Gerhardt and Ley 2015). Les numéros font référence aux publications qui montrent des modifications (↑ augmentée ou ↓ diminuée) en réponse à l'irradiation au niveau de l'endothélium : **1.**(Wiesemann et al. 2019), **2.**(Hneino et al. 2012), **3.**(D. E. Hallahan et al. 1997), **4.**(D. E. Hallahan et al. 1998), **5.**(Molla et al. 2003), **6.**(Gaugler et al. 1997), **7.** (D. E. Hallahan and Virudachalam 1997).

III.5 L'endothélium une cible thérapeutique pour limiter l'infiltration immunitaire radio-induite ?

Un certain nombre d'évidences suggèrent que le recrutement chronique de cellules immunitaires participerait à l'initiation et au développement des complications radio-induites. Les cellules myéloïdes, notamment les macrophages, pourraient participer à ce processus (Meziani et al. 2018a). Il est probable qu'une partie au moins de ces cellules soit recrutée depuis la moelle et franchisse l'endothélium pour arriver dans le tissu. De ce fait, les stratégies ciblant l'endothélium pour moduler l'entrée des leucocytes sont des pistes thérapeutiques intéressantes (Guipaud et al. 2018). Ces stratégies de modulations devront néanmoins faire l'objet d'études poussées afin de définir à quel temps les utiliser.

De nombreuses stratégies ciblent les interactions leucocytes-endothélium (anti ICAM-1) ou bien la voie NF-κB pour limiter la réponse inflammatoire. Cependant, il n'existe pas de thérapie qui inhibe les interactions avec les molécules d'adhésion par la voie NF-κB. D'autres stratégies indépendantes de la voie NF-κB pourraient réguler ces molécules d'interactions,

comme par exemple des stratégies ciblant le TFN- α , l'IL-19 (England et al. 2013) ou la N-glycosylation post-traductionnelle des protéines (Scott et al. 2012).

Les glycosylations sont des modifications essentielles au bon fonctionnement de l'immunité. Elles régulent notamment les différentes étapes du recrutement immunitaire par leur rôle dans la disponibilité des chimiokines, les interactions mucines/sélectines et les interactions intégrines/CAM (Marth and Grewal 2008). Une meilleure compréhension des mécanismes d'interaction qui font intervenir les glycosylations entre les leucocytes, et plus particulièrement les monocytes, et l'endothélium pourrait permettre d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques pour le traitement des maladies inflammatoires et des complications radio-induites.

Chapitre IV - Les Glycosylations : rôle dans le recrutement immunitaire radio-induit

Ce chapitre présente les types de glycosylations existantes et leurs rôles en conditions physiologiques et pathologiques. Les glycosylations endothéliales seront plus particulièrement traitées pour décrire leurs modifications par l'irradiation et leur rôle dans la régulation du recrutement immunitaire, notamment des monocytes.

IV.1 Généralités

Les glycosylations sont des modifications post-traductionnelles non codées par le génome. Ces modifications sont présentes et conservées chez tous les organismes vivants. Elles concernent aussi bien les parois bactériennes que la surface des cellules eucaryotes animales. Au même titre qu'il existe un transcriptome ou un protéome propre à chaque cellule, il existe un glycome, c'est-à-dire un répertoire précis des glycosylations. Ce glycome est extrêmement dynamique et en perpétuel remodelage en fonction de l'environnement dans lequel évolue la cellule.

Les glycosylations sont les modifications post-traductionnelles les plus courantes des protéines dans les cellules eucaryotes. On les retrouve sur plus de 85% des protéines sécrétées. Elles peuvent aussi concerner les lipides. Ces modifications sont apposées dans le réticulum endoplasmique (RE) et/ou l'appareil de Golgi au niveau subcellulaire. Ce sont des assemblages complexes de sucres dits simples ou monosaccharides, c'est pourquoi on les appelle aussi oligosaccharides. Chez les mammifères, il existe neuf monomères de base : le galactose (Gal), le glucose (Glu), le mannose (Man), le fucose (Fuc), le N-acétylgalactosamine (GalNac), le N-acétylglucosamine (GlcNac), l'acide glucuronique (GlcA), l'acide sialique (ou acide N-Acétylneuraminique, NeuAc) et le xylose (Xyl) dont les structures sont présentées dans la **Figure 19** (Bertozzi and Rabuka 2009). La combinaison de ces monomères permet à eux seuls la formation des plus de 7000 structures glycaniques différentes, et fait intervenir environ 700 protéines différentes (K. W. Moremen et al. 2012). Il est estimé que 2% du génome codant des mammifères encode des acteurs participants à la synthèse des glycosylations.

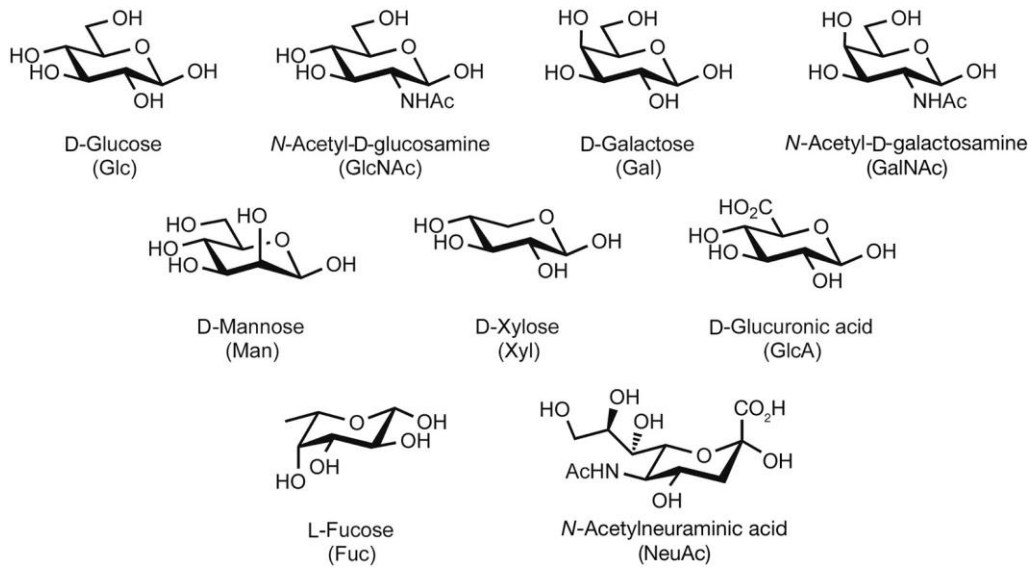


Figure 19 : Structure de différents monosaccharides participant à la composition des oligosaccharides chez les mammifères. Tiré de (Bertozzi and Rabuka 2009).

Il existe deux types de glycosylations majoritaires retrouvées sur les protéines : les O- et les N- glycosylations qui se distinguent par la nature de la liaison chimique entre l'acide aminé du polypeptide et l'oligosaccharide qui lui est rattaché. Concernant les glycosylations qui ne participent pas à la fonction des protéines, on retrouve les glycosaminoglycanes (GAG) composés de protéoglycanes sulfatés et de polysaccharides libres, ainsi que les sucres liés à des lipides comme les glycoprotéines à ancre GPI (glycosylphosphatidylinositols) et les glycosphingolipides (**Figure 20**). Les différentes classes de glycosylations ainsi que les principales étapes de production sont décrites plus loin.

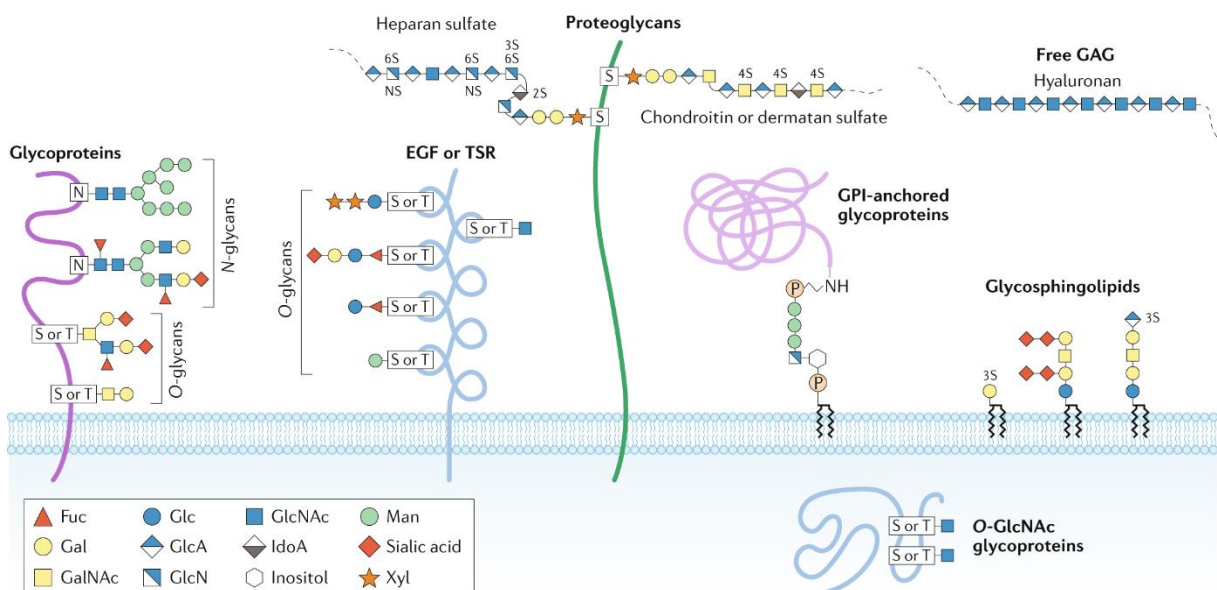


Figure 20 : Les principales glycosylations chez les mammifères. Tiré de (Reily et al. 2019).

a. O – Glycosylations

La O-glycosylation désigne que la structure glycanique soit liée à la protéine sur un acide aminé de type thréonine ou sérine par le groupe hydroxyle (-OH). Chez les mammifères, il existe sept types de O-glycosylations principales. Les O-GalNAcglycans de type *core* 1 à 4 sont les mucines. La synthèse des O-glycans commence par le transfert d'une N-acétylgalactosamine (GalNAc) à partir d'un UDP-GalNAc sur une thréonine ou une sérine d'un polypeptide. Il est à noter qu'il n'existe pas de séquence polypeptidique consensus désignant l'acide aminé hydroxylé sur lequel se fait la liaison. Le transfert du GalNAc initial se fait par une enzyme de la famille des *polypeptide-N-acetyl-galactosamine transferases* (GalNac-Ts). Le génome humain encode 20 GalNac-Ts différentes dont 17 sont caractérisées fonctionnellement (Raman et al. 2012). Le ou les branchements saccharidiques suivants sur le GalNAc définissent le type de *core*. Il existe en réalité 8 types de *core* mais les *cores* 1 à 4 sont les plus fréquemment synthétisés (**Figure 21**). Les réactions qui suivent cette étape initiale sont uniquement catalysées par des enzymes de type glycosyltransférases permettant l'élongation des O-glycosylations depuis le *core* de base.

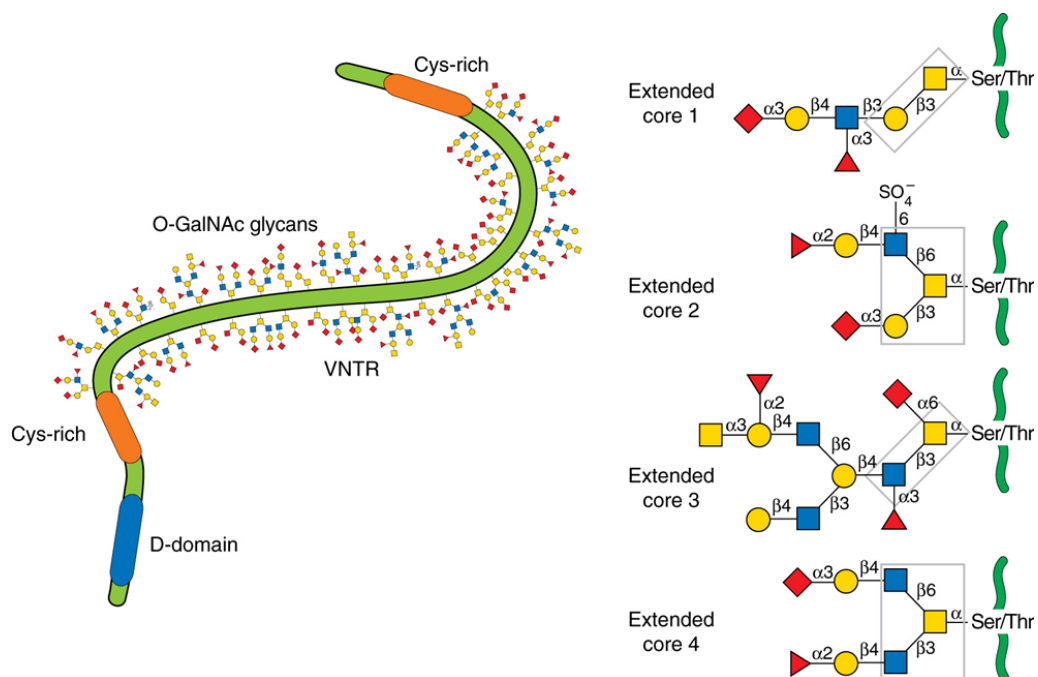


Figure 21 : Modèle simplifié d'une mucine portant des O-glycosylations. Les structures des *cores* 1 à 4 sont présentées à droite. Les structures de bases des *cores* sont encadrées en gris. Tiré de (Brockhausen and Stanley 2015).

b. N – Glycosylations

Les N-glycosylations sont des oligosaccharides essentiellement portés par des protéines, liées par l'atome d'azote d'une asparagine. Il existe différentes liaisons entre les protéines et les oligosaccharides. La liaison principale se fait entre une asparagine et un N-acétyl glycosamine (GlcNAc). Contrairement aux O-glycosylations, il existe un site consensus de fixation des N-glycosylations défini par l'enchaînement d'une asparagine suivi d'un acide aminé variable, sauf la proline, puis d'une sérine ou une thréonine. La structure des N-glycoconjugués de base est composée de cinq sucres (deux GlcNAc et trois Man). Sur cette base, sont ensuite ajoutés ou retirés d'autres monosaccharides tels que d'autres Man, des Gal, des Fuc, des GlcNAc ou encore des acides sialiques (NeuAc). La formation de l'arborescence primaire des N-glycosylations riches en mannoses se fait d'abord à l'intérieur du RE en étant associé à un lipide (le dolichol) ancré dans la membrane endoplasmique. Cette structure oligosaccharidique est ensuite transférée à l'aide des oligoccharyltransférases (OST) sur un polypeptide en cours de synthèse (Kornfeld and Kornfeld 1985). La N-glycosylation est donc plus précisément une modification co-translationnelle. Après liaison au polypeptide, la production des N-glycosylations est essentiellement assurée par des glycosidases qui permettent de remodeler l'arborescence glycosidique par ajout ou retrait d'autres monomères. Ce processus de *trimming* (ou maturation) a lieu dans le RE et l'appareil de Golgi. Ces étapes de maturation permettent de donner naissance aux différentes classes de glycosylations : les N-glycosylations hautement mannosylées, hybrides et complexes (**Figure 22**). Les N-glycosylations hautement mannosylées sont des formes immatures généralement peu retrouvées sur les protéines au profit des structures hybrides et complexes.

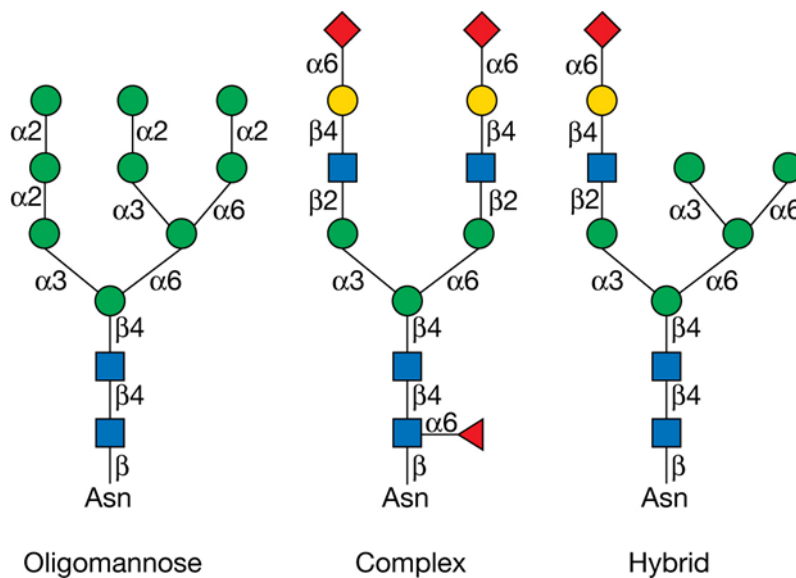


Figure 22 : Structure des différents sous-types de N-glycosylations.

Enfin, un autre niveau de modifications des O et N- glycosylations fait intervenir des étapes de *decorating* et de *capping* qui ont lieu aux extrémités terminales des oligosaccharides. L'étape de *decorating* correspond principalement à l'ajout de résidus fucoses à la fin de l'arborescence alors que le *capping* concerne l'ajout d'acides sialiques (notamment les motifs sialyl Lewis X, sLe^X) ou de groupes sulfates. Ces modifications signalent la fin de la maturation de l'oligosaccharide.

c. Les glycosaminoglycanes (GAGs)

Les GAGs sont un sous-type de O-glycosylations. Ces sucres peuvent être sous forme libre ou liée à des protéines. Il existe quatre familles de GAGs : les hyaluronanes, qui sont libres, les héparanes sulfate et l'héparine, les chondroïtines et dermanes sulfate, et les kératanes sulfates (**Figure 20**). Tous ces composés sont sulfatés, à l'exception des hyaluronanes, ce qui leur confère une charge négative. Les GAGs sont extracellulaires et entrent dans la composition de la MEC et du glycocalyx.

d. Les sucres liés aux lipides et ancrés GPI

Certaines glycosylations extracellulaires ne sont pas portées par des résidus protéiques permettant leur ancrage à la membrane plasmique. Il existe des systèmes d'ancrages lipidiques soit directement par des lipides comme les glycosphingolipides soit par des ancres GPI (glycophosphatidyl inositol). Ces ancres servent de matrice au niveau extracellulaire pour un certain nombre de protéines dont certaines impliquées dans le recrutement des leucocytes.

IV.2 Rôles physiologiques et pathologiques des glycosylations

La fonction d'une glycoprotéine est assurée par la combinaison de la composante protéique et glycosylée. Au niveau cellulaire, les glycosylations ont un rôle dans le repliement, le contrôle qualité, la stabilité, le transport et la fonction des protéines. Elles jouent un rôle structural, elles sont également importantes pour les interactions cellulaires. La partie ci-dessous s'attachera à donner quelques exemples du rôle essentiel des glycosylations.

a. Rôle dans le développement

Les glycosylations sont essentielles au développement et à l'embryogenèse. Plusieurs études montrent qu'un défaut de glycosylations, induit par des mutations, impliquant des gènes codant des enzymes des voies de formation des N- ou O-glycosylations entraîne une létalité

embryonnaire. Par exemple, Wang et al. ont montré que des souris invalidées pour le gène *Fut8* codant pour une α 1,6 -fucosyltransférase présentait une « semi-létalité » (X. Wang et al. 2005). En effet, 70 % de ces souris décèdent dans les 3 jours après la naissance, tandis que la fraction survivante présente de gros retards de croissance. La mort de ces souris était due à un emphysème pulmonaire associé à une diminution de la fucosylation du TGF β . La supplémentation des souris en TGF- β mature permet un sauvetage partiel de la létalité. Les O-glycosylations sont aussi essentielles au développement vasculaire et notamment dans la différenciation entre lits vasculaires et lymphatiques (Herzog et al. 2014).

b. Rôle dans l'immunité

Les glycosylations jouent un rôle important dans l'immunité par différents mécanismes, notamment la régulation des interactions entre leucocytes et endothélium (Schnaar 2016; Sperandio et al. 2009). D'autre part, les glycosylations impactent aussi la fonctionnalité des anticorps ou immunoglobulines, des protéines hautement glycosylées (T. Li et al. 2017), ce qui est à considérer dans le développement de thérapies à base d'anticorps monoclonaux.

Comme abordé au chapitre III ([Étapes et acteurs du recrutement immunitaire](#)), les premières étapes du recrutement immunitaire, notamment le *rolling*, sont principalement contrôlées par les interactions entre les sélectines et les mucines. Les mucines sont des protéines fortement O-glycosylées qui comportent notamment des modifications terminales de type Sle^X reconnues par les sélectines.

Les glycosylations portées par les protéines d'interactions engagées dans l'interface endothélium-leucocytes peuvent impacter et réguler le recrutement immunitaire. Il a notamment été montré que des formes hautement mannosylées de ICAM-1 induisaient une adhésion cellulaire plus forte envers les monocytes (Scott et al. 2013b) et cela de manière spécifique envers les monocytes CD16⁺ dans un contexte inflammatoire induit par TNF α ou dans un contexte d'athérosclérose (Regal-McDonald et al. 2019). L'augmentation des glycosylations en contexte pathologique pourrait donc avoir un rôle dans le recrutement sélectif de certaines populations de leucocytes, théorie du *zip code* (ou code-barre) avancée par Renkonen et al. (Renkonen et al. 2002). Cependant, la seule présence de glycosylations sur une protéine ne permet pas de médier le recrutement immunitaire. L'équipe de R. Patel a apporté une certaine précision à ce *zip code*. En effet, le recrutement de certains types de leucocytes semble médié par des modifications oligosaccharidiques si elles sont associées à la bonne protéine. Une illustration de cette notion est la suivante : les motifs sialyl Lewis X, reconnus

comme les ligands privilégiés des sélectines, sont des motifs présents sur d'autres protéines que les mucines, mais ils ne suffisent pas à induire des interactions (Varki 1997).

Un niveau de régulation supplémentaire serait intrinsèque à l'endothélium. En effet *R. Patel et al* ont montré que huit lits vasculaires différents ne répondent pas de manière équivalente après stimulation par du LPS, du TFN α ou de l'IL-1 β (Scott et al. 2013a). Ils ont en effet observé des variations d'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1 associées à une différence dans leurs capacités pro-adhésive envers les monocytes.

c. Rôle des glycosylations dans les tumeurs

Les processus de glycosylation font partie de la multitude de mécanismes cellulaires dérégulés dans les cancers. L'abondance de formes de O-glycosylations tronquées a été observée dans de nombreux cancers (Munkley 2016). Ces O-glycosylations tronquées sont connues sous le nom d'antigènes Tn ou sialyl Tn qui correspondent à une forme immature de mucines à base des *cores* de type 1 et 2. Différents mécanismes sont impliqués dans l'apparition de ces antigènes : régulation de l'expression de certaines glycosyltransférases ou régulation de leur localisation par des voies de signalisation activées par des proto-oncogènes. Ces antigènes ont la particularité de favoriser l'échappement tumoral vis-à-vis du système immunitaire et de stimuler leur pouvoir de migration. Parce qu'ils sont spécifiques des cellules tumorales, ce sont des cibles de choix pour des stratégies de thérapies ciblées (Eavarone et al. 2018). La dissémination métastatique est aussi favorisée par l'expression de glycosylations portant des motifs sLe^X qui sont reconnus par les sélectines, notamment la L-sélectine au niveau des vaisseaux lymphatiques (Bull et al. 2014; Bull et al. 2015). Les glycosylations peuvent aussi modifier l'activité ou la stabilité de certaines protéines favorisant le développement tumoral. La protéine PD-L1, dont l'activité est associée à la suppression de l'activité des LT CD8, peut être exprimée par les cellules tumorales et favoriser l'échappement à la surveillance immunitaire. Il a été montré que certaines glycosylations portées par PD-L1 augmentaient sa stabilisation (C. W. Li et al. 2016). Interférer avec les mécanismes participant à la glycosylation de PD-L1 potentialise l'effet antitumoral des anticorps monoclonaux anti-PD-L1.

IV.3 Glycosylations endothéliales et régulation du recrutement immunitaire

Le glycome endothélial est essentiel pour certaines fonctions de l'endothélium comme la formation de nouveaux vaisseaux, l'hémostase et les interactions avec les leucocytes, nécessaires au recrutement immunitaire.

a. Le glycocalyx endothélial

Le glycocalyx est une structure qui s'apparente à un gel riche en glycanes et protéoglycane (GAG) associé à la surface des cellules. Le glycocalyx endothélial possède plusieurs fonctions. En formant une interface entre l'endothélium et la circulation sanguine, il joue un rôle de barrière pour prévenir les échanges de solutés et les adhésions des composants sanguins tels que les leucocytes (Mulivor and Lipowsky 2002), les plaquettes et les globules rouges. Le glycocalyx agit également comme un réservoir pour de nombreuses molécules grâce aux charges apportées par les ions sulfates des GAGs (Hoogewerf et al. 1997). C'est notamment un réservoir pour les cytokines. Il prévient leur dégradation et participe à la mise en place du gradient local de chimiokines nécessaire au recrutement des leucocytes (Graham et al. 2019). Lors du processus inflammatoire, la MEC est réorganisée par la sécrétion de collagénase et de MMP par différents types cellulaires comme les neutrophiles et les macrophages. Cela participe à la libération des molécules piégées dans la MEC et le glycocalyx, comme le TGF β (Tatti et al. 2008) et les chimiokines (Schott et al. 2016). La perte du glycocalyx, désigné sous le terme de *shedding*, est une caractéristique de certaines réponses inflammatoires, également retrouvée après irradiation (Jaillet et al. 2017). L'amincissement du glycocalyx participerait au recrutement immunitaire en libérant les chimiokines piégées dans les GAGs et en libérant les sites de fixations des leucocytes. Des stratégies de maintien de ce glycocalyx pourraient prévenir l'inflammation et maintenir la fonctionnalité de l'endothélium en jouant un rôle de barrière (Mensah et al. 2017).

b. Modifications post-traductionnelles sur les molécules endothéliales impliquées dans le recrutement immunitaire

L'endothélium exprime un ensemble de protéines engagées dans toutes les étapes du recrutement immunitaire. Ces protéines sont modifiées de manière post-traductionnelle par des polysaccharides. Ces glycosylations participent à leur adressage à la membrane plasmique et, pour certaines d'entre elles, elles modulent leur fonction. Dans une revue, l'équipe de R. Patel a répertorié le nombre de sites potentiels de N-glycosylations retrouvés sur sept protéines

essentielles au recrutement immunitaire (cf [Étapes et acteurs du recrutement immunitaire](#)), à savoir ICAM-1 et 2, VCAM-1, P- et E-sélectine, JAM 3 et PECAM-1 (**Tableau 5**) (Scott and Patel 2013) . En ce qui concerne les O-glycosylations, il est plus difficile de réaliser la même étude car il n'existe pas d'enchaînement consensus d'acides aminés déterminant les sites de fixation.

Adhesion molecule	Human	Murine	Bovine	Porcine	Common	Human specific
ICAM-1	8	10	13	12	3	3
VCAM-1	6	7	3	5	3	3
E-selectin	9	11	10	7	2	3
P-selectin	11	12	11	11	6	2
PECAM-1	9	7	10	8	4	1
JAM 3	3	2	2	3	2	0
ICAM-2	6	5	6	6	3	1

Tableau 5 : Nombre de sites de N-glycosylations sur les molécules d'adhésion endothéliales en fonction des espèces.

Tiré de (Scott et al. 2013a)

Dans l'athérosclérose, il est admis que les monocytes/macrophages jouent un rôle dans l'initiation et le développement des plaques d'athéromes. L'équipe de R. Patel s'est intéressée au statut de glycosylation de la protéine ICAM-1 dans l'optique de comprendre quels sont les mécanismes fins qui régulent leur présence dans les lésions athérosclérotiques. Il a été mis en évidence une hypoglycosylation d'ICAM-1, c'est-à-dire la présence de structures immatures de type N-glycosylations hautement mannosylées, plutôt que des structures hybrides ou complexes *in vitro* en réponse à la cytokine pro-inflammatoire TNF α (Scott et al. 2013b) et *in vivo* dans des lits vasculaires pathologiques (Regal-McDonald et al. 2020). Cette forme hypoglycosylée d'ICAM-1 induit une adhésion de forte affinité pour les monocytes non classiques CD16⁺ (Regal-McDonald et al. 2019) ayant un rôle clé dans l'initiation et le développement des plaques d'athéromes.

c. Modification du glycome endothélial radio-induit et modification du recrutement immunitaire

Les rayonnements ionisants engendrent des modifications des glycosylations portées par les protéines. Cela a été montré au niveau des protéines du sérum après une irradiation

locale de la peau à forte dose chez la souris (Chaze et al. 2013; Guipaud et al. 2007). Chez l'Homme, des modifications de glycosylations de sept protéines majeures du sérum ont été observées chez dix patients traités par radiothérapie pour des tumeurs de la tête et du cou (Toth et al. 2016).

Les résultats d'une précédente thèse du laboratoire ont montré que le glycome endothélial était globalement modifié après une irradiation à 20 Gy, grâce à une étude des glycosylations par spectrométrie de masse Maldi-TOF (Jaillet et al. 2017). Dans ce travail, une étude transcriptionnelle ciblée rapporte que de nombreux gènes codant pour des enzymes impliquées dans différentes voies de glycosylations sont différentiellement exprimés après irradiation dans les cellules endothéliales *in vitro* et chez la souris. Inspirée par les travaux de l'équipe de R. Patel dans un contexte d'athérosclérose, cette étude a montré que l'abondance des N-glycosylations hautement mannosylées était augmentée après irradiation, et que ces glycosylations étaient impliquées dans l'adhésion des monocytes (THP-1) aux cellules endothéliales irradiées. Les glycosylations hautement mannosylées peuvent modifier les interactions entre les protéines et de ce fait les interactions entre les cellules. Cette étude suggère que la présence des glycosylations hautement mannosylées participerait au recrutement des monocytes en cas d'inflammation radio-induite. Peu de choses sont connues sur la régulation de ces glycosylations en cas d'irradiation.

IV.4 N-Glycosylations hautement mannosylées et mannosidases

Les glycosylations hautement mannosylées sont produites dans le RE puis transférées sur un oligopeptide dont la maturation se poursuit dans l'appareil de Golgi par ajout et retrait d'oses. Les mannosidases, dont le rôle est de catalyser l'hydrolyse des mannoses, jouent un rôle essentiel dans la biosynthèse des N-glycosylations des protéines. Les mannosidases réalisent une étape limitante de la maturation. Sans leur action, les glycosylations hybrides et complexes ne peuvent pas se former car les résidus branchés en position α 1,2- ne sont pas éliminés (**Figure 23**). On a longtemps pensé que les structures immatures de type N-glycane hautement mannosylées étaient vouées à la dégradation systématiquement via la voie des EDEMs (ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein). Cependant, elles semblent avoir des rôles en conditions physiologiques et pathologiques.

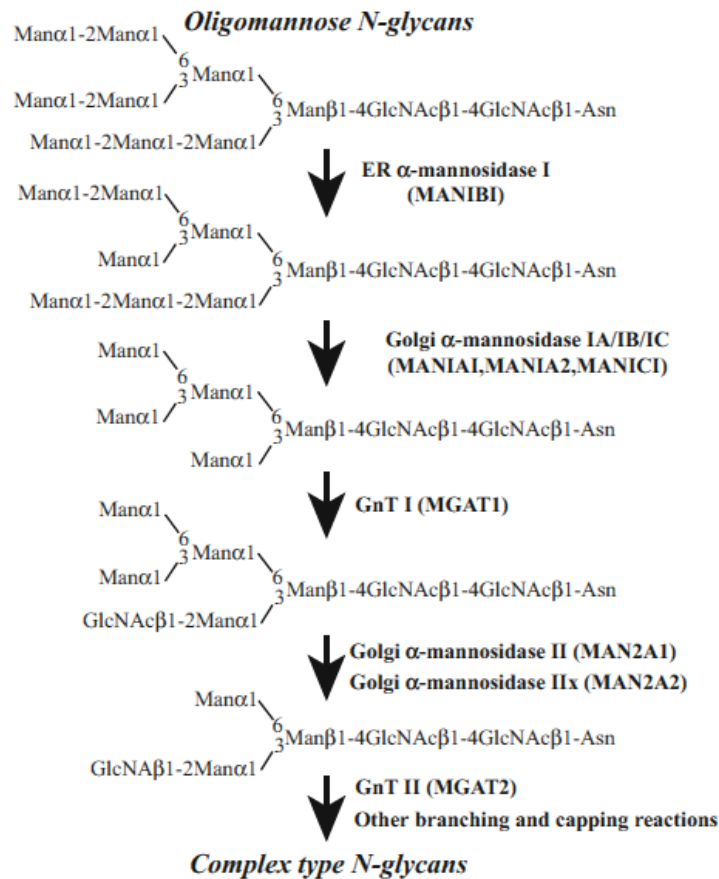


Figure 23 : Principales étapes de la maturation des mannoses. Structures des N-glycans générés lors des étapes de maturation des structures oligomannosylées (Man₉GlcNAc₂-Asn) aux structures complexes. Les enzymes catalysant les différentes étapes sont en caractère gras. Tiré de (K.W Moremen and Nairn 2014).

Il existe différentes mannosidases qui appartiennent au groupe des *Glycoside Hydrolase Family 47* (GH47) humaines (K.W Moremen and Nairn 2014) : une α 1,2 mannosidase dans le RE (MAN1B1), trois dans l'appareil de golgi (MAN1A1, MAN1A2 et MAN1C1) et trois autres EDEM1, EDEM2 et EDEM 3 qui ne participent pas à la maturation mais à une voie de dégradation. Leur action est illustrée dans la **figure 24**.

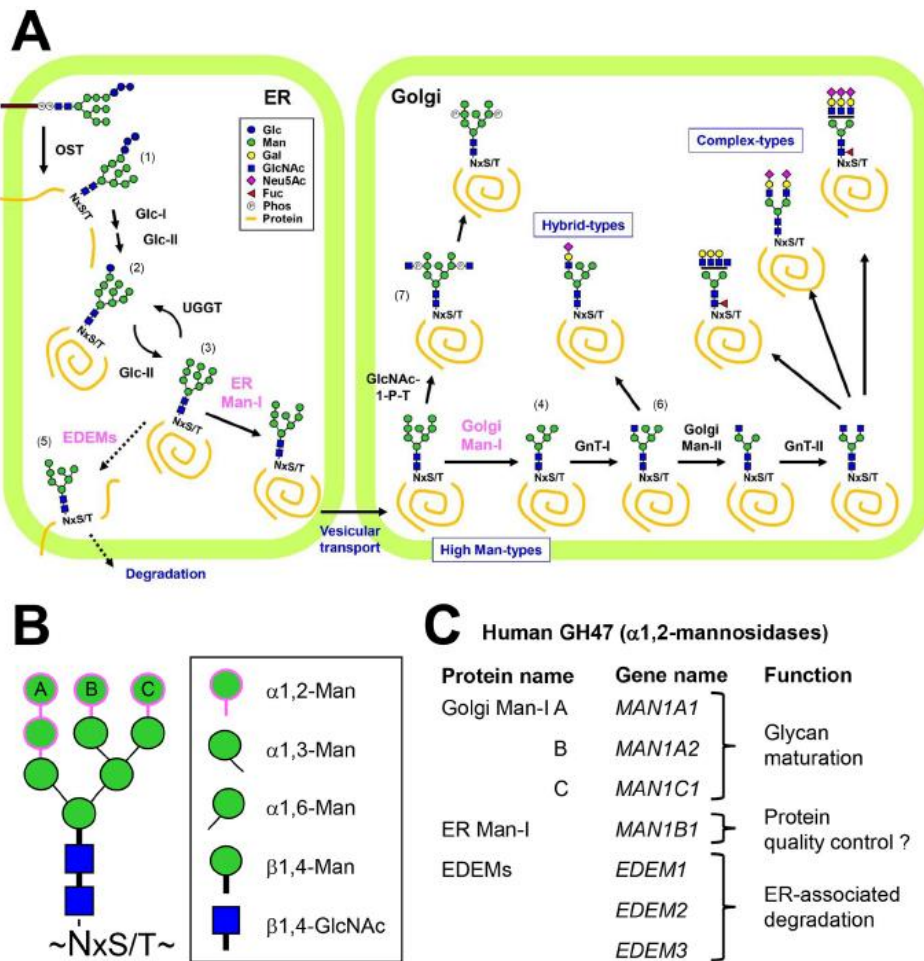


Figure 24 : Présentation de l'action des mannosidases.

A. l'oligosaccharide $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ lié aux lipides (1) est transféré aux protéines au début de la traduction dans le RE par une oligosaccharyltransférase (OST). (2) Deux résidus Glc sont hydrolysés par les glucosidases I (Glc-I) et II (Glc-II) du RE. Le $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ sur les protéines est reconnu par les chaperons calnexine et calréticuline et favorise le repliement des protéines. (3) Un autre résidu Glc est encore éliminé par Glc-II. Pour les protéines dépliées, un résidu Glc est retransféré aux N-glycanes par l'UDP-Glc:glycoprotéine glycosyltransférase (UGGT). (4) Les résidus Man liés en position α -1,2 sont hydrolysés par l' α -1,2-mannosidase I du RE (ER – Man I) et l' α -1,2-mannosidase I du Golgi (Man-I du Golgi), générant des structures $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. (5) Les 1,2 qui agissent également sur les protéines mal repliées (EDEM). (6) Un résidu GlcNAc est transféré aux structures $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ sur les protéines par la GlcNAc transférase I (GnT-I). Ces oligosaccharides sont ensuite traités et convertis en N-glycanes de type hybride et de type complexe. (7) Les GlcNAc-1-phosphates sont transférés à la position 6 des résidus Man sur les glycanes par la GlcNAc-1-phosphate transférase (GlcNAc-1-P-T). Les résidus GlcNAc sont éliminés pour générer des glycanes contenant du Man-6-phosphate.

B. Structure hautement mannosylée $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Les liaisons entre les résidus Man et GlcNAc sont indiquées. Les résidus Man liés en 1,2 sont surlignés en rose. A, B et C représentent les résidus Man terminaux liés en α -1,2 sur les bras A, B et C de la structure $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.

C, la famille des protéines GH47 chez l'homme. Il y a sept membres dans la famille GH47 du génome humain.

Tiré de (Z. C. Jin et al. 2018).

Conclusion

L'étude des modifications des glycosylations associées aux protéines d'interactions endothélium-leucocytes est une piste intéressante permettant d'approfondir les connaissances sur les mécanismes liés au recrutement immunitaire en situation pathologique. Dans le cas de la réponse des tissus sains à l'irradiation, plusieurs études ont suggéré que le recrutement des neutrophiles, des mastocytes, des lymphocytes ou encore des macrophages participait aux complications radio-induites tardives. Cependant, les mécanismes sous-jacents restent méconnus. Les interactions leucocytes-endothélium sont essentielles au processus multi-étape du recrutement immunitaire et font intervenir un vaste nombre de protéines. Les modifications d'ICAM 1 endothéliale par les glycosylations hautement mannosylées induisent une augmentation de l'adhésion des monocytes CD16⁺ non classiques dans un contexte de pathologie vasculaire de type athérosclérose. La mannosidase MAN1C1 est un régulateur potentiel de ces glycosylations dans ces pathologies. Certains résultats permettent d'établir un parallèle avec les toxicités radio-induites. En effet les travaux de thèse de C. Jaillet suggèrent que les glycanes hautement mannosylés participent également au recrutement des monocytes par l'endothélium irradié. L'étude transcriptomique associée à ces travaux a également montré la diminution de l'expression de la mannosidase MAN1C1, mais son rôle dans les interactions entre les monocytes et l'endothélium n'est pas connu. Comprendre les mécanismes précis participants au recrutement des monocytes/macrophages, potentiellement délétères pour les tissus sains est un point essentiel pour trouver des pistes thérapeutiques intéressantes pour limiter ou inhiber les complications tardives de la radiothérapie.

IV.5 Molécules ciblant les glycosylations hautement mannosylées

Il existe des molécules qui ciblent les glycosylations hautement mannosylées. Les lectines sont des protéines à potentiel thérapeutique intéressant car elles reconnaissent spécifiquement les glycosylations. Ces molécules sont également des outils intéressants pour explorer le rôle des oligomannoses. Elles proviennent en majorité des plantes, comme pour la Concanavaleine A (Con A) et *Hippeastrum hybrid Lectin* (HHL), mais certaines bactéries et cyanobactéries sont capables d'en produire. La Con A reconnaît les structures hautement mannosylées et complexes alors que HHL et CV-N sont plus spécifiques des oligomannoses. L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine ou VIH implique des interactions entre la cellule cible (LT CD4) et des glycanes hautement mannosylés portés par les glycoprotéines gp120 du virus. Une lectine provenant d'une cyanobactérie, la cyanovirine N (CV-N), constitue

une piste thérapeutique intéressante, malgré la difficulté de production de cette protéine, car elle inhibe la fusion de l'enveloppe du virus avec les LT (Lotfi et al. 2018).

Des compétiteurs du mannose, comme l'alpha-méthyl mannose, sont capables d'inhiber les interactions médiées par les glycosylations hautement mannosylées *in vitro* (Jaillet et al. 2017; Scott et al. 2012). Des travaux suggèrent aussi que la voie du *peroxisome proliferator activated receptor* γ (PPAR γ) serait impliquée dans l'augmentation des glycanes hautement mannosylés via les α 1,2 mannosidases MAN1C1 et MAN1A2. L'utilisation d'un agoniste de PPAR suffit à rétablir l'activité mannosidase et à diminuer les glycosylations hautement mannosylées après un traitement au TNF α . Compte tenu des parallèles entre la situation pathologique vasculaire athérosclérotique et les observations faites à l'IRSN, cibler cette voie pourrait être intéressant dans le contexte du recrutement monocytaire radio-induit. Enfin, la kifunesine est un inhibiteur de l'activité mannosidase de classe I restreinte aux études expérimentales. La **Figure 25** rassemble l'ensemble de ces données.

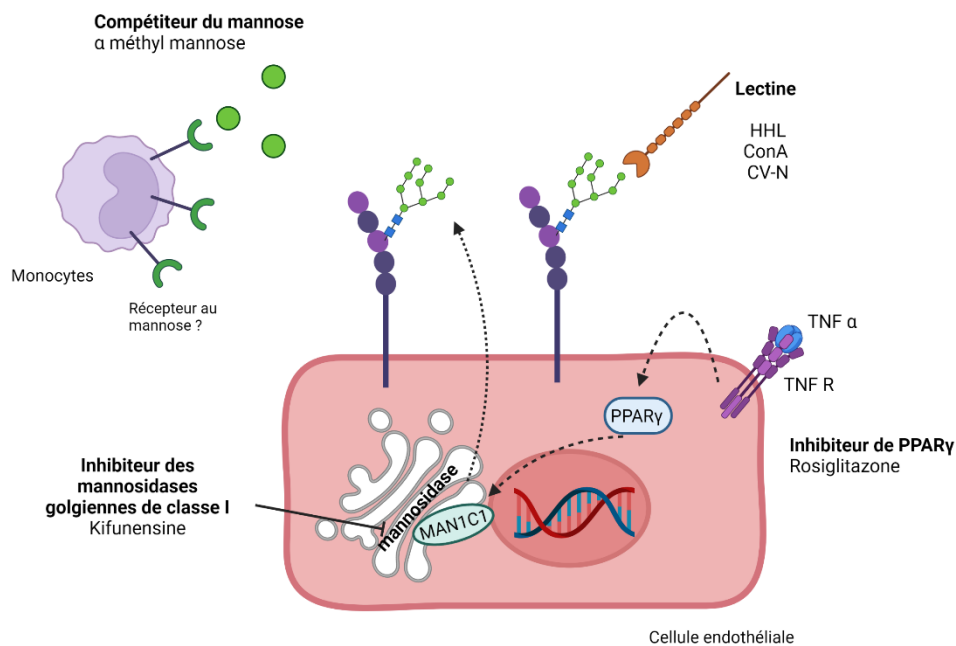


Figure 25 : Moyens de régulation des N-glycosylations hautement mannosylées.

Problématique & Objectifs

Les connaissances des mécanismes responsables des complications tardives de la radiothérapie restent encore incomplètes. Cela s'explique par la complexité de la réponse engagée, qui mobilise de nombreux acteurs moléculaires, cellulaires, tissulaires et systémiques dans un temps qui peut s'étendre sur plusieurs mois, années voire décennies.

Les travaux du laboratoire de radiobiologie des expositions médicales (LRMED) participent à mieux comprendre la réponse des cellules endothéliales après irradiation, un élément déterminant dans l'établissement des complications radio-induites tardives. Les cellules endothéliales peuvent entrer en apoptose, devenir sénescents, changer de phénotype vers un type mésenchymateux, ou encore acquérir un phénotype pro-coagulant et pro-inflammatoire. L'inflammation et le recrutement immunitaire massif, notamment des macrophages, est probablement un élément majeur dans l'établissement de l'environnement inflammatoire caractéristique des lésions radio-induites tardives. Comme l'endothélium joue un rôle clé dans le processus multi-étape du recrutement immunitaire, il est intéressant de mieux comprendre comment l'irradiation influence le processus de recrutement par les cellules endothéliales. Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait ainsi ouvrir des voies pour moduler ce recrutement afin d'agir sur les lésions radio-induites.

L'objectif général de cette thèse est de mettre en lumière des acteurs moléculaires endothéliaux intéressants impliqués dans le recrutement des monocytes / macrophages radio-induit (**Figure 26**). De cet objectif principal ont découlé plusieurs sous objectifs :

1. Évaluer le rôle de l' α -1,2 mannosidase de classe I MAN1C1 dans l'augmentation des N-glycosylations hautement mannosylées responsables de l'adhésion des monocytes sur l'endothélium irradié et dans les interactions radio-induites entre l'endothélium et les monocytes *in vitro*.
2. Mettre en place un outil robuste pour évaluer la migration transendothéliale des monocytes *in vitro* en complément de l'outil permettant d'évaluer l'adhésion des monocytes en condition de flux déjà disponible au laboratoire.
3. Évaluer l'implication d'une autre glycosylation endothéliale (motif sLe^x) dans l'adhésion radio-induite des monocytes *in vitro*.
4. Évaluer le rôle des couples récepteurs / ligands CCR2/ CCL2 et CX3CR1/CX3CL1 dans le recrutement des monocytes *in vitro*.

- Évaluer le rôle des N-glycosylations hautement mannosylées dans le recrutement des macrophages au sein des tissus irradiés *in vivo* à l'aide de modèles murins de toxicités intestinales radio-induites.

Mieux connaître les acteurs moléculaires impliqués dans le recrutement des monocytes radio-induit pourrait permettre de mieux comprendre l'origine de l'accumulation persistante des macrophages après irradiation. Dans l'hypothèse où la présence de macrophages est un facteur délétère participant aux complications radio-induites, limiter cette infiltration pourrait être un levier thérapeutique intéressant.

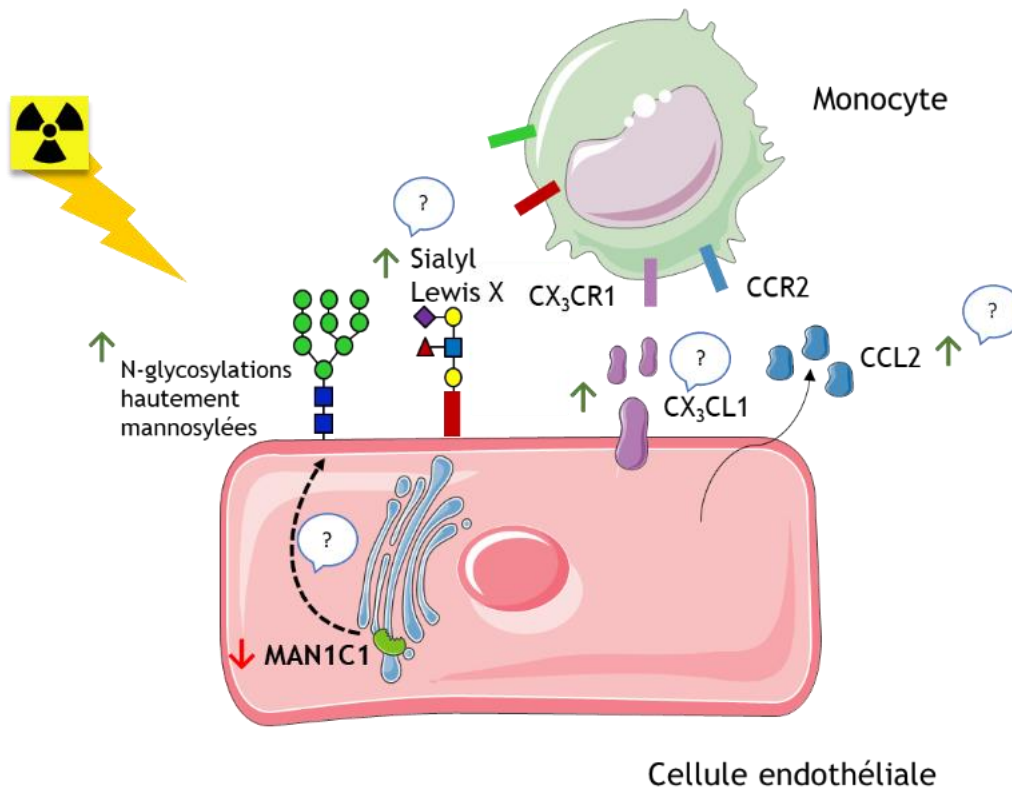


Figure 26 : Illustration schématique des différents acteurs étudiés potentiellement impliqués dans le recrutement des monocytes par l'endothélium irradié.

Au début de ce travail, il était établi que l'expression du gène *man1C1* diminue après irradiation *in vitro*, que les N-glycanes hautement mannosylés sont plus exprimés à la surface des cellules irradiées, et que ces structures sont responsables de l'augmentation de l'adhésion radio-induite des monocytes en condition de flux. D'autre part, il avait été montré que les structures portant des motifs sialylés sont également plus exprimées.

Résultats

La plus grande partie du travail de la thèse fait l'objet de l'article, présenté ci-après, portant sur le rôle de la mannosidase MAN1C1 dans le recrutement des monocytes par l'endothélium irradié. Nous avons également réalisé des expériences pour évaluer l'implication d'une autre glycosylation endothéliale, le motif sLe^X, dans l'adhésion radio-induite des monocytes *in vitro*, ainsi que le rôle des couples récepteurs/ligands CCR2/CCL2 et CX3CR1/CX3CL1. Ces expériences sont rassemblées dans la partie présentant les résultats complémentaires *in vitro*. Afin de compléter nos expériences *in vitro* sur l'axe des N-glycosylations hautement mannosylées, nous avons réalisé des expériences chez la souris dans le but d'évaluer le rôle de ces glycosylations dans l'infiltration des macrophages et dans les lésions radio-induites. Les stratégies que nous avons mises en place ainsi que les résultats associés sont présentés dans la partie résultats complémentaires *in vivo*.

I. Article de thèse

Objectifs

Les dommages aux tissus sains dans le champ de l'irradiation sont à l'origine des complications tardives de la radiothérapie. La réponse immunitaire chronique est un aspect important dans le développement des effets délétères de la radiothérapie. Le rôle potentiel des macrophages a été souligné dans différentes études, mais peu de choses sont connues sur les mécanismes aboutissant à leur infiltration dans les tissus irradiés. L'endothélium vasculaire a un rôle central dans les étapes du recrutement des cellules immunitaires depuis la circulation sanguine, car il promeut l'adhésion et la migration transendothéliale. Les cellules endothéliales sont le siège de différentes réponses après irradiation à forte dose. Il a été montré que les cellules endothéliales irradiées à 20 Gy présentent un phénotype pro-adhésif pour les monocytes en condition de flux. Ce phénotype est en partie médié par les N-glycosylations hautement mannosylées, dont l'expression est augmentée à la surface des cellules endothéliales après irradiation. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au rôle de l' α 1,2 mannosidase golgienne de classe I (MAN1C1) endothéliale dans la régulation des interactions entre les monocytes et les cellules endothéliales irradiée *in vitro*. En effet, cette enzyme régule les structures glycosylées hautement mannosylées et il avait été montré dans un précédent travail que l'expression du gène codant pour cette enzyme était diminuée après irradiation. Nous nous sommes en particulier intéressés aux deux étapes clés du recrutement des monocytes, l'adhésion des monocytes soumis à un flux et la migration transendothéliale, que nous avons modélisées *in vitro* en utilisant des techniques d'imagerie en temps réel. Pour cette étude, nous avons modulé l'expression de MAN1C1 par siRNA et transduction lentivirale et évalué l'impact de ces sous- et surexpression sur ces deux étapes du recrutement.

Résultats

En complément de la technique d'adhésion en condition de flux, nous avons mis au point une technique permettant de visualiser et quantifier la migration transendothéliale grâce à la création d'une lignée de monocytes THP-1 intrinsèquement fluorescente et au système d'imagerie en temps réel IncuCyte. Nous avons montré que la transmigration des monocytes est stimulée par l'irradiation des cellules endothéliales et cela de façon dose dépendante. Nous avons montré que l'extinction de MAN1C1 induit une augmentation de l'adhésion et une baisse de la transmigration des THP-1. De manière inverse la surexpression de MAN1C1 induit

l'inhibition de l'adhésion et une augmentation de la transmigration des THP-1. Le suivi des N-glycosylations hautement mannosylées dans les HUVECs par cytométrie en flux à l'aide de lectines fluorescentes a permis d'associer une augmentation des N-glycosylations hautement mannosylées à l'inhibition de MAN1C1. En revanche l'effet de la surexpression de MAN1C1 sur les N-glycosylations hautement mannosylées n'a pas pu être mis en évidence.

Conclusion

Ce travail suggère un rôle de la mannosidase MAN1C1 dans la régulation du recrutement des monocytes après irradiation. Ce recrutement pourrait impliquer les N-glycosylations hautement mannosylées, régulées par cette enzyme. Étant donné le rôle des macrophages dans les lésions radio-induites, mais aussi dans le contrôle tumoral, ce travail permet d'envisager de moduler la régulation de ce recrutement en ciblant ces glycosylations.

A role for the endothelial α -mannosidase MAN1C1 in radiation-induced immune cell recruitment

Ségolène Ladaigue,^{1,2} Anne-Charlotte Lefranc,¹ Khadidiatou Balde,¹ Monica Quitoco,¹ Emilie Bacquer,¹ Didier Busso,³ Guillaume Piton,³ Jordane Dépagne,³ Nathalie Déschamps,⁴ Valérie Buard,¹ Georges Tarlet,¹ Agnès François,¹ Vincent Paget,¹ Fabien Milliat,¹ and Olivier Guipaud^{1,5*}

¹ IRSN, Radiobiology of Medical Exposure Laboratory (LRMed), Human health radiation protection unit, 92260 Fontenay-Aux-Roses, France

² Sorbonne University, Doctoral College, 75005 Paris, France

³ CIGEx, Université de Paris, Université Paris-Saclay, Inserm, CEA, Institut de Biologie François Jacob, iRCM, UMR Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Fontenay-aux-Roses, France.

⁴ Institut de Biologie François Jacob (IBFJ), Institute of Cellular and Molecular Radiobiology, CEA, UMR967 INSERM, 96265 Fontenay aux Roses, France.

⁵ Lead Contact

*Correspondence: olivier.guipaud@irsn.fr;

SUMMARY

Radiation therapy damages tumors and surrounding normal tissues, likely in part through the recruitment of immune cells. Endothelial high-mannose N-glycans are particularly involved in monocyte-endothelium interactions. Trimmed by the class I α -mannosidases, these structures are quite rare in normal conditions. Here, we show that the expression of the endothelial α -mannosidase MAN1C1 protein decreases after irradiation. We modeled two crucial steps of monocyte recruitment after irradiation through the development of *in vitro* real-time imaging models. Inhibition of MAN1C1 expression by siRNA gene silencing increases the abundance of high-mannose N-glycans and improves the adhesion rate of monocytes on endothelial cells in flow conditions. In contrast, MAN1C1 inhibition decreases radiation-induced transendothelial migration of monocytes. Consistently, overexpression of MAN1C1 in endothelial cells using lentiviral vectors decreases monocyte adhesion and enhanced transendothelial migration. Hence, we propose a role for endothelial MAN1C1 in the recruitment of monocytes, particularly in the adhesion step to the endothelium.

INTRODUCTION

Ionizing radiation delivered during radiation therapy damages tumors and surrounding normal tissue, possibly resulting in late effects that can reduce patients' quality of life. The injury is partly due to the massive recruitment of immune cells, in particular macrophages, but with distinct mechanisms in normal tissue and tumors (Francois et al., 2013; Meziani et al., 2018a; Meziani et al., 2018b; Mondini et al., 2019; Morrison, 2016). In this process, the irradiated vascular endothelium plays a prominent role as it is the gateway for circulating immune cells to enter injured tissues (Guipaud et al., 2018; Wijerathne et al., 2021).

Immune cell recruitment involves cell-cell specific interactions mediated by glycosylation of surface adhesion proteins (Schjoldager et al., 2020). Endothelial N-glycans appear to be particularly involved in monocyte-endothelium interactions for the recruitment of monocytes during inflammation (Regal-McDonald and Patel, 2020). High-mannose N-glycans are immature structures generally trimmed by mannosidases under normal conditions (Stanley et al., 2009). However, in an inflammatory context triggered by TNF α stimulation, atherosclerosis or oxidative stress, these structures are more abundant and responsible for the adhesion of monocytes to the endothelium (Chacko et al., 2011; Scott et al., 2012), at least in part through the glycosylation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) (McDonald et al., 2020; Scott et al., 2013a).

The glycome of endothelial cells is profoundly altered under radiation exposure (Jaillet et al., 2017). Endothelial cells exhibit a greater abundance of high-mannose N-glycans that are responsible for the radiation-induced increase in monocyte adhesion. Associated with these changes, a transcriptomic study showed a decrease in the expression of the endothelial *man1c1* gene that encodes the class I α -mannosidase MAN1C1 (Jaillet et al., 2017). However, the role of this enzyme in monocyte adhesion in response to a proinflammatory signal remains elusive.

This present work shows that endothelial MAN1C1 protein expression decreases after irradiation. We observe that inhibition of MAN1C1 expression increases the abundance of high-mannose N-glycans and promotes the adhesion rate of monocytes on endothelial cells in flow conditions. In contrast, MAN1C1 inhibition impairs radiation-induced transendothelial migration of monocytes. Consistently, MAN1C1 overexpression in endothelial cells decreases monocyte adhesion and enhanced transendothelial migration. Collectively, our results show a role for MAN1C1 in adhesion of monocytes, the first essential step of immune cell recruitment.

RESULTS

The abundance of endogenous endothelial MAN1C1 protein decreases in HUVECs after irradiation

Since the expression of the *man1C1* gene decreased in HUVECs following radiation exposure (Jaillet et al., 2017), we wondered if protein abundance is also regulated by irradiation. HUVECs were irradiated at 20 Gy and proteins were collected at different times post-irradiation. The abundance of MAN1C1 protein was assessed by Western blot, showing a decrease in the abundance of MAN1C1 in response to ionizing radiation at days 2 and 4 post-irradiation (**Figure 1 and Figure S1**). To ensure the specificity of the band detected by the anti-MAN1C1 antibody, we constructed a lentiviral vector (pTrip-MAN1C1) to overproduce the Myc-tagged MAN1C1 fusion protein under the MND promoter, as well as a lentiviral vector expressing the luciferase protein (pTrip-LUC), instead of MAN1C1, as a control (**Figure S2**). Transduction rate was assessed by microscopy fluorescence and flow cytometry using the fluorescence of the eGFP protein expressed under the hPGK promoter (**Figure S2B and S2C**). Protein extracts of the transduced cells with pTrip-MAN1C1 shows a strong overexpression of MAN1C1 in comparison of cells transduced with the control lentiviral particles (**Figure 1A and Figure S2D**). Western blot analysis of proteins at later times shows that MAN1C1 expression drops even more drastically with time in irradiated HUVECs compared to unirradiated HUVECs (**Figure S1B**). To find out how MAN1C1 could be regulated by ionizing radiation, we used the Pathway Studio software to establish relationships between the four class I α -mannosidases MAN1A1, MAN1A2, MAN1B1 and MAN1C1, their upstream regulatory entities, and the term "Radiation" as a treatment. **Figure 1C** displays the putative regulatory network of the four class I α -mannosidases. The network proposes a pathway for the inhibition of MAN1C1 by ionizing radiation via the classical DNA repair signaling pathway that involves ATM, NF- κ B, IL1B, TNF α and/or TGF β , and through less described effectors such as miR425 and miR206 miRNAs.

Endothelial MAN1C1 is involved in radiation-induced monocyte adhesion on a HUVEC monolayer under flow conditions

Previous work showed that adhesion of THP-1 monocytes to TNF α -stimulated or irradiated HUVECs is improved under flow conditions (Chacko et al., 2011; Jaillet et al., 2017). This adhesion was at least partly due to the overexpression of high-mannose N-glycans at the surface of endothelial cells. MAN1C1 oversees high-mannose N-glycan trimming in the cell. To investigate the role of MAN1C1 in immune cell recruitment, we opted for a silencing and overexpression strategy and evaluate the consequences on monocyte adhesion and transendothelial migration. The **Figure S3** presents the overall strategy and experimental designs used in this work. We first inhibited endothelial MAN1C1 expression using siRNA to quantify THP-1 cell adhesion under flow condition on a HUVEC layer

irradiated at 20 Gy. At the time of adhesion assay, the inhibition of MAN1C1 gene expression was about 90% in irradiated and non-irradiated HUVECs (**Figure 2A**). However, this inhibition is not visible in Western blot (**Figure 2B**). The endogenous MAN1C1 protein is very little expressed in HUVECs, which makes it impossible to quantify the signal decrease. Yet, MAN1C1 silencing leads to an increase in high-mannose N-glycans (**Figure 2C**) whose abundance was assessed by the detection of the concanavalin A lectin conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC-Con A) by flow cytometry. The **Figure S4** shows the gating strategy used in flow cytometry to analyze the samples, as well as the individual values. We then evaluated the effect of MAN1C1 inhibition on monocyte adhesion under flow condition. The results show a significant increase in adhesion compared to HUVECs transfected with a control siRNA under non-irradiated condition (**Figure 2D and 2E, Videos S1 and S2**). The levels of adhesion are equivalent in unirradiated and irradiated samples, suggesting that the increase due to MAN1C1 inhibition cannot be greater. We then used the reverse strategy by overexpressing the MAN1C1 protein with a lentiviral vector (**Figures S1 and S3**). The results show a significant MAN1C1 overexpression at the time of THP-1 monocyte adhesion assay under flow condition (**Figure 3A**). Using flow cytometry, we observe that the abundance of high-mannose structures was not affected by overexpression (**Figure S5**). However, we show a statistically significant decrease in monocyte adhesion in irradiated and non-irradiated HUVECs that overexpress MAN1C1, compared to control HUVECs (**Figure 3B and 3C, Videos S3 and S4**).

To go further, we wanted to know if MAN1C1 is involved in the transendothelial migration of monocytes. For this purpose, we used the same strategy of inhibition and overexpression of MAN1C1 in a model of transendothelial migration assessed by real-time imaging that we developed in the laboratory.

Establishment of a model of transendothelial migration of monocytes assessed by real-time imaging

To this end, we analyzed chemotactic transendothelial migration of THP-1 cells in real time with the Incucyte[®]S3 live cell analysis system. We first constructed, sorted and cloned by flow cytometry a THP-1 line stably expressing the red fluorescent protein mKate2-N (**Figure S6**). With this cell line, the Incucyte[®]S3 software reproducibly detects by segmentation the THP-1 cells that have migrated and adhere to the underside of the permeable membrane (**Figure S6C**). Using one of the selected THP-1 mKate2 clones, we developed the conditions for MCP1 chemotactic-induced migration through a monolayer of non-irradiated HUVECs. We show that migration hardly occurs in the absence of MCP1 and is dependent on MCP1 concentration (**Figure 4, Videos S5 and S6**). We chose the concentration of 100 nM MCP1 to perform all the following transendothelial migration assays. To investigate whether the assay efficiency could be dependent on the THP-1 mKate2 clone, we tested three clones, obtained

from three independent electroporations, for their ability to perform transendothelial migration. The results showed similar abilities between the three clones (**Figure S7**) and allowed us to choose the clone 5-H E5 to perform further experiments. We verified by flow cytometry that this clone exhibits the same characteristics as THP-1 in terms of the main surface markers expressed or not by classical monocytes (CD45, CD14, CD16, CX3CR1, CCR2). The results show that approximately 95% of THP-1 and THP-1 mKate2 clone 5-H E5 cells express CD45, CD14, and CCR2, but not CD16 and CX3CR1, as expected (**Figure S8**). Using the adhesion assay under flow conditions, we also show that this clone retains the ability of THP-1 cells to adhere more to irradiated endothelial cells (**Figure S8E**).

Transendothelial migration of monocytes depends on HUVEC irradiation

We then investigated whether the transendothelial migration of monocytes is dependent on radiation exposure of HUVECs, a prerequisite for studying the players involved in radiation-induced immune cell recruitment. The results show a clear dose-dependent effect of radiation exposure on the passage rate of THP-1 through the layer of HUVECs (**Figure 5, Videos S7 and S8**). On the other hand, irradiation induces almost no passage of THP-1 in the absence of MCP1 (**Figure 5B**), suggesting that radiation-induced migration may be driven by an active process. We chose the 20 Gy dose for the rest of the transendothelial migration experiments, since it gives the greatest differential effect compared to the unirradiated condition. We verified that irradiation at 20 Gy does not cause massive disruption of the endothelial barrier by a FITC-Dextran permeability assay performed with a chemotactic transendothelial migration plate (**Figure S9**). We show that although irradiation at 20 Gy increases the passage of Dextran by a factor of 4, it remains much lower than the passage of Dextran in the absence of an endothelial barrier which increases by a factor of 100 (**Figure S9C**). We checked that independent THP-1 mKate2 clones transmigrate similarly through the layer of HUVECs irradiated at 20 Gy, confirming that the 5-H E5 clone is suitable for the assay (**Figure S7**).

Transendothelial migration of monocytes is modified by the level of endothelial MAN1C1 expression

We used the same strategy as for the study of adhesion under flow to study the consequences of MAN1C1 inhibition/overexpression on monocyte transendothelial migration (see **Figure S3** for experimental design). First, treatment of HUVECs with siRNAs against MAN1C1 significantly decreases the rate of THP-1 passage in irradiated and non-irradiated conditions (**Figure 6, Videos S9 and S10**). One could even argue that the decrease could have been greater with a better rate of MAN1C1 inhibition (here of about 60%) (**Figure 6C**), but this rate could never drop lower in lentiviral transduction experiments. Next, we overexpressed MAN1C1 in HUVECs before performing a transendothelial migration assay. In contrast to the results obtained with MAN1C1 inhibition, the overexpression improves transendothelial migration, especially after irradiation (**Figure 7, Videos S11**

and S12). Finally, since a treatment by $\text{TNF}\alpha$ decreases MAN1C1 gene expression and increases high-mannose N-glycans expression, we tested the consequence of this treatment on transendothelial migration. HUVECs treated with $\text{TNF}\alpha$ results in a significant decrease in THP-1 migration through the HUVEC layer (**Figure S10**), like what is observed upon silencing of MAN1C1.

DISCUSSION

Radiation exposure of endothelial cells downregulates MAN1C1 gene expression, increases the expression of high-mannose N-glycans that MAN1C1 trimmed, and enhances monocyte adhesion under flow condition, which is partly dependent on high-mannose N-glycans (Jaillet et al., 2017). However, the role of MAN1C1 in radiation-induced monocyte adhesion to the vascular endothelium remains elusive. In this study, we examined the consequences of modulating the α -mannosidase MAN1C1 expression on the interactions between THP-1 monocytes and HUVECs under irradiation. To this end, we developed and used two real-time imaging *in vitro* models of (i) adhesion under flow condition and (ii) transendothelial migration. The major finding of this study suggests that MAN1C1 regulates the interactions between THP-1 and HUVECs in the context of irradiation. Hence, we propose a role for endothelial MAN1C1 in the recruitment of monocytes, particularly in the adhesion step to the endothelium.

We show that ionizing radiation downregulates the expression of MAN1C1 protein, reinforcing the hypothesis that this enzyme plays a role in high-mannose N-glycan-dependent radiation-induced monocyte adhesion. Using *in silico* pathway analysis, we identify that this regulation could take place through $\text{TNF}\alpha$, IL1B and and/or TGF- β signaling pathways which are induced by radiation exposure (Hallahan et al., 1989; Hallahan et al., 1994; Ishihara et al., 1993; Martin et al., 2000; Pabst et al., 2010; Rubin et al., 1995; Schaeue et al., 2012) and has been linked to negative regulation of MAN1C1 (Chacko et al., 2011; Pabst et al., 2010). It might be interesting to explore the involvement of the NF- κ B pathway, which is particularly involved in radiation-induced inflammation in regulating cytokines (Magne et al., 2006), to know if the expression of the MAN1C1 gene could be more precisely regulated by this pathway.

Together, these result support that radiation-induced downregulation of MAN1C1 is involved in monocyte adhesion to irradiated endothelial cells. This could take place by increasing the expression of high-mannose N-glycans, which have been shown to drive monocyte adhesion (Chacko et al., 2011; Jaillet et al., 2017). MAN1C1 gene silencing increases the expression of high-mannose N-glycans, improves the adhesion rate of monocytes on endothelial cells in flow conditions and decreases radiation-induced transendothelial migration of monocytes. Overexpression of MAN1C1 produces exactly the opposite effect on monocyte adhesion and transmigration, reinforcing the results obtained

with gene silencing. The inhibition of transendothelial migration by MAN1C1 silencing could be due to the increased expression of high-mannose N-glycans, which would retain monocytes on the surface of endothelial cells and prevent them from migrating through the layer of HUVECs. Furthermore, we show that treatment of HUVECs with TNF α reduces transendothelial migration, in line with the results of MAN1C1 silencing. Previous work had shown that treatment of HUVECs with TNF α leads to an increase in high-mannose N-glycans (Chacko et al., 2011; Regal-McDonald and Patel, 2020; Scott et al., 2013a), as does MAN1C1 inhibition in these experiments. Thus, our results on the functional consequences of TNF α treatment on transendothelial migration of THP-1 strengthens the hypothesis of a role for MAN1C1 in the regulation of monocyte-endothelial cell interactions.

There are four class I α -mannosidases in humans : one endoplasmic reticulum α -mannosidase I (MAN1B1) and three Golgi apparatus α -mannosidases (MAN1A1, MAN1A2, MAN1C1) (Herscovics, 2001). In this work, we focused on MAN1C1 because it was the only gene to be differentially expressed following irradiation in endothelial cells *in vitro* (Jaillet et al., 2017). However, in this previous work, it was shown that MAN1A1 and MAN1B1 genes are downregulated in the whole irradiated intestine, indicating that other class I α -mannosidases can be modulated by ionizing radiation. α -mannosidases are essential in the N-glycan biosynthetic chain. They work together to trim high-mannoses N-glycans and allow the maturation of N-glycans into hybrid and complex oligosaccharides (Stanley et al., 2009). Because these changes affect cell growth, cell-cell interactions, cell motility and protein phosphorylation, the activity of these enzymes must be tightly regulated (Molinari, 2007). Abnormalities in the expression of these enzymes can lead to various diseases, including cancer. In particular, MAN1C1 potentially acts as a tumor suppressor (Li et al., 2018; Tu et al., 2017).

Adhesion molecules play a key role in cell migration across the vascular endothelium. Ionizing radiation drives a persistent upregulation of ICAM-1 expression in endothelial cells *in vitro* (Gaugler et al., 1997) and increases adhesiveness of human aortic endothelial cells (Khaled et al., 2012). High-mannose N-glycans on ICAM-1 result in THP-1 monocyte adhesion independent of ICAM-1 and E-selectin expression (Chacko et al., 2011), as well as primary monocyte rolling and adhesion (Scott et al., 2013a; Scott et al., 2013b). Previous studies have shown functional consequences of increased high-mannose ICAM-1 that selectively recruits nonclassical/intermediate (CD16⁺) over classical (CD16⁻) monocytes in a Mac-1-dependent manner (Regal-McDonald et al., 2019). In our study, THP-1 cells exhibit cell surface markers of classical monocytes (CCR2⁺, CD14⁺, CD16⁻), suggesting that it would be necessary to investigate interaction of primary monocytes and subsets of monocytes using our *in vitro* models. Studies have shown that the high-mannose ICAM-1 glycoform is present in mouse and human atherosclerotic lesions (Regal-McDonald et al., 2020; Scott et al., 2012) and positively correlates with

macrophage content in these lesions. However, it is not known whether recruitment is exclusively dependent on ICAM-1. On the other hand, the surface proteins that exhibit a high-mannose N-glycans content are not known in the context of irradiation, a much broader stress than TNF α treatment alone.

Collectively, this work supports that radiation-induced downregulation of MAN1C1 is involved in monocyte adhesion to irradiated endothelial cells through the increased expression of high-mannose N-glycans. Nevertheless, the role of MAN1C1 and high-mannose N-glycans in the recruitment of monocytes warrant further investigation *in vivo*. The future direction will investigate changes in endothelial cell glycosylation *in vivo* and determine whether irradiation does indeed down-regulate endothelial MAN1C1 and up-regulate high-mannose N-glycans. It will also be necessary to determine whether these glycosidic structures play a key role in monocyte recruitment, and possibly which monocyte subtypes are recruited in this way. Finally, it will be interesting to determine if this recruitment influences radiation-induced pathologies and tumor control in the context of radiation therapy. In this case, an interesting direction will be to interfere with this recruitment pathway by using available or under development molecules that target high-mannose N-glycans (Krautter and Iqbal, 2021; Regal-McDonald and Patel, 2020).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Philippe Peron (Sanofi-Aventis, Chilly-Mazarin, France) for his availability and his precious advice on the endothelial transmigration assay, and to Dr F. Pflumio (UMR Stabilité Génétique, Cellules Souches et Radiations, CEA, Fontenay-aux-Roses, France) for making available the lentivirus cell culture laboratory of the IRCM (CEA, Fontenay-aux-Roses, France). We thank Dr. Jérôme Lebeau (IRCM, CEA, Fontenay-aux-Roses, France) for his help in flow cytometry and Dr Jan Baijer (IRCM, CEA, Fontenay-aux-Roses, France) for making available the cytometry platform of the IRCM. This work is supported by Electricité de France (Groupe Gestion Projet Radioprotection) and the Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (ROSIRIS program). The funding agencies were not involved in any research plan relative to the study design, data collection and analysis, decision to publish, or drafting of the manuscript.

Author contributions

S.L. and O.G. conceived and designed the experiments. D.B. supervised the lentiviral vector constructions. S.L., A.F.L, K.B., M.Q., E.B., G.P., J.D., N.D., V.B., G.T. and O.G. performed experiments. S.L., D.B., G.P. and O.G. wrote the original manuscript. S.L., V.P., A.F., F.M. and O.G. reviewed and edited the manuscript. Funding acquisition was done by F.M. and O.G. O.G. supervised the project. All authors contributed to the manuscript.

Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

MAIN FIGURES TITLES

Figure 1. The endogenous MAN1C1 protein is downregulated in HUVECs after irradiation. See also Figures S1 and S2.

Figure 2. Increased monocyte adhesion under flow condition on a HUVEC monolayer treated with siRNA against MAN1C1. See also Figures S3 and S4, Videos S1 and S2.

Figure 3. Decreased monocyte adhesion under flow condition on a HUVEC monolayer overexpressing

Figure 4. Transendothelial migration of THP-1 monocytes is dependent on the concentration of MCP1. See also Figures S6-S8, Videos S5 and S6.

Figure 5. Transendothelial migration of THP-1 monocytes is dependent on the dose of radiation. See also Figures S7 and S9, Videos S7 and S8.

Figure 6. Decreased transendothelial migration of THP-1 monocytes on a HUVEC monolayer treated with siRNA against MAN1C1. See also Videos S9 and S10.

Figure 7. Increased transendothelial migration of THP-1 monocytes on a HUVEC monolayer overexpressing MAN1C1. See also Figures S10, Videos S11 and S12.

STAR METHODS

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Olivier Guipaud (olivier.guipaud@irsn.fr).

Materials availability

Plasmids generated in this study have been deposited to Addgene (unique identifier, under validation).

Data and code availability

- This paper does not report original code.
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Cells

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs, pooled donors, newborn, male/female mixed, product code C2519A, batch number 0000465419) from Lonza were grown at 37 °C with 5% CO₂ in EBM-2 MV medium containing 5% FBS (Lonza). THP-1 cells from ATCC (LGC Standards, ATCC Number TIB-202, lot number 63176297) were grown at 37 °C with 5% CO₂ in RPMI 1640 medium (ATCC modification), containing 10% heat inactivated FBS (Thermo Fisher Scientific), 1% penicillin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific) and 50 mM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). Cells were authenticated by the suppliers and tested negative for mycoplasma, bacteria, yeast, and fungi, as guaranteed by the suppliers. 293T cells from ATCC (ATCC Number CRL-3216) were cultured in DMEM (high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate) (Thermo Fischer Scientific) containing 1% penicillin-streptomycin (Thermo Fischer Scientific) and 10% FCS.

METHOD DETAILS

Irradiation procedure

Irradiation of HUVECs at doses of 2, 5, 10 or 20 Gy was performed using an Elekta Synergy® Platform delivering 4 MV X-rays at 2.5 Gy/min. Non-irradiated cells (0 Gy, control samples) were left for the same amount of time on a benchtop near the irradiation room. All irradiations were carried out at 90-100% cell confluence and the same number of population doublings (passage 3, corresponding to 9 to 12 population doublings) for experiments that did not use cells modified with siRNA or lentivirus. For experiments that required siRNA transfection or lentiviral transduction, cells were irradiated at passage 4 and up to passage 6, respectively. The cell culture media were replaced just before irradiation with fresh culture medium at 37°C. For long-term experiments (14- and 21-days post-irradiation), the culture medium was changed every week.

Cell tracker labeling of THP-1 monocytes

For adhesion experiments under flow conditions, THP-1 monocytes (10⁶ cells/mL) were labeled with 1 μM CellTracker™ Red CMTPX (Thermo Fisher Scientific) in RPMI 1640 without FBS for 45 min at 37 °C in the dark. After centrifugation (120 × g for 6 min), cells were resuspended in RPMI 1640 without FBS and incubated for 30 min at 37 °C in the dark to remove unincorporated dye. Cells were centrifuged (120 × g for 6 min) and resuspended in EBM-2 MV medium without FBS at a concentration of 0.5 × 10⁶ cells/mL and then used in an adhesion assay.

RNA isolation, reverse transcription and real-time quantitative PCR

Total RNAs were prepared using the mirVana miRNA isolation kit (Thermo Fisher Scientific). RNA concentrations were quantified on a NanoDrop ND-1000 apparatus (NanoDrop Technologies). Reverse transcription was performed with 1 µg RNA using the High-Capacity Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was carried out on a 7900HT Fast-Real Time PCR system (Applied Biosystems) using pre-developed TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific). PCR fluorescent signals were normalized to a PCR fluorescent signal obtained from the housekeeping ACTB gene. Relative changes in gene expression were quantified using the $\Delta\Delta CT$ method.

Protein isolation and Western blot analysis

HUVECs were lysed at appropriate times using RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz Biotechnology) containing cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) and PhosSTOP phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). Protein concentration was determined using BCA Kit for protein determination (Sigma-Aldrich). Absorbance was measured in a microplate reader Infinite M200 Pro (TECAN) at 562 nm. Western blot was performed on 15 µg of total HUVECs proteins or 2 µg in case of lentiviral transduction. SDS-PAGE was carried out using MINI-PROTEAN TGX Precast gels 4-15% (Bio-Rad). Proteins were electro-transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad) using a Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) at 0.8 mA.cm⁻² during 1 h. After 10 min incubation in the EveryBlot Blocking Buffer (Bio-Rad), membranes were incubated with anti-MAN1C1 antibody (Biotechne) at a dilution of 1:500 for 12 h at 4°C, anti-ACTB antibody (Sigma-Aldrich) at a dilution of 1:10000, anti-GAPDH antibody at a dilution of 1:5000 (Sigma-Aldrich) or anti-His Tag antibody (Bio-Techne) for 1 h at RT. Membranes were then incubated with Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)-HRP Conjugate (Biorad) or Goat Anti-Mouse IgG (H + L)-HRP Conjugate (Biorad) at a dilution of 1:3000 for 1 h at RT. Finally, proteins were revealed using the SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) using a ChemiDoc MP Imaging system (Bio-Rad). Quantification of band intensity was performed using ImageJ software.

Establishment of a regulation network of MAN1C1 by ionizing radiation

A network was built *in silico* using the Pathway Studio Web Mammal software, version 12.4, querying the Mammal (Anatomy; CellEffect™; DiseaseFx®; GeneticVariant; Viruses) version 12.4.0.5 (Updated Feb 27, 2022) database from Elsevier (www.elsevier.com/pathway-studio) (Nikitin et al., 2003). Proteins mapped to the knowledge base were used to build protein networks. Interaction networks, established on a bibliographic basis using the text mining module of Pathway Studio, were added that included selected neighbors, direct interactions, and shortest paths.

Creation a THP-1 line expressing the mKate2-N red protein

Electroporation strategy. Six independent electroporations (THP-1 mKate2-1 to -6) of 2×10^6 THP-1 cells were performed with 0.5 μg of pmKate2-N plasmid (Euromedex) using the Amaxa[®] Biosystems Nucleofector[®] II and an Amaxa[®] Cell line Nucleofector[®] Kit V (Lonza). The far-red fluorescent protein mKate2 THP-1 expresses a super bright far-red fluorescence (Excitation maximum, 588 nm; Emission maximum, 633 nm) (Shcherbo et al., 2007). THP-1 mKate2-N cells were grown in classically used medium with the addition of selective geneticin antibiotic (Thermo Fisher Scientific) at 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Flow cytometry analysis and cell sorting for single cell cloning. After amplification, cells were analyzed on a SORP LSR-II analyzer (BD Biosciences). Data were analyzed with FlowJo v7.6.5 (FlowJo LLC). For each sample, 90 000 to 100 000 cells were analyzed. For the three independent electroporations THP-1 mKate2-1, THP-1 mKate2-2 and THP-1 mKate2-5, 40 000 to 50 000 cells were sorted on a FACSARIA II cell sorter (BD Biosciences) based on their level of fluorescence (medium or high) and single cells were seeded in 96 wells culture plates. For each electroporation, two kinds of clones were sorted: THP-1 mKate2 X-M, for medium fluorescence, and THP-1 mKate2 X-H, for high fluorescence, where X is the electroporation number. The clones were then amplified and selected by fluorescence microscopy based on the basis of their fluorescence level by choosing the brightest red clones. Finally, three independent clones, named THP-1 mKate2 1-M C5 (1-M C5), THP-1 mKate2 2-H D11 (2-H D11) and THP-1 mKate2 5-H E5 (5-H E5) were selected and stored at -150°C .

Construction of lentiviral vectors

All enzymes are from New England Biolabs, antibiotics from Sigma-Aldrich and primers from Eurofins Genomics. The HsMAN1C1-1-630-cMyc-Flag encoding sequence was amplified by PCR from pCMV6-HsMAN1C1-1-630-cMycFlag plasmid (Origene). The forward (SP1333) and reverse (SP1334) primers harbor a 20-bp homology sequence with pTRIP-MND-hPGK-EGFP plasmid located apart the *Bam*HI restriction site used for cloning. Upon amplification, resulting PCR product was subcloned by SLIC (Li and Elledge, 2007) in pTRIP-MND-hPGK-EGFP plasmid digested by *Bam*HI. The pTRIP-MND-hPGK-EGFP plasmid derived from pTRIP-DU3-EF1a plasmid (Sirven et al., 2001) where the EF1a promoter was replaced by a MND promoter to drive gene expression (Brunet de la Grange et al., 2006) generating pTRIP-MND-EGFP. Then, to have independent expression of EGFP, a hPGK promoter sequence was amplified with SP1306 and SP1307 from pVP81-eGFP plasmid (gift from F. Pflumio, UMR Stabilité Génétique, Cellules Souches et Radiations, CEA, Fontenay-aux-Roses, France) and cloned by SLIC in previously obtained plasmid digested by *Bam*HI. As a control, the luciferase encoding sequence was amplified with SP1311 and SP1313 from pTRIP-MND-Luciferase plasmid (gift from F. Pflumio, UMR Stabilité Génétique, Cellules Souches et Radiations, CEA, Fontenay-aux-Roses, France) and inserted by SLIC in pTRIP-MND-hPGK-EGFP plasmid digested by *Bam*HI. Positive clones were validated by DNA

sequencing (Eurofins). The lentiviral vectors pTRIP-MND-HsMAN1C1-1-630-cMycFlag-hPGK-EGFP and pTRIP-MND-Luciferase-hPGK-EGFP were subsequently named pTrip-MAN1C1 and pTrip-LUC, respectively.

Production of lentiviral particles

293T cells (ATCC) were seeded in 175 cm² flasks with a density of 9 000 cells/cm² and cultured in DMEM (high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate) (Thermo Fischer Scientific) containing 1% penicillin-streptomycin (Thermo Fischer Scientific) and 10% FCS for 72 hours. Cells were co-transfected with 70 µg of pCMV-VSV-G (Addgene) and 100 µg of pCMVΔR8.91 (kindly provided by F. Pflumio, UMR Stabilité Génétique, Cellules Souches et Radiations, CEA, Fontenay-aux-Roses, France) (Zufferey et al., 1997) packaging plasmids, and 100 µg of the expression vector (pTrip-LUC or pTrip-MAN1C1) using the calcium phosphate method. The generated DNA precipitate was added to fresh medium and incubated with previously plated cells. Upon 17 hours of incubation at 37°C with 5% CO₂, the medium was changed, and cells were cultured for additional 48 hours. Then, the culture medium containing viral particles was filtered on a 0.45 µm filter. The filtered suspension was centrifuged at 83 000 x g for 90 min at 4°C. Finally, the pellet was suspended in 200 µl PBS and stored at -80°C. Virus titration was performed by exposing 10⁵ 293T cells to viral particles in 24-well plates. Four serial 5-fold dilutions were tested for each lentivirus, starting with a volume of 0.25 µl of frozen initial suspension. After 72 hours of culture, cells were washed three times with PBS, harvested by flushing, and the percentage of fluorescent eGFP⁺ cells was further determined by flow cytometry. The viral titer is based on the condition where less than 30% of cells are eGFP⁺, according to the following formula: titer (particles per µl) = (number of plated cells x %age of eGFP⁺ cells)/volume of virus in this condition.

Lentiviral transduction

HUVECs at 90-100% confluence were incubated for 2 days with lentivirus containing the pTRIP-MND-HsMAN1C1-1-630-cMycFlag-hPGK-EGFP or pTRIP-MND-Luciferase-hPGK-EGFP as control condition using a multiplicity of infection (MOI) of 12 particles/cell. For monocyte adhesion under flow and transendothelial migration assays, HUVECs were dissociated with trypsin, washed with PBS and seeded at the appropriate density 2 days after transduction. Transduction efficiency was assessed by flow cytometry based on eGFP signal the day after functional tests.

siRNA transfection

HUVECs at 60-80% confluence were transfected with ON-TARGET plus human *man1c1* siRNA (siMAN1C1) and ON-TARGET control pool siRNA NT (siNT) (GE Healthcare Dharmacon) as control, using DharmaFECT (GE Healthcare Dharmacon) as transfection reagent, according to the manufacturer recommendations. Cells without any treatment were used as untreated condition. For silencing

verification by RT-qPCR, 6 wells plates were seeded in parallel with similar culture and irradiation conditions.

Monocyte adhesion assay under flow conditions

Five days after seeding on glass lamellas, HUVECs at confluency were irradiated at 20 Gy. At different times post-irradiation, the lamella was placed in a flow chamber for videomicroscopy analysis (Jaillet et al., 2017). THP-1 monocytes fluorescently labeled with CellTracker™ Red CMPTX were perfused through the flow chamber for a maximum time of 5 min at a constant wall shear rate of 75 s^{-1} and a constant flow rate of $150 \mu\text{L}/\text{min}$ using a syringe coupled to an electric pump (Harvard Apparatus). The entire experiment was visualized in real time at X20 magnification with a Rolera EM-C² camera (QImaging). Monocyte movements were recorded using MetaVue software (Molecular Devices). The full time-lapse video recorded the movement of monocytes over a 1-min period using a frame rate of 30 frames per second with an exposure of 5 ms per frame. After 5 min of perfusion, 10-images time-lapse videos were recorded to determine the number of firmly adherent monocytes all the long of the glass lamella in the center of the flow. The time-lapse videos were subsequently analyzed by manual counting to determine the number of firmly adherent monocytes.

Transendothelial migration assay

Transendothelial migration assays were performed using the chemotaxis plate IncuCyte™ ClearView™ 96-Well Cell Migration Plate (Essen bioscience). 6×10^5 HUVECs per well were seeded in the top compartment on the permeable membrane previously coated with a fibronectin solution (Sigma Aldrich) of $5 \mu\text{g}/\text{mL}$. The reservoir plate was filled with warm PBS. Cells were cultured for 24 h in standard culture conditions and then irradiated at the appropriate dose. Two days after irradiation, 5×10^3 THP-1 mKate2 cells in EGM2 medium were added to each well on the HUVECs layer. Just before starting the experiment, the bottom compartment was replaced with EGM2 medium containing or not with MCP-1 (Sigma Aldrich). Irradiated and non-irradiated chemotaxis plates were placed in the IncuCyte S3 live cell analysis system (Essen bioscience) placed in a cell culture incubator to monitor the transmigration of monocytes. Each well of the plate was scan using the chemotaxis module available on the Incucyte S3. Scans of the top and the bottom side of the permeable membrane were recorded in transmitted light and red fluorescence (800 ms exposure) using a x 10 objective. Scans were scheduled every 30 min, 1 h or 1.5 h for a total time of 3 days. The analysis of the scans was performed with Incucyte software (Chemtaxis Migration Top/Bot analysis type) with the following analysis definition : for the phase, seed threshold of 50, grow threshold of 100, no clean-up, no area and eccentricity filters; for the red, segmentation with a seed threshold (RCU) of 10^{-5} , a grow threshold of

50, an edge sensitivity of 0, no clean-up filter, area filter of minimum 20 μm^2 and maximum 600 μm^2 , eccentricity filter of maximum 0.78, mean intensity filter of 0.1, no integrated intensity filter.

Flow cytometry analysis

Con A-FITC labeling on siRNA transfected cells. After dissociation with trypsin, cells were resuspended in 1 mL of PBS with $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ containing 5% FBS and stained with To-Pro-3 iodide (Thermo Fisher Scientific) and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FITC-Con A lectin (Clinisciences) for 15 min on ice in the dark. Multiparametric analyses were performed on BD FACSCanto™ II (BD Biosciences) for data recording and data were analyzed using FlowJo 10.6.0 software (FlowJo LLC). To-Pro-3 fluorescence was collected on the APC channel to record living cell events. For these gated events, gating was done on size (FSC, forward scatter) and granulometry (SSC, side scatter) parameters. Finally, the FITC-Con A signal was collected on the FITC channel. Results are presented as average median values of FITC-Con A fluorescence with at least 50 000 gated events per replica. All acquisitions and analyses were performed without compensation as FITC and To-Pro-3 do not overlap.

Evaluation of transduction efficiency and lectin labeling on HUVECS transduced with lentiviral particles. After dissociation with trypsin, cells were resuspended in 1 mL of PBS with $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ containing 5% FBS and incubated with To-Pro-3 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FITC-Con A, Cy3-Con A or Cy3-HHL lectins from Cliniscience for 15 min on ice in the dark. Analyses were performed using the Aurora spectral flow cytometer (Cytex) for data recording and analyzed with FlowJo 10.6.0 software (FlowJo LLC). Gating was done on size (FSC, forward scatter) and granulometry (SSC, side scatter) parameters and To-Pro-3 negative cells. eGFP positive cells were gated based on non-transduced cells as negative control. Results are presented as average median values of FITC-Con A, Cy3-FITC or Cy3-HHL fluorescence with at least 50 000 gated events per sample. All acquisitions and analyses were performed without compensation as FITC and To-Pro-3 do not overlap.

THP-1 and THP-1 mKATE2 surface staining. Cells were analyzed using the Aurora spectral flow cytometer (Cytex). To-Pro-3 was used to assess cell viability. Gating was done on size (FSC, forward scatter) and granulometry (SSC, side scatter) parameters and living cells (To-Pro-3 negative cells). Positive and negative populations for other markers were defined using fluorescence minus one (FMO) controls. Anti-CD45-PerCP (#345809), anti-CD16-PE (#560995), anti-CD14-FITC (#555397), anti-CX3CR1-BV605 (#744488) and anti-CCR2-BV786 (#747855) antibodies were purchased from BD Biosciences. Data analyses were performed on FlowJo 10.6.0 (FlowJo LLC).

TNF α stimulation

HUVECs were cultured for 24 h with a cell culture medium containing 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of human recombinant TNF α (Biotechne).

FITC-Dextran permeability assay

A permeability assay was performed by using the fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-Dextran, Sigma-Aldrich) in EGM2 medium. FITC-Dextran at a concentration of 1 mg/mL was added to the top compartment of the IncuCyte™ ClearView™ 96-Well Cell Migration Plate previously seeded with HUVECs and the reservoir plate was filled with PBS. Plates were incubated at 37°C in the dark for 3 hours. Fluorescence was measured at 535 nm in the PBS solution of the reservoir plate using the plate reader Infinite M200 Pro (TECAN).

Quantification and statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. When the data meet the normality assumption (Shapiro-Wilk), we performed t-tests and one-way ANOVA followed by multiple comparisons tests (Tukey or Sidak). All p-values were corrected for multiple comparisons tests (Tukey or Sidak). The type of test used is indicated in the figure legend for each data set. A p value of <0.05 was considered statistically significant. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ for indicated comparisons, error bars represent standard error of means. The tests were performed using GraphPad Prism, version 8.1.1 for Windows, which was also used to build the graphs.

SUPPLEMENTAL VIDEOS

Video S1. Interaction of THP-1 cells with a monolayer of non-irradiated HUVECs treated by siNT under flow conditions. Related to Figure 2. Representative movie used in the experiments illustrating the interactions between THP-1 and non-irradiated HUVECs treated with siNT. After 5 minutes of a continuous flow of THP-1 cells fluorescently labeled with CellTracker™ Red CMPTX, a film of 10 images was recorded to determine the number of firmly adherent THP1 cells. The video plays on a continuous loop.

Video S2. Interaction of THP-1 cells with a monolayer of non-irradiated HUVECs treated by siMAN1C1 under flow conditions. Related to Figure 2. Representative movie used in the experiments illustrating the interactions between THP-1 and non-irradiated HUVECs treated with siMAN1C1. After 5 minutes of a continuous flow of THP-1 cells fluorescently labeled with CellTracker™ Red CMPTX, a film of 10 images was recorded to determine the number of firmly adherent THP1 cells. The video plays on a continuous loop.

Video S3. Interaction of THP-1 cells with a monolayer of 20 Gy-irradiated HUVECs transduced with pTrip-LUC under flow conditions. Related to Figure 2. Representative movie used in the experiments illustrating the interactions between THP-1 and non-irradiated HUVECs treated transduced with pTrip-LUC. After 5 minutes of a continuous flow of THP-1 cells fluorescently labeled with CellTracker™ Red

CMPTX, a film of 10 images was recorded to determine the number of firmly adherent THP1 cells. The video plays on a continuous loop.

Video S4. Interaction of THP-1 cells with a monolayer of 20 Gy-irradiated HUVECs transduced with pTrip-MAN1C1 under flow conditions. Related to Figure 2. Representative movie used in the experiments illustrating the interactions between THP-1 and non-irradiated HUVECs treated transduced with pTrip-MAN1C1. After 5 minutes of a continuous flow of THP-1 cells fluorescently labeled with CellTracker™ Red CMPTX, a film of 10 images was recorded to determine the number of firmly adherent THP1 cells. The video plays on a continuous loop.

Video S5. Transendothelial migration of THP-1 mKate2 cells in the absence of MCP1 in the reservoir plate. Related to Figure 4. Representative movie illustrating transendothelial migration of THP-1 mKate2 clone H-5 E5 through a layer of HUVECs. This movie shows a sequence of scans of the bottom of the permeable membrane of the chemotaxis cell migration plate performed every hour for 3 days. Monocytes on top of the membrane, and therefore not having crossed the HUVECS layer, appear large and blurred, while monocytes that have crossed, adhering to the membrane, are well focused and detected by the S3 Incucyte segmentation module (circled in yellow). Membrane pores are colored in blue. The reservoir plate wells did not contain MCP1.

Video S6. Transendothelial migration of THP-1 mKate2 cells in the presence of 100 nM MCP1 in the reservoir plate. Related to Figure 4. Representative movie illustrating transendothelial migration of THP-1 mKate2 clone H-5 E5 through a layer of HUVECs. This movie shows a sequence of scans of the bottom of the permeable membrane of the chemotaxis cell migration plate performed every hour for 3 days. Monocytes on top of the membrane, and therefore not having crossed the HUVECS layer, appear large and blurred, while monocytes that have crossed, adhering to the membrane, are well focused and detected by the S3 Incucyte segmentation module (circled in yellow). Membrane pores are colored in blue. The reservoir plate wells contained 100 nM MCP1.

Video S7. Transendothelial migration of THP-1 mKate2 cells through a non-irradiated monolayer of HUVECs. Related to Figure 5. Representative movie illustrating transendothelial migration of THP-1 mKate2 clone H-5 E5 through a monolayer of non-irradiated HUVECs. This movie shows a sequence of scans of the bottom of the permeable membrane of the chemotaxis cell migration plate performed every 1.5 h for 3 days. Monocytes on top of the membrane, and therefore not having crossed the HUVECS layer, appear large and blurred, while monocytes that have crossed, adhering to the membrane, are well focused and detected by the S3 Incucyte segmentation module (circled in yellow). Membrane pores are colored in blue. The reservoir plate wells contained 100 nM MCP1.

Video S8. Transendothelial migration of THP-1 mKate2 cells through an irradiated monolayer of HUVECs. Related to Figure 5. Representative movie illustrating transendothelial migration of THP-1 mKate2 clone H-5 E5 through a monolayer of HUVECs irradiated at 20 Gy. This movie shows a sequence of scans of the bottom of the permeable membrane of the chemotaxis cell migration plate performed every 1.5 h for 3 days. Monocytes on top of the membrane, and therefore not having crossed the HUVECS layer, appear large and blurred, while monocytes that have crossed, adhering to the membrane, are well focused and detected by the S3 Incucyte segmentation module (circled in yellow). Membrane pores are colored in blue. The reservoir plate wells contained 100 nM MCP1.

Video S9. Transendothelial migration of THP-1 mKate2 cells through a 20 Gy-irradiated monolayer of HUVECs treated with a non-targeted siRNA. Related to Figure 6. Representative movie illustrating transendothelial migration of THP-1 mKate2 clone H-5 E5 through a monolayer of 20 Gy-irradiated HUVECs. This movie shows a sequence of scans of the bottom of the permeable membrane of the chemotaxis cell migration plate performed every 1.5 h for 3 days. Monocytes on top of the membrane, and therefore not having crossed the HUVECS layer, appear large and blurred, while monocytes that have crossed, adhering to the membrane, are well focused and detected by the S3 Incucyte segmentation module (circled in yellow). Membrane pores are colored in blue. The reservoir plate wells contained 100 nM MCP1.

Video S10. Transendothelial migration of THP-1 mKate2 cells through a 20 Gy-irradiated monolayer of HUVECs treated with a siRNA against MAN1C1. Related to Figure 6. Representative movie illustrating transendothelial migration of THP-1 mKate2 clone H-5 E5 through a monolayer of 20 Gy-irradiated HUVECs. This movie shows a sequence of scans of the bottom of the permeable membrane of the chemotaxis cell migration plate performed every 1.5 h for 3 days. Monocytes on top of the membrane, and therefore not having crossed the HUVECS layer, appear large and blurred, while monocytes that have crossed, adhering to the membrane, are well focused and detected by the S3 Incucyte segmentation module (circled in yellow). Membrane pores are colored in blue. The reservoir plate wells contained 100 nM MCP1.

Video S11. Transendothelial migration of THP-1 mKate2 cells through a 20 Gy-irradiated monolayer of HUVECs transduced with pTrip-LUC. Related to Figure 7. Representative movie illustrating transendothelial migration of THP-1 mKate2 clone H-5 E5 through a monolayer of 20 Gy-irradiated HUVECs. This movie shows a sequence of scans of the bottom of the permeable membrane of the chemotaxis cell migration plate performed every 1.5 h for 3 days. Monocytes on top of the membrane, and therefore not having crossed the HUVECS layer, appear large and blurred, while monocytes that have crossed, adhering to the membrane, are well focused and detected by the S3 Incucyte

segmentation module (circled in yellow). Membrane pores are colored in blue. The reservoir plate wells contained 100 nM MCP1.

Video S12. Transendothelial migration of THP-1 mKate2 cells through a 20 Gy-irradiated monolayer of HUVECs transduced with pTrip-MAN1C1. Related to Figure 7. Representative movie illustrating transendothelial migration of THP-1 mKate2 clone H-5 E5 through a monolayer of 20 Gy-irradiated HUVECs. This movie shows a sequence of scans of the bottom of the permeable membrane of the chemotaxis cell migration plate performed every 1.5 h for 3 days. Monocytes on top of the membrane, and therefore not having crossed the HUVECS layer, appear large and blurred, while monocytes that have crossed, adhering to the membrane, are well focused and detected by the S3 Incucyte segmentation module (circled in yellow). Membrane pores are colored in blue. The reservoir plate wells contained 100 nM MCP1.

REFERENCES

- Brunet de la Grange, P., Armstrong, F., Duval, V., Rouyez, M.C., Goardon, N., Romeo, P.H., and Pflumio, F. (2006). Low SCL/TAL1 expression reveals its major role in adult hematopoietic myeloid progenitors and stem cells. *Blood* 108, 2998-3004.
- Chacko, B.K., Scott, D.W., Chandler, R.T., and Patel, R.P. (2011). Endothelial surface N-glycans mediate monocyte adhesion and are targets for anti-inflammatory effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands. *J Biol Chem* 286, 38738-38747.
- Francois, A., Milliat, F., Guipaud, O., and Benderitter, M. (2013). Inflammation and immunity in radiation damage to the gut mucosa. *Biomed Res Int* 2013, 123241.
- Gaugler, M.H., Squiban, C., van der Meeren, A., Bertho, J.M., Vandamme, M., and Mouthon, M.A. (1997). 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.
- Guipaud, O., Jaillet, C., Clement-Colmou, K., Francois, A., Supiot, S., and Milliat, F. (2018). The importance of the vascular endothelial barrier in the immune-inflammatory response induced by radiotherapy. *Br J Radiol* 91, 20170762.
- Hallahan, D.E., Spriggs, D.R., Beckett, M.A., Kufe, D.W., and Weichselbaum, R.R. (1989). Increased tumor necrosis factor alpha mRNA after cellular exposure to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 10104-10107.
- Hallahan, D.E., Virudachalam, S., Kuchibhotla, J., Kufe, D.W., and Weichselbaum, R.R. (1994). Membrane-derived second messenger regulates x-ray-mediated tumor necrosis factor alpha gene induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4897-4901.

- Herscovics, A. (2001). Structure and function of Class I alpha 1,2-mannosidases involved in glycoprotein synthesis and endoplasmic reticulum quality control. *Biochimie* 83, 757-762.
- Ishihara, H., Tsuneoka, K., Dimchev, A.B., and Shikita, M. (1993). Induction of the expression of the interleukin-1 beta gene in mouse spleen by ionizing radiation. *Radiat Res* 133, 321-326.
- Jaillet, C., Morelle, W., Slomianny, M.C., Paget, V., Tarlet, G., Buard, V., Selbonne, S., Caffin, F., Rannou, E., Martinez, P., *et al.* (2017). Radiation-induced changes in the glycome of endothelial cells with functional consequences. *Sci Rep* 7, 5290.
- Khaled, S., Gupta, K.B., and Kucik, D.F. (2012). Ionizing radiation increases adhesiveness of human aortic endothelial cells via a chemokine-dependent mechanism. *Radiat Res* 177, 594-601.
- Krautter, F., and Iqbal, A.J. (2021). Glycans and Glycan-Binding Proteins as Regulators and Potential Targets in Leukocyte Recruitment. *Front Cell Dev Biol* 9, 624082.
- Li, H., Wang, G., Yu, Y., Jian, W., Zhang, D., Wang, Y., Wang, T., Meng, Y., Yuan, C., and Zhang, C. (2018). alpha-1,2-Mannosidase MAN1C1 Inhibits Proliferation and Invasion of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Cancer* 9, 4618-4626.
- Li, M.Z., and Elledge, S.J. (2007). Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods* 4, 251-256.
- Magne, N., Toillon, R.A., Bottero, V., Didelot, C., Houtte, P.V., Gerard, J.P., and Peyron, J.F. (2006). NF-kappaB modulation and ionizing radiation: mechanisms and future directions for cancer treatment. *Cancer Lett* 231, 158-168.
- Martin, M., Lefaix, J., and Delanian, S. (2000). TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47, 277-290.
- McDonald, K.R., Hernandez-Nichols, A.L., Barnes, J.W., and Patel, R.P. (2020). Hydrogen peroxide regulates endothelial surface N-glycoforms to control inflammatory monocyte rolling and adhesion. *Redox Biol* 34, 101498.
- Meziani, L., Deutsch, E., and Mondini, M. (2018a). Macrophages in radiation injury: a new therapeutic target. *Oncoimmunology* 7, e1494488.
- Meziani, L., Mondini, M., Petit, B., Boissonnas, A., Thomas de Montpreville, V., Mercier, O., Vozenin, M.C., and Deutsch, E. (2018b). CSF1R inhibition prevents radiation pulmonary fibrosis by depletion of interstitial macrophages. *Eur Respir J* 51.
- Molinari, M. (2007). N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal. *Nat Chem Biol* 3, 313-320.
- Mondini, M., Loyher, P.L., Hamon, P., Gerbe de Thore, M., Laviron, M., Berthelot, K., Clemenson, C., Salomon, B.L., Combadiere, C., Deutsch, E., *et al.* (2019). CCR2-Dependent Recruitment of Tregs and Monocytes Following Radiotherapy Is Associated with TNFalpha-Mediated Resistance. *Cancer Immunol Res* 7, 376-387.

- Morrison, C. (2016). Immuno-oncologists eye up macrophage targets. *Nat Rev Drug Discov* 15, 373-374.
- Nikitin, A., Egorov, S., Daraselia, N., and Mazo, I. (2003). Pathway studio—the analysis and navigation of molecular networks. *Bioinformatics* 19, 2155-2157.
- Pabst, M., Wu, S.Q., Grass, J., Kolb, A., Chiari, C., Viernstein, H., Unger, F.M., Altmann, F., and Toegel, S. (2010). IL-1beta and TNF-alpha alter the glyco-phenotype of primary human chondrocytes in vitro. *Carbohydr Res* 345, 1389-1393.
- Regal-McDonald, K., and Patel, R.P. (2020). Selective Recruitment of Monocyte Subsets by Endothelial N-Glycans. *Am J Pathol* 190, 947-957.
- Regal-McDonald, K., Somarathna, M., Lee, T., Litovsky, S.H., Barnes, J., Peretik, J.M., Traylor, J.G., Jr., Orr, A.W., and Patel, R.P. (2020). Assessment of ICAM-1 N-glycoforms in mouse and human models of endothelial dysfunction. *PLoS One* 15, e0230358.
- Regal-McDonald, K., Xu, B., Barnes, J.W., and Patel, R.P. (2019). High-mannose intercellular adhesion molecule-1 enhances CD16(+) monocyte adhesion to the endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 317, H1028-H1038.
- Rubin, P., Johnston, C.J., Williams, J.P., McDonald, S., and Finkelstein, J.N. (1995). A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 33, 99-109.
- Schaue, D., Kachikwu, E.L., and McBride, W.H. (2012). Cytokines in radiobiological responses: a review. *Radiat Res* 178, 505-523.
- Schjoldager, K.T., Narimatsu, Y., Joshi, H.J., and Clausen, H. (2020). Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 729-749.
- Scott, D.W., Chen, J., Chacko, B.K., Traylor, J.G., Jr., Orr, A.W., and Patel, R.P. (2012). Role of endothelial N-glycan mannose residues in monocyte recruitment during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, e51-59.
- Scott, D.W., Dunn, T.S., Ballestas, M.E., Litovsky, S.H., and Patel, R.P. (2013a). Identification of a high-mannose ICAM-1 glycoform: effects of ICAM-1 hypoglycosylation on monocyte adhesion and outside in signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 305, C228-237.
- Scott, D.W., Vallejo, M.O., and Patel, R.P. (2013b). Heterogenic endothelial responses to inflammation: role for differential N-glycosylation and vascular bed of origin. *J Am Heart Assoc* 2, e000263.
- Shcherbo, D., Merzlyak, E.M., Chepurnykh, T.V., Fradkov, A.F., Ermakova, G.V., Solovieva, E.A., Lukyanov, K.A., Bogdanova, E.A., Zarsky, A.G., Lukyanov, S., *et al.* (2007). Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat Methods* 4, 741-746.
- Sirven, A., Ravet, E., Charneau, P., Zennou, V., Coulombel, L., Guetard, D., Pflumio, F., and Dubart-Kupperschmitt, A. (2001). Enhanced transgene expression in cord blood CD34(+)-derived

- hematopoietic cells, including developing T cells and NOD/SCID mouse repopulating cells, following transduction with modified trip lentiviral vectors. *Mol Ther* **3**, 438-448.
- Stanley, P., Schachter, H., and Taniguchi, N. (2009). N-Glycans. In *Essentials of glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (CSHL Press), pp. 101-114.
- Tu, H.C., Hsiao, Y.C., Yang, W.Y., Tsai, S.L., Lin, H.K., Liao, C.Y., Lu, J.W., Chou, Y.T., Wang, H.D., and Yuh, C.H. (2017). Up-regulation of golgi alpha-mannosidase IA and down-regulation of golgi alpha-mannosidase IC activates unfolded protein response during hepatocarcinogenesis. *Hepatol Commun* **1**, 230-247.
- Wijerathne, H., Langston, J.C., Yang, Q., Sun, S., Miyamoto, C., Kilpatrick, L.E., and Kiani, M.F. (2021). Mechanisms of radiation-induced endothelium damage: Emerging models and technologies. *Radiother Oncol* **158**, 21-32.
- Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L., and Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* **15**, 871-875.

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Thermo Fisher Scientific	Cat#: 14190-094
mirVana™ miRNA Isolation kit	Thermo Fisher Scientific	Cat#: AM1560
EBM-2, Endothelial Cell Basal Medium-2	Lonza	Cat#: CC-3156
RPMI 1640 Medium (ATCC Modification)	Thermo Fisher Scientific	Cat#: A10491-01
Gibco™ Fetal Bovine Serum, qualified, E.U.-approved, South America origin	Thermo Fisher Scientific	Cat#: 10270106
2-mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific	Cat#: 21985023
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific	Cat#: 25300054
Trypan blue dye	Bio-Rad	Cat#: 145-0013
Dharmafect 1, Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific	Cat#: T-2001-02
Nuclease-free water	Qiagen	Cat#: 129114
Gibco™ Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific	Cat#: 31985-065
DMEM (high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate)	Thermo Fisher Scientific	Cat#: 31966047
Penicillin-streptomycin	Thermo Fisher Scientific	Cat#: 15140122
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific	Cat#: 4368814
Ethanol absolute	VWR	Cat#: 20821.365
TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix (2X), no AmpErase™ UNG	Thermo Fisher Scientific	Cat#: 4366072
TaqMan™ Gene Expression Master Mix	Thermo Fisher Scientific	Cat#: 4370074
SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific	Cat#: 34580
Bicinchoninic Acid (BCA) Kit for Protein Determination	Sigma-Aldrich	Cat#: BCA1-1KT
Nitrocellulose Membrane, Precut, 0.45 µm, 7 x 8.5 cm	Bio-Rad	Cat#: 1620145
RIPA Lysis Buffer System	Santa Cruz Biotechnology	Cat#: sc-24948
cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	Cat#: 11836170001
PhosSTOP phosphatase inhibitor	Sigma-Aldrich	Cat#: 4906845001
Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride	Sigma-Aldrich	Cat#: 75259
MCP-1/MCAF human	Sigma-Aldrich	Cat#: SRP3109-20UG
Fibronectin bovine plasma	Sigma-Aldrich	Cat#: F1141-1MG
Rabbit Polyclonal MAN1C1 Antibody	Bio-Techne	Cat#: NBP2-14217
Anti-Actin Antibody, clone C4	Merck Millipore	Cat#: MAB1501
His Tag Antibody	Bio-Techne	Cat#: MAB050-500
Goat Anti-Mouse IgG (H + L)-HRP Conjugate	Bio-Rad	Cat#: 1706516

Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)-HRP Conjugate	Bio-Rad	Cat#: 1706515
Hippeastrum hybrid Lectin (HHL) - Cy3	CliniSciences	Cat#: 21761169-1
Hippeastrum hybrid Lectin (HHL) - FITC (Fluorescein)	CliniSciences	Cat#: 21511092-1
Concavaline A - FITC	CliniSciences	Cat#: FL-1001
Multiple tags positive control (GST-DDDDDK-V5-HSV-HA-T7-Myc-S)	CliniSciences	Cat#: GTX130343-pro-25µg
4-15% Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels	Bio-Rad	Cat#: 4561086
Fluorescein isothiocyanate–dextran	Sigma-Aldrich	Cat#: 46944-100MG-F
IncuCyte ClearView 96-well Chemotaxis Plate	Sartorius	Cat#: 4648
Cell Line Nucleofector™ Kit V	Lonza	Cat#: VCA-1003
Geneticin™ Selective Antibiotic (G418 Sulfate)	Thermo Fisher Scientific	Cat#: 10131035
pCMV6-HsMAN1C1-1-630-cMycFlag plasmid	Origene	Cat#: RC222009
pmKate2-N	Euromedex	Cat#: FP182
pCMV-VSV-G	Addgene	Cat#: 8454
Recombinant Human TNF-alpha	Bio-Techne	Cat#: 210-TA-100
CellTracker™ Red CMTPX Dye	Thermo Fisher Scientific	Cat#: C34552
TO-PRO™-3 Iodide (642/661)	Thermo Fisher Scientific	Cat#: T3605
EveryBlot Blocking Buffer	Bio-Rad	Cat#: 12010020
Hoechst 33258	Thermo Fisher Scientific	Cat#: H3569
Deposited Data		
Mammal (Anatomy; CellEffect™; DiseaseFx®; GeneticVariant; Viruses) version 12.4.0.5 (Updated Feb 27, 2022) database from Elsevier	Elsevier	www.elsevier.com/pathway-studio
Experimental Models: Cell Lines		
HUVEC – Human Umbilical Vein Endothelial Cells	Lonza	Cat#: C2519A
THP-1 cells	LGC Standards	Cat#: ATTC Number TIB-202
293T cells	ATCC	Cat#: CRL-3216
Oligonucleotides		
Primers for TaqMan® Human gene expression assay: MAN1C1 - Assay ID: Hs01057229_m1	Thermo Fisher Scientific	Cat#: 4351372
Primers for TaqMan® Human gene expression assay: ACTB - Assay ID: Hs99999903_m1	Thermo Fisher Scientific	Cat#: 4331182
ON-TARGET plus Non-targeting Pool	Thermo Fisher Scientific	Cat#: D-001810-10-50
ON-TARGETplus Human MAN1C1 (557134) siRNA - Set of 4	Dharmacon	Cat#: LQ-020422-01-0005
5'CTCACTCGGCGCGATCTGGATCTGCCGCCGCGATCG3' (Forward)	Eurofins	Cat#: SP1333
5'CCCAACCCCGTGGGAATTCGTTAAACCTTATCGTGTTCATCCTTG3' (Reverse)	Eurofins	Cat#: SP1334
5'CTCACTCGGCGCGATCTGGATCCGTCGCCACCATGGAAGACGCCAAAAC3' (Forward)	Eurofins	Cat#: SP1311
5'CCCAACCCCGTGGGAATTCGTTACACGGCGATCTTTCGCG3' (Reverse)	Eurofins	Cat#: SP1313

<u>5'CACTCGGCGCGATCTGGATCCCGAATTCCCACGG GGTTG3' (Forward)</u>	Eurofins	Cat#: SP1306
<u>5'CACCATGGTGGCGACCGGTGGCTGGGGAGAGAG GTCGG3' (Reverse)</u>	Eurofins	Cat#: SP1307
Software and Algorithms		
GraphPad Prism version 8.1.1	GraphPad Software	www.graphpad.com
ImageJ version 1.52a software	National Institutes of Health	http://imagej.nih.gov/ ij
Pathway Studio Web Mammal version 12.4.0.3	Nikitin et al., 2003	www.elsevier.com/p athway-studio

A role for the endothelial α -mannosidase MAN1C1 in radiation-induced immune cell recruitment

Ségolène Ladaigue,^{1,2} Anne-Charlotte Lefranc,¹ Khadidiatou Balde,¹ Monica Quitoco,¹ Emilie Bacquer,¹ Didier Busso,³ Guillaume Piton,³ Jordane Dépagne,³ Nathalie Déschamps,⁴ Valérie Buard,¹ Georges Tarlet,¹ Agnès François,¹ Vincent Paget,¹ Fabien Milliat,¹ and Olivier Guipaud^{1,5*}

MAIN FIGURES

Figure 1. The endogenous MAN1C1 protein is downregulated in HUVECs after irradiation. See also Figures S1 and S2.

HUVECs were irradiated at 20 Gy or not irradiated, and proteins were collected 1, 2, 4 and 7 days after irradiation. To produce a positive control of the MAN1C1 signal on the Western blot membrane, HUVECs were transduced with the pTrip-MAN1C1 or the pTrip-LUC lentiviral particles.

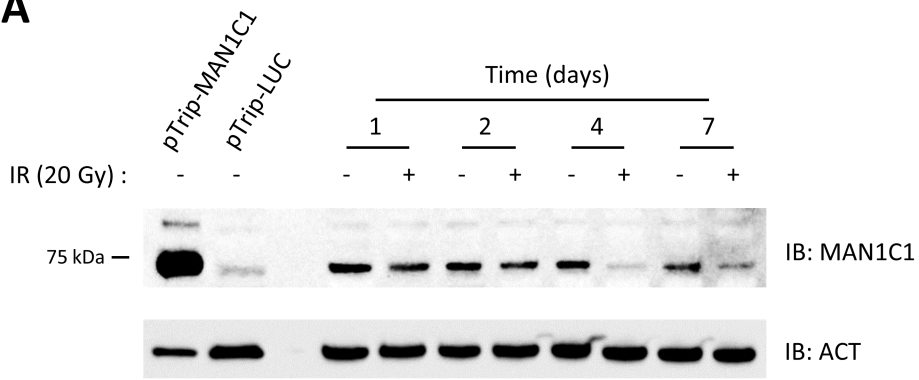
(A) Representative Western blot images performed with anti-MAN1C1 and anti-Actin B antibodies on HUVECs protein extracts (15 µg). pTrip-LUC and p-Trip-MAN1C1, protein extracted (2 µg) of transduced cells with the corresponding lentiviral vectors. IB, immunoblot.

(B) Relative densitometric bar graphs of ratio MAN1C1/ACTB. Data are mean ± SEM of three independent samples for each day post-irradiation. One-way ANOVA test with Sidak correction. ns, not significant, *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01.

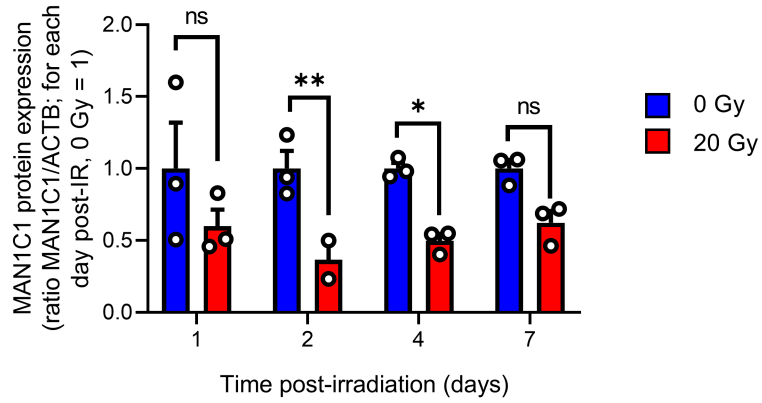
(C) Overview of the putative regulatory network of class I α-mannosidases. Relationships between the four class-I α-mannosidases 1 MAN1A1, MAN1A2, MAN1B1, and MAN1C1, their upstream regulatory entities, and the term "Radiation" as a treatment are shown by directional arrows (see legend on the left panel). Direct interactions and shortest paths were used to construct the network established on a bibliographic basis using the text mining module of Pathway Studio software. MAN1C1 is highlighted in blue.

Figure 1

A



B



C

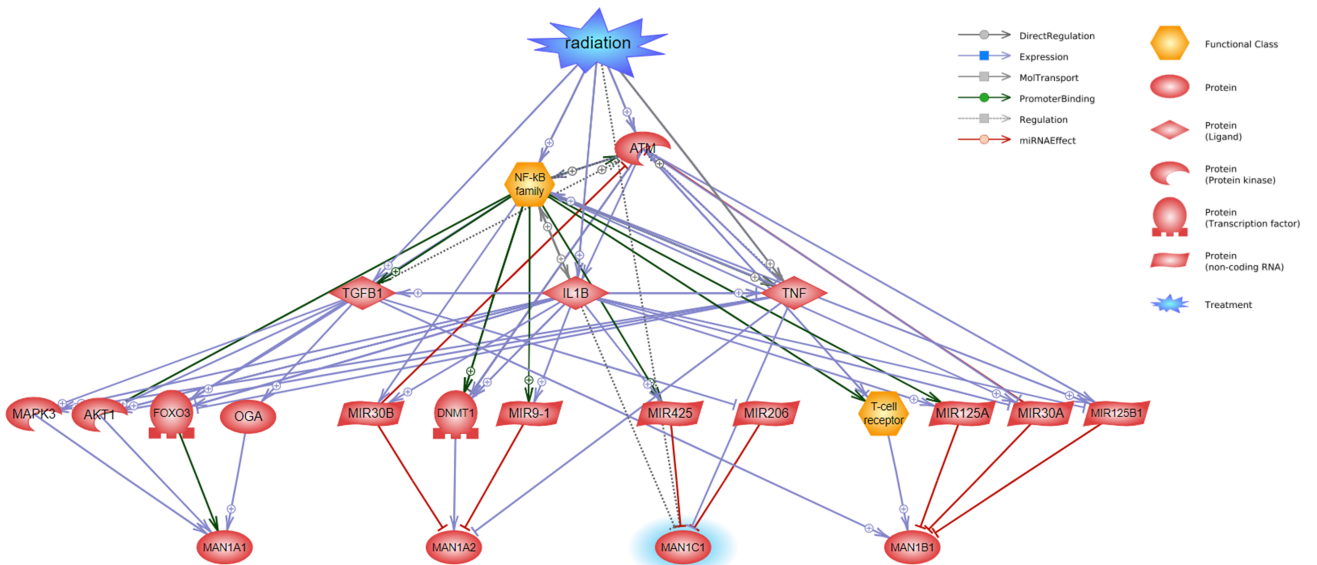


Figure 2. Increased monocyte adhesion under flow condition on a HUVEC monolayer treated with siRNA against MAN1C1. See also Figures S3 and S4, Videos S1 and S2.

HUVECs were transfected with siRNA against MAN1C1 (siMAN1C1) or non-targeted siRNA (siNT). Three days post-transfection, cells were irradiated at 20 Gy, or not irradiated. Two days post-irradiation, proteins and RNAs were collected for Western blot and RT-qPCR analysis, cells were labeled with FITC-Con A to assess the level of high-mannose N-glycans by flow cytometry, and a monocyte adhesion assay was performed under flow condition.

(A) Representative RT-qPCR experiment of MAN1C1 in HUVECs with the indicated dose of irradiation and transfected with the indicated siRNA (4 days post-transfection, 2 days post-irradiation). Scatter with bar graphs show the fold change in gene expression, for which the expression in non-irradiated cells transfected with a non-targeted siRNA (siNT) was set to 1. Levels of gene expression inhibition by siRNAs compared to siNT are 89% for non-irradiated samples and 91% for samples irradiated at 20 Gy. ACTB was used as the reference gene. Normalized expression data are mean \pm SEM derived from n=3 technical replicates. One-way ANOVA test with Tukey correction. ns, not significant, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001.

(B) Representative Western blot images performed with anti-MAN1C1 and anti-GAPDH antibodies on untreated samples, and samples treated with siNT or siMAN1C1 (15 μ g per well). pTrip-LUC and p-Trip-MAN1C1 are control protein extracts from cells transduced with the corresponding lentiviral vectors (2 μ g per well). IB, immunoblot.

(C) Quantification of FITC-Con A staining of non-irradiated and irradiated HUVECs after treatment with siNT or siMAN1C1. Fold change of FITC-Con A fluorescence intensity medians determined by flow cytometry. Data are mean \pm SEM of two independent experiments with n=2-3 repeated measures within each replication. One-way ANOVA test with Tukey correction. **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001.

(D) Interaction of THP-1 cells with a monolayer of HUVECs under flow conditions. Snapshots of representative movies used in the experiments illustrating the interactions between THP-1 and control (0 Gy) or 20 Gy-irradiated HUVECs treated with siNT or siMAN1C1 (2 days post-irradiation). After 5 minutes of a continuous flow of THP-1 cells fluorescently labeled with CellTrackerTM Red CMPTX, a film of 10 images was recorded to determine the number of firmly adherent THP1 cells (surrounded by white circles). The number of firmly adherent THP-1 cells is shown in yellow to illustrate this representative example. Scale bar, 100 μ m.

(E) Quantification of firmly adherent THP-1 cells post-irradiation of HUVECs untreated and treated with siNT or siMAN1C1. Firmly adherent THP-1 cells were counted using the movies recorded in the experiment. Data are mean \pm SEM of 3 to 5 independent experiments with at least n=3 repeated measures from 15 different fields of observation within each lamella, for each sample. One-way ANOVA test with Tukey correction. **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001.

Figure 2

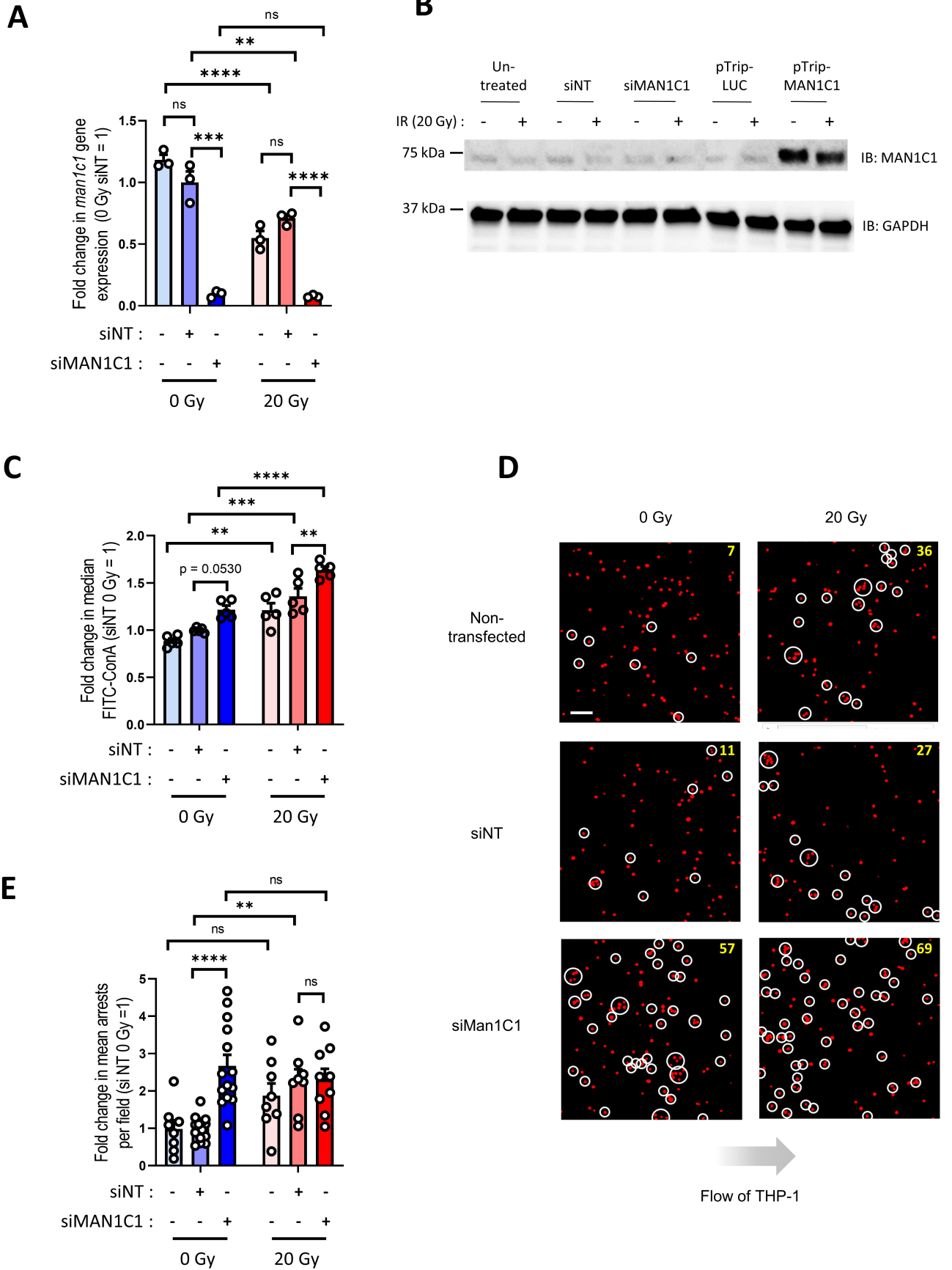


Figure 3. Decreased monocyte adhesion under flow condition on a HUVEC monolayer overexpressing MAN1C1. See also Figures S5, Videos S3 and S4.

HUVECs were transduced with pTrip-LUC or pTrip-MAN1C1. Four days post-transduction, cells were irradiated at 20 Gy, or not irradiated. Two days post-irradiation, proteins were collected for Western blot analysis and a monocyte adhesion assay was performed under flow condition.

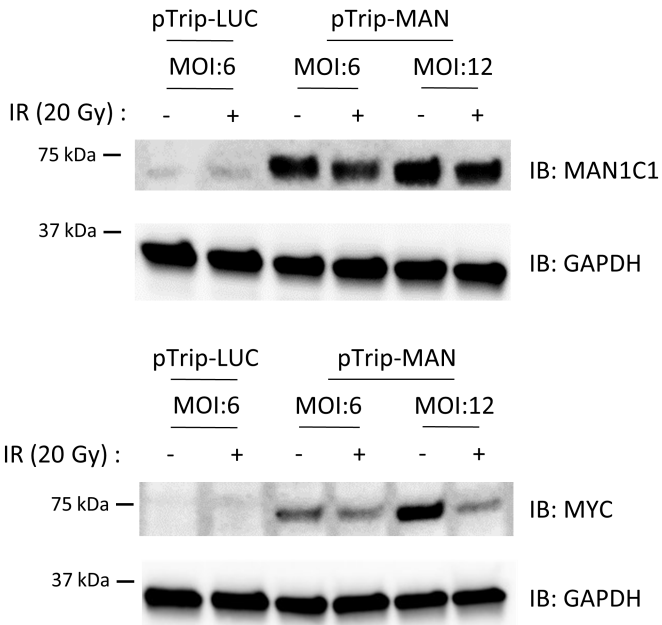
(A) Representative Western blot images performed with anti-MAN1C1, anti-His Tag (MYC) and anti-GAPDH antibodies on samples treated with pTrip-LUC (at MOI 6) or pTrip-MAN1C1 (at MOI 6 and MOI 12) (2 µg of proteins per well). IB, immunoblot.

(B) Interaction of THP-1 cells with a monolayer of HUVECs under flow conditions. Snapshots of representative movies used in the experiments illustrating the interactions between THP-1 and control (0 Gy) or 20 Gy-irradiated HUVECs transduced with pTrip-LUC or pTrip-MAN1C1 at day 2 post-irradiation. After 5 minutes of a continuous flow of THP-1 cells fluorescently labeled with CellTracker™ Red CMPTX, a film of 10 images was recorded to determine the number of firmly adherent THP1 cells (surrounded by white circles). The number of firmly adherent THP-1 cells is shown in yellow to illustrate this representative example. Scale bar, 100 µm.

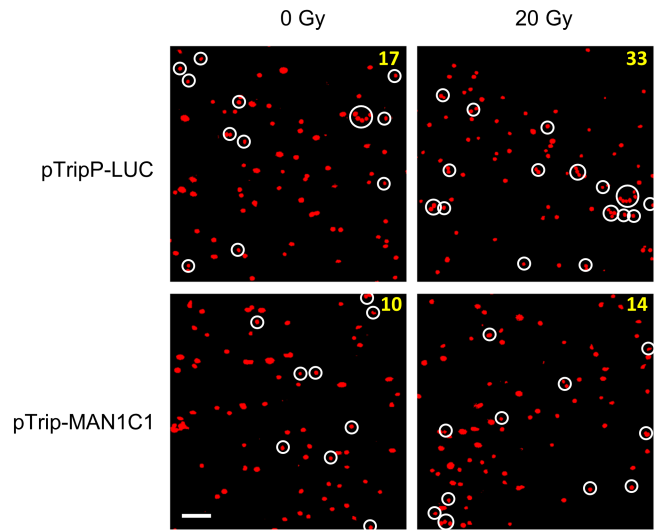
(C) Quantification of firmly adherent THP-1 cells post-irradiation of HUVECs transduced with pTrip-LUC or pTrip-MAN1C1. Firmly adherent THP-1 cells were counted using the movies recorded in the experiment. Data are mean ± SEM of 2 independent experiments with n=4-6 repeated measures from 15 different fields of observation within each lamella, for each sample. One-way ANOVA test with Tukey correction. ns, not significant, **P ≤0.01.

Figure 3

A



B



C

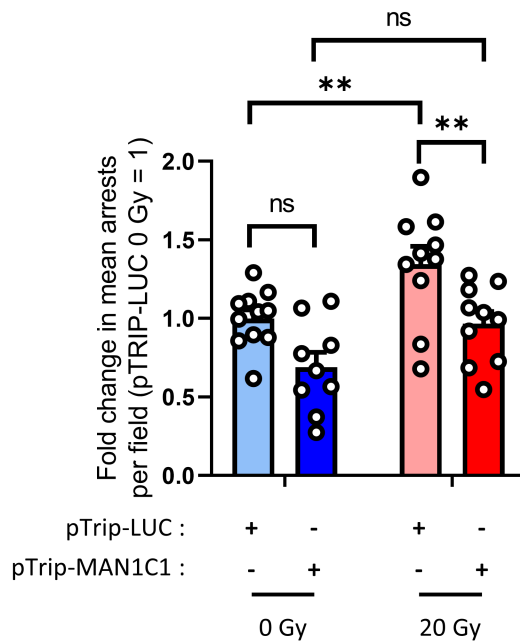


Figure 4. Transendothelial migration of THP-1 monocytes is dependent on the concentration of MCP1. See also Figures S6-S8, Videos S5 and S6.

HUVECs were seeded on wells of a chemotaxis IncuCyte™ ClearView™ 96-Well Cell Migration Plate. 72 h after seeding HUVECs, THP1 mKate2 clone 5-H E5 cells were added into the well, and culture medium containing 0, 12.5, 25, 50, 100 and 200 nM MCP1 was added into the wells of the plate reservoir. Plates were placed in the IncuCyte S3 live cell analysis system in a cell culture incubator to monitor the transendothelial migration of monocytes for 3 days.

(A) Number of THP1 mKate2 detected under the membrane by the Incucyte S3 module from 0 to 72 h after initiation of transendothelial migration and at different concentrations of MCP1 in the reservoir plate.

(B) Number of THP1 mKate2 detected under the membrane by the Incucyte S3 module as a function of MCP1 concentration at 24, 48, and 72 h after initiation of transendothelial migration. Curves were fitted by linear regression with exponential plateau and least squares fitting parameters.

(C) Representative scans of the bottom of the permeable membrane of the chemotaxis cell migration plate 48 h after initiation of transendothelial migration illustrating MCP1-dependant passage of THP-1 mKate2 through a layer of HUVECs. Monocytes on top of the membrane, and therefore not having crossed the HUVECS layer, appear large and blurred, while monocytes that have crossed, adhering to the membrane, are well focused and detected by the S3 Incucyte segmentation module (circled in yellow). Membrane pores are colored in white. Scale bar, 200 μ m.

(D) Quantification of transendothelial migration of THP-1 mKate2 cells as a function of MCP1 concentration 24, 48 and 72 h after the initiation of the transmigration. The experiment was repeated twice. Data are mean \pm SEM derived from n=8-16 technical replicates. One-way ANOVA test with Tukey correction. ns, not significant, *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001.

Figure 4

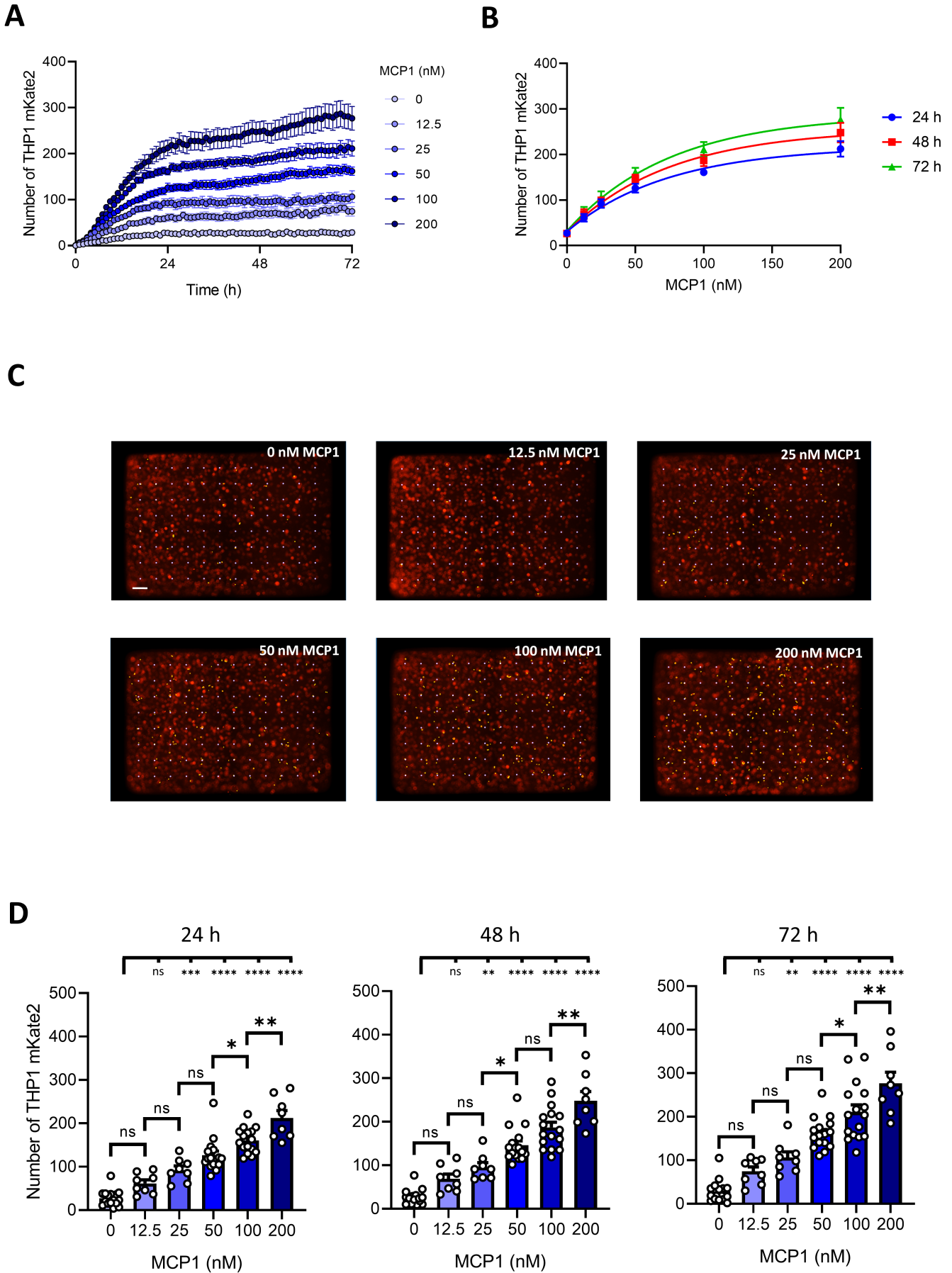


Figure 5. Transendothelial migration of THP-1 monocytes is dependent on the dose of radiation. See also Figures S7 and S9, Videos S7 and S8.

HUVECs were seeded on wells of a chemotaxis IncuCyte™ ClearView™ 96-Well Cell Migration Plate. 24 h after seeding HUVECs, the plates were irradiated at 0, 2, 5, 10 or 20 Gy. 48 h after irradiation, THP1 mKate2 clone 5-H E5 cells were added into the wells, and culture medium containing 100 nM MCP1 was added into the wells of the plate reservoir. Plates were placed in the IncuCyte S3 live cell analysis system in a cell culture incubator to monitor the transendothelial migration of monocytes for 3 days.

(A) Number of THP1 mKate2 detected under the membrane by the Incucyte S3 module from 0 to 72 h after initiation of transendothelial migration and after irradiation of HUVECs at different doses, in the presence and the absence (-MCP1) of 100 nM MCP1 in the wells of the reservoir plates.

(B) Number of THP1 mKate2 detected under the membrane by the Incucyte S3 module from 0 to 72 h after initiation of transendothelial migration and after irradiation of HUVECs at different doses, in the absence of MCP1.

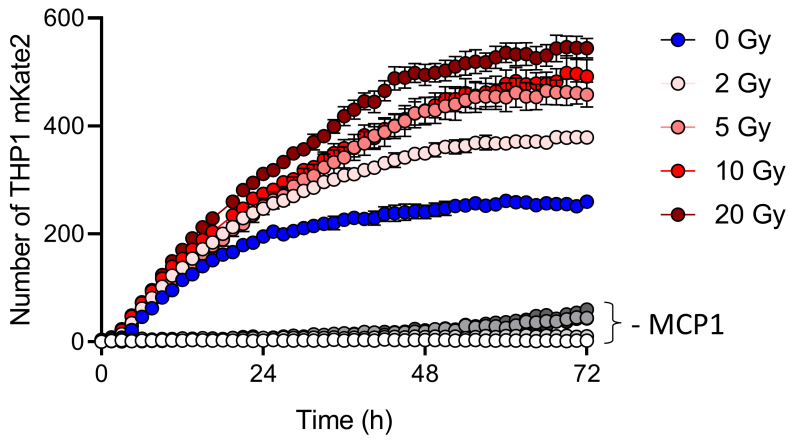
(C) Number of THP1 mKate2 detected under the membrane by the Incucyte S3 module as a function of radiation dose 24, 48, and 72 h after initiation of transendothelial migration in the presence of 100 nM MCP1 in the wells of the reservoir plates. Curves were fitted by linear regression with exponential plateau and least squares fitting parameters.

(D) Representative scans of the bottom of the permeable membrane of the chemotaxis cell migration plate 48 h after initiation of transendothelial migration illustrating the radiation dependence of the passage of THP-1 mKate2 cells through a layer of HUVECs in the presence of 100 nM MCP1 in the wells of the reservoir plates. Monocytes on top of the membrane, and therefore not having crossed the HUVECS layer, appear large and blurred, while monocytes that have crossed, adhering to the membrane, are well focused and detected by the S3 Incucyte segmentation module (circled in yellow). Membrane pores are colored in white. Scale bar, 200 μ m.

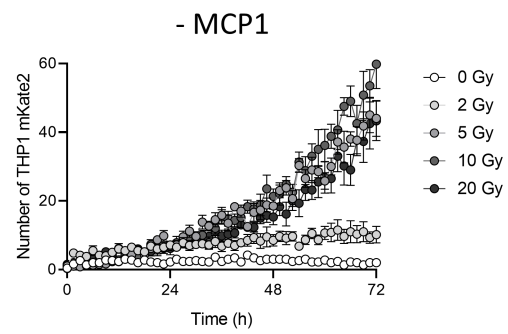
(E) Quantification of transendothelial migration of THP-1 mKate2 cells as a function of radiation dose 24, 48 and 72 h after the initiation of the transmigration in the presence of 100 nM MCP1 in the wells of the reservoir plates. The experiment was repeated twice. Data are mean \pm SEM derived from n=5-8 technical replicates. One-way ANOVA test with Tukey correction. ns, not significant, *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001.

Figure 5

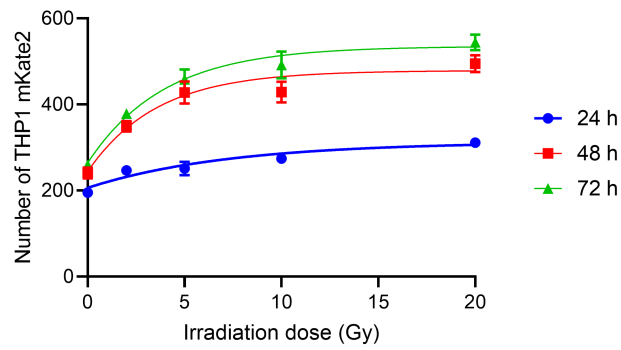
A



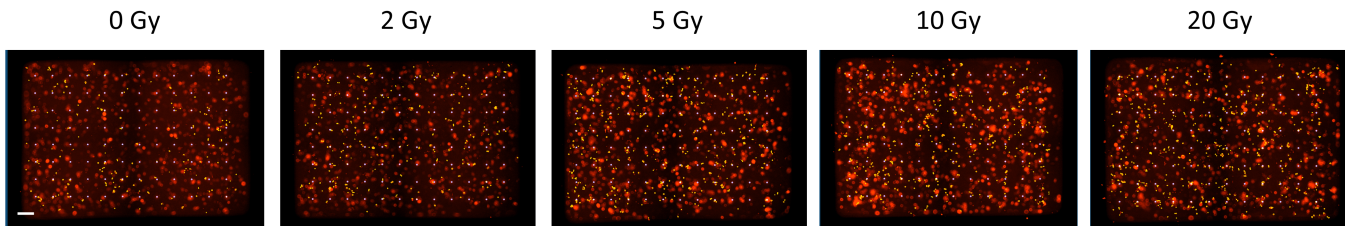
B



C



D



E

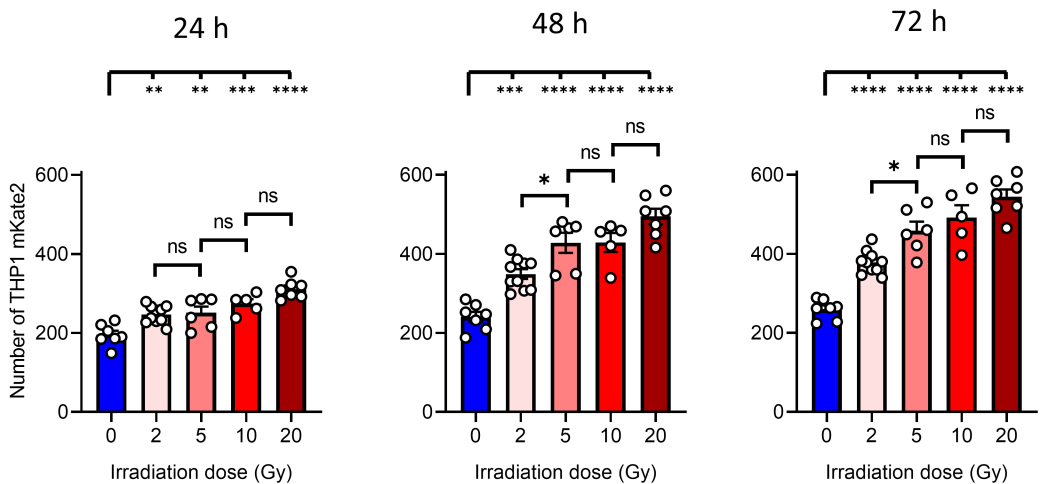


Figure 6. Decreased transendothelial migration of THP-1 monocytes on a HUVEC monolayer treated with siRNA against MAN1C1. See also Videos S9 and S10.

HUVECs were untreated or transfected with siRNA against MAN1C1 (siMAN1C1) or with non-targeted siRNA (siNT) for 3 days. Cells were then seeded on 6-well plates for RT-qPCR analysis or wells of a chemotaxis IncuCyte™ ClearView™ 96-Well Cell Migration Plate for transendothelial migration assay. One day after seeding, the cells were irradiated at 20 Gy, or not irradiated. Two days post-irradiation, RNAs were collected for RT-qPCR analysis and a transendothelial migration assay was performed. 48 h after irradiation, THP1 mKate2 clone 5-H E5 cells were added into the wells, and culture medium containing 100 nM MCP1 was added into the wells of the plate reservoir. Plates were placed in the IncuCyte S3 live cell analysis system in a cell culture incubator to monitor the transendothelial migration of monocytes for 3 days.

(A) Number of THP1 mKate2 detected under the membrane by the Incucyte S3 module from 0 to 72 h after initiation of transendothelial migration and after irradiation of untreated or transfected HUVECs with siRNA in the presence of 100 nM MCP1 in the wells of the reservoir plates.

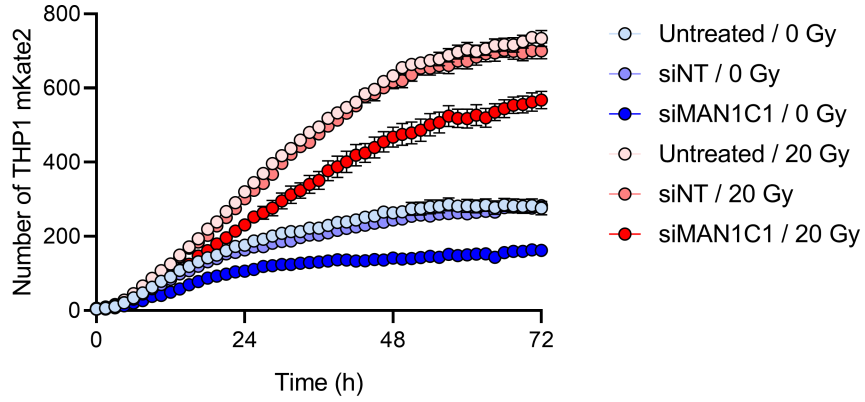
(B) Representative scans of the bottom of the permeable membrane of the chemotaxis cell migration plate 48 h after initiation of transendothelial migration in the presence of 100 nM MCP1 in the wells of the reservoir plates. Monocytes on top of the membrane, and therefore not having crossed the HUVECS layer, appear large and blurred, while monocytes that have crossed, adhering to the membrane, are well focused and detected by the S3 Incucyte segmentation module (circled in yellow). Membrane pores are colored in white. Scale bar, 200 μ m.

(C) A representative RT-qPCR experiment with the indicated dose of irradiation and transfected with the indicated siRNA (4 days post-transfection, 2 days post-irradiation). Scatter with bar graphs show the fold change in gene expression, for which the expression in non-irradiated cells transfected with a non-targeted siRNA (siNT) was set to 1. Levels of gene expression inhibition by siRNAs compared to siNT were of about 60%. ACTB was used as the reference gene. Normalized expression data are mean \pm SEM derived from n=2-3 technical replicates. One-way ANOVA test with Tukey correction. ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001.

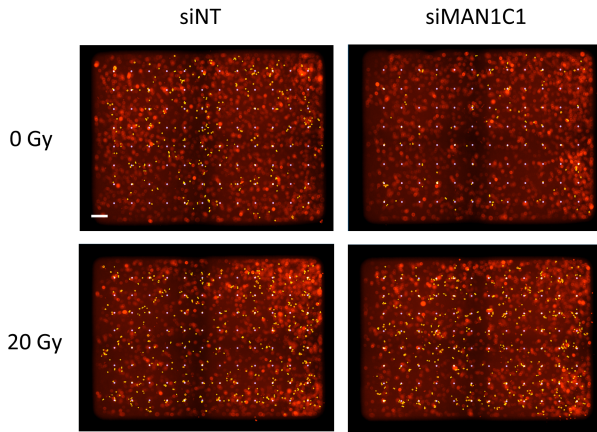
(D) Quantification of transendothelial migration of THP-1 mKate2 cells as a function of siRNA treatment and radiation dose 24, 48 and 72 h after the initiation of the transmigration in the presence of 100 nM MCP1 in the wells of the reservoir plates. The experiment was repeated twice. Data are mean \pm SEM derived from n=8 technical replicates. One-way ANOVA test with Tukey correction. ns, not significant, *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001.

Figure 6

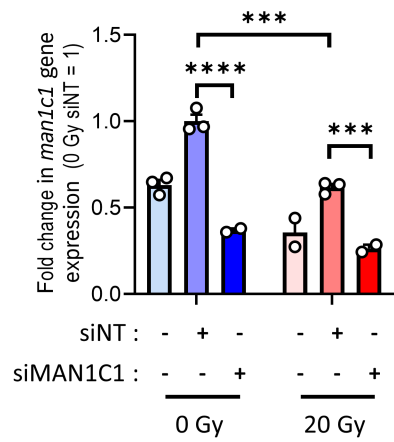
A



B



C



D

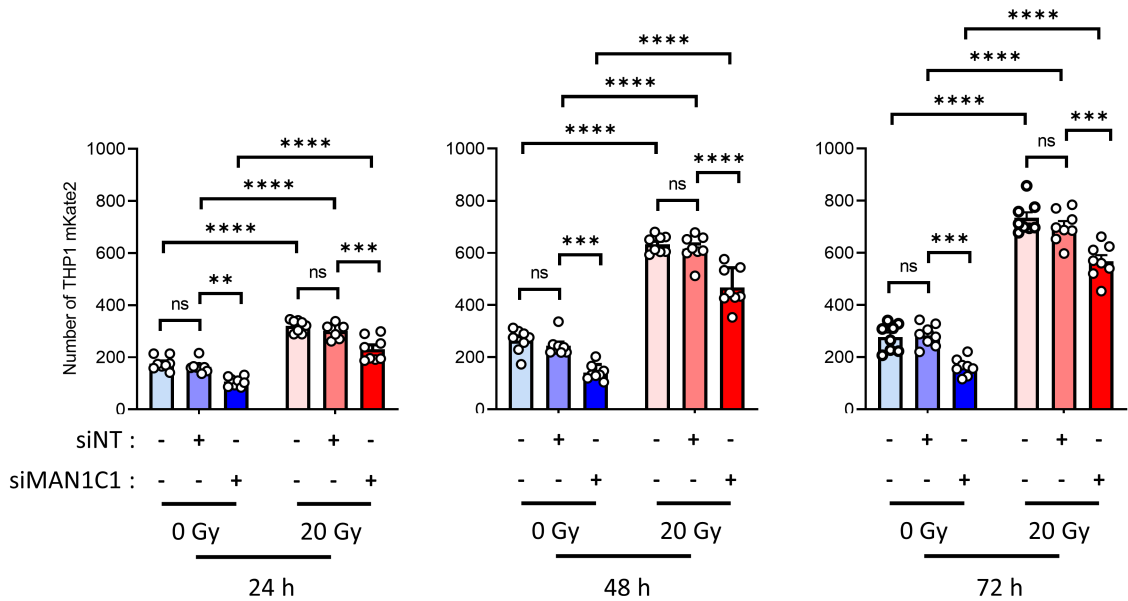


Figure 7. Increased transendothelial migration of THP-1 monocytes on a HUVEC monolayer overexpressing MAN1C1. See also Figures S10, Videos S11 and S12.

HUVECs were incubated with pTrip-LUC or pTrip-MAN1C1 for 2 days and amplified. Fourteen days post-transduction, cells were seeded on 6-well plates for Western blot analysis or wells of a chemotaxis IncuCyte™ ClearView™ 96-Well Cell Migration Plate for transendothelial migration assay. One day after seeding, the cells were irradiated at 20 Gy, or not irradiated. Two days post-irradiation, proteins were collected for Western blot analysis and a transendothelial migration assay was performed. 48 h after irradiation, THP1 mKate2 clone 5-H E5 cells were added into the wells, and culture medium containing 100 nM MCP1 was added into the wells of the plate reservoir. Plates were placed in the IncuCyte S3 live cell analysis system in a cell culture incubator to monitor the transendothelial migration of monocytes for 3 days.

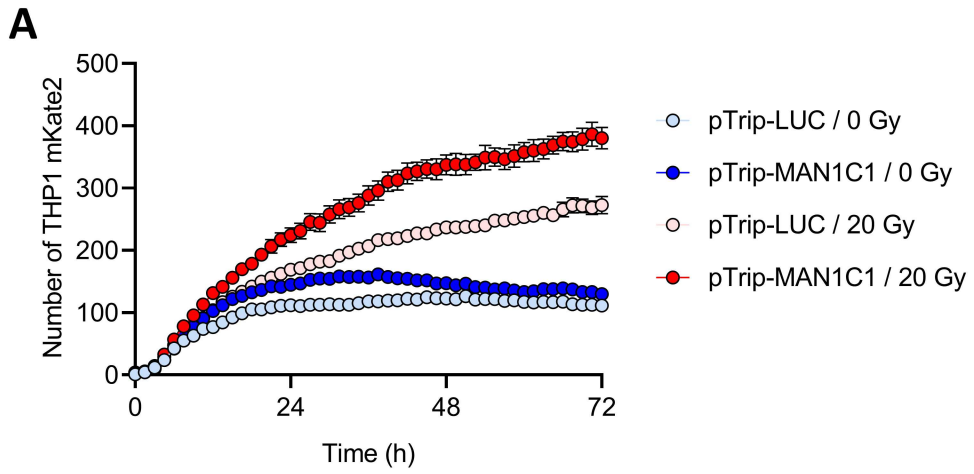
(A) Number of THP1 mKate2 detected under the membrane by the Incucyte S3 module from 0 to 72 h after initiation of transendothelial migration and after irradiation of transduced HUVECs with lentiviral vectors in the presence of 100 nM MCP1 in the wells of the reservoir plates.

(B) Representative scans of the bottom of the permeable membrane of the chemotaxis cell migration plate 48 h after initiation of transendothelial migration in the presence of 100 nM MCP1 in the wells of the reservoir plates. Monocytes on top of the membrane, and therefore not having crossed the HUVECS layer, appear large and blurred, while monocytes that have crossed, adhering to the membrane, are well focused and detected by the S3 Incucyte segmentation module (circled in yellow). Membrane pores are colored in white. Scale bar, 200 μ m.

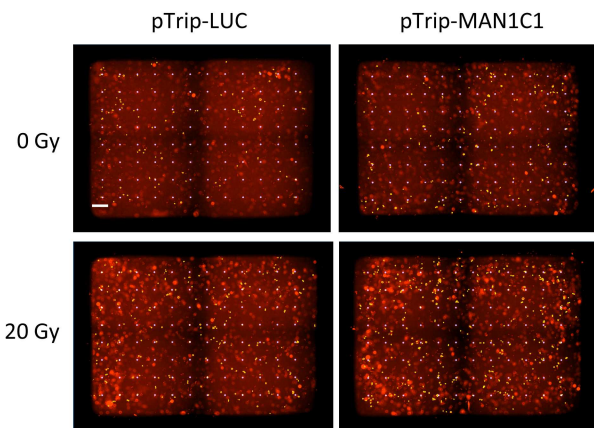
(C) Representative phase contrast and fluorescence (eGFP) images of non-transduced and transduced HUVECs with pTrip-LUC or pTrip-MAN1C1 at the time of initiation of transendothelial migration. Scale bar, 200 μ m.

(D) Quantification of transendothelial migration of THP-1 mKate2 cells as a function of lentiviral vector treatment and radiation dose 24, 48 and 72 h after the initiation of the transmigration in the presence of 100 nM MCP1 in the wells of the reservoir plates. The experiment was repeated twice. Data are mean \pm SEM derived from n=8 technical replicates. One-way ANOVA test with Tukey correction. ns, not significant, *P \leq 0.05, ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001.

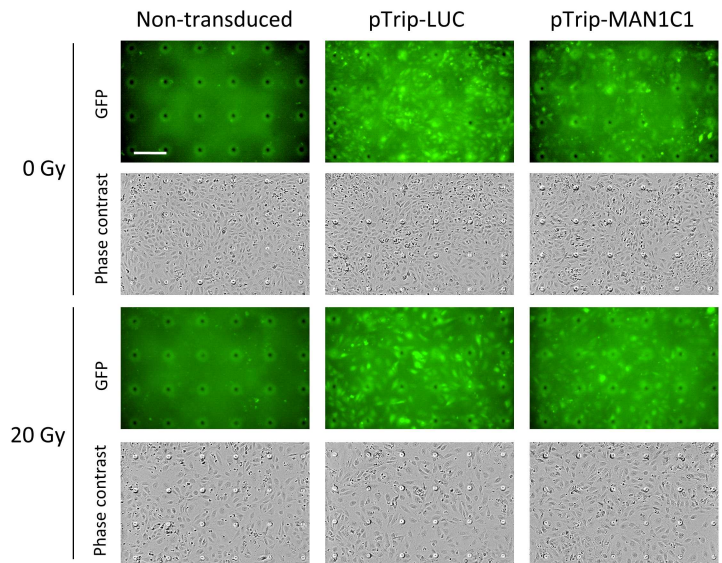
Figure 7



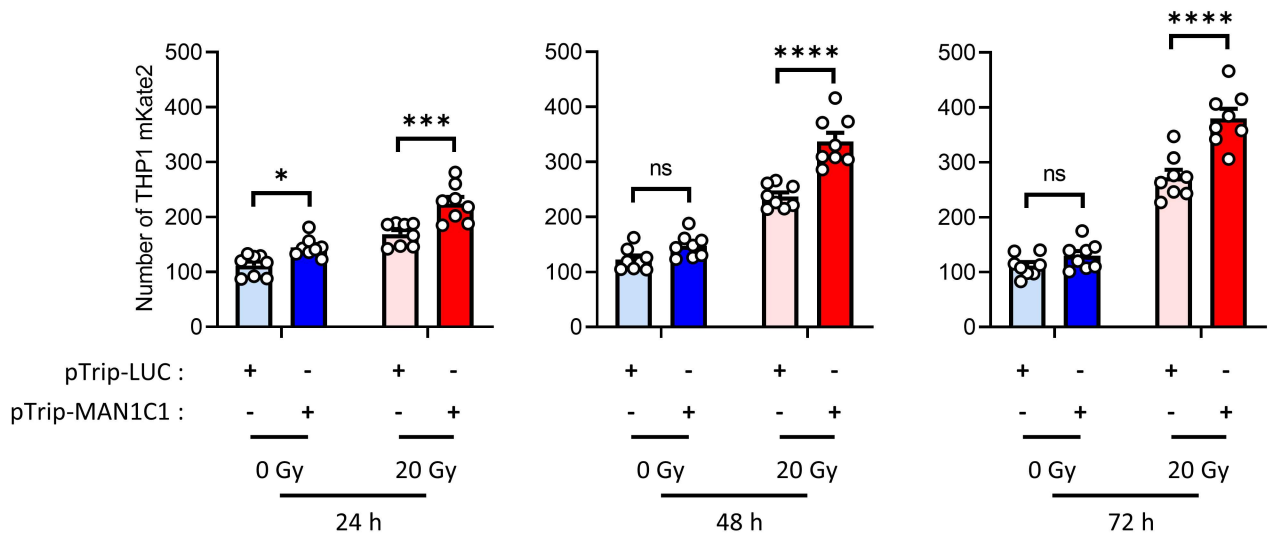
B



C



D



A role for the endothelial α -mannosidase MAN1C1 in radiation-induced immune cell recruitment

Ségolène Ladaigue,^{1,2} Anne-Charlotte Lefranc,¹ Khadidiatou Balde,¹ Monica Quitoco,¹ Emilie Bacquer,¹ Didier Busso,³ Guillaume Piton,³ Jordane Dépagne,³ Nathalie Déschamps,⁴ Valérie Buard,¹ Georges Tarlet,¹ Agnès François,¹ Vincent Paget,¹ Fabien Milliat,¹ and Olivier Guipaud^{1,5*}

SUPPLEMENTAL FIGURES

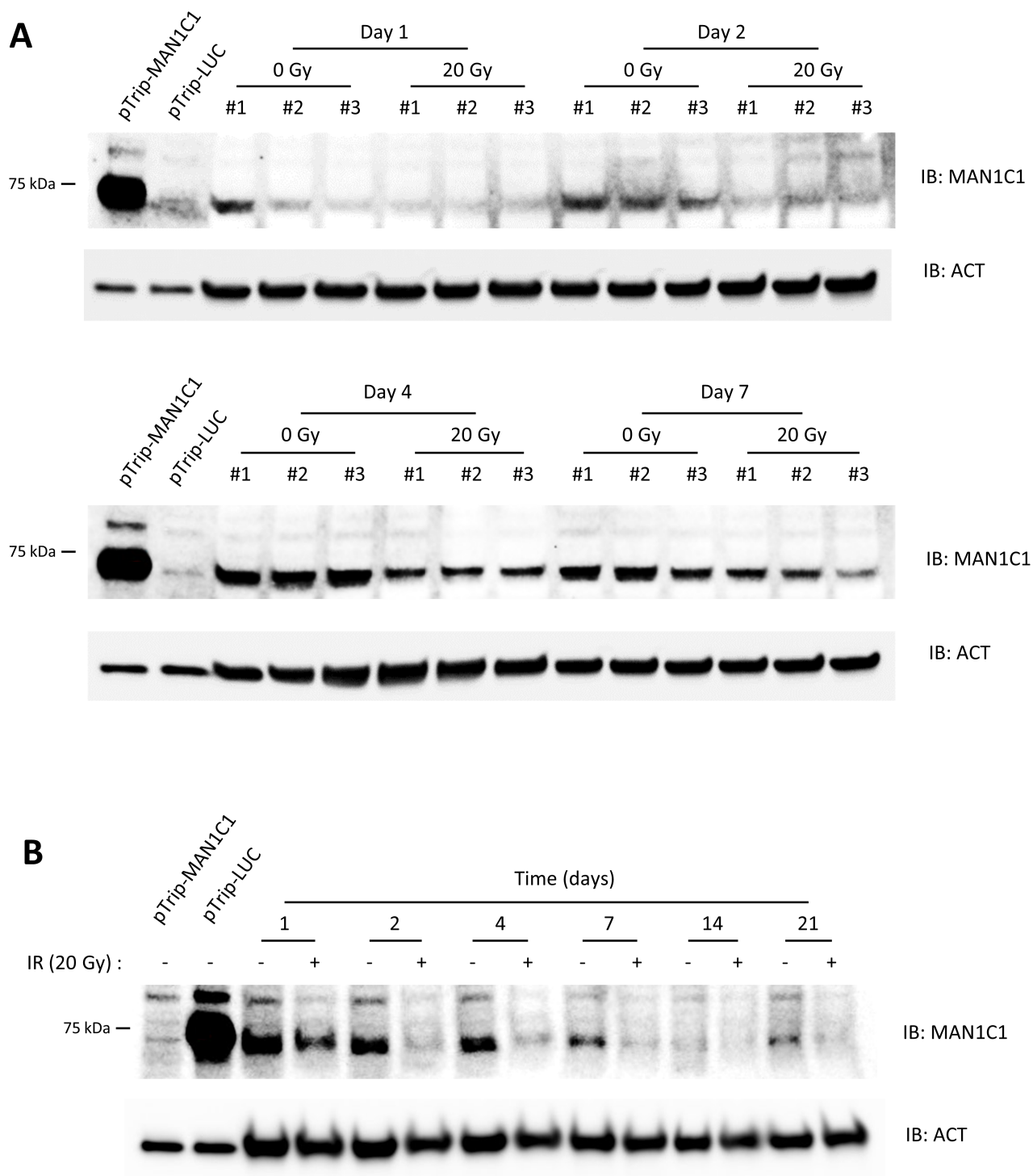


Figure S1. The abundance of endogenous MAN1C1 protein decreases in HUVECs after irradiation. Related to Figure 1. (A) HUVECs were irradiated at 20 Gy or not irradiated, and proteins were collected 1, 2, 4 and 7 days after irradiation. As a positive control of the MAN1C1 signal on the Western blot membrane, HUVECs were transduced with the pTrip-MAN1C1 or the pTrip-LUC lentiviral particles (2 μ g per well). Three independent samples (#1, #2 and #3, 15 μ g per well) were analyzed for each dose and each day post-irradiation. These representative Western blot images performed with anti-MAN1C1 and anti-Actin B antibodies were used to quantify changes in expression of MAN1C1 presented in Fig. 1. IB, immunoblot. **(B)** HUVECs were irradiated at 20 Gy or not irradiated, and proteins were collected 1, 2, 4, 7, 14 and 21 days after irradiation. As a positive control of the MAN1C1 signal on the Western blot membranes, HUVECs were transduced with the pTrip-MAN1C1 or the pTrip-LUC lentiviral particles. Representative Western blot images of one experiment from three independent experiments (2 μ g per well for transduced HUVECs, 20 μ g per well for other extracts). IB, immunoblot.

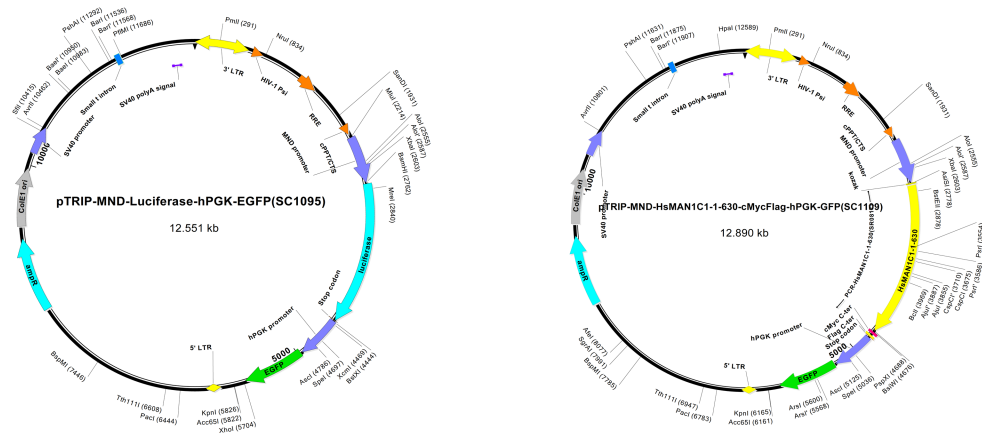
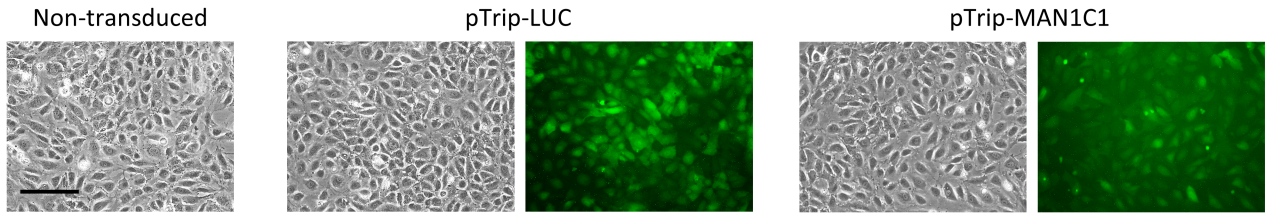
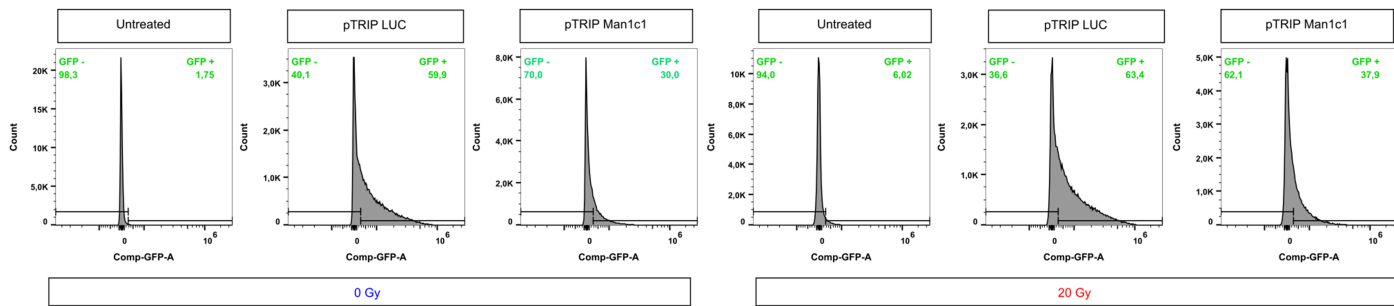
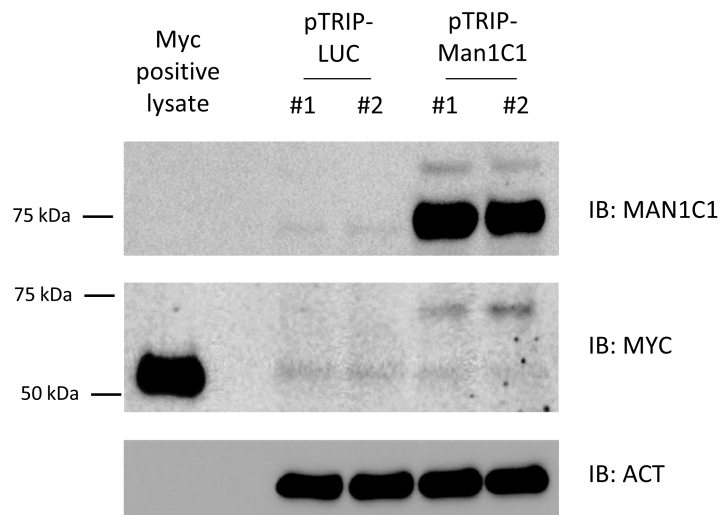
A**B****C****D**

Figure S2. Construction of a lentiviral vector to overexpress MAN1C1 protein. Related to Figure 1. (A) Vector maps of the lentiviral vectors pTriP-MND-HsMAN1C1-1-630-cMycFlag-hPGK-GFP (pTriP-MAN1C1) and pTriP-MND-Luciferase-hPGK-GFP (pTriP-LUC). **(B)** Representative phase contrast and fluorescence images (eGFP) of non-transduced and transduced HUVECs with pTriP-LUC or pTriP-MAN1C1. Scale bar, 50 μ m. **(C)** Representative flow cytometry histograms showing eGFP expression of non-transduced (untreated) and non-irradiated and irradiated at 20 Gy HUVECs transduced with pTriP-LUC or pTriP-MAN1C1. **(D)** Representative Western blot images performed with anti-MAN1C1, anti-Actin B and anti-His tag (MYC) antibodies (2 independent samples, #1 and #2, 2 μ g of proteins per well). A Myc positive lysate was loaded as a control of band detection (first well). IB, immunoblot.

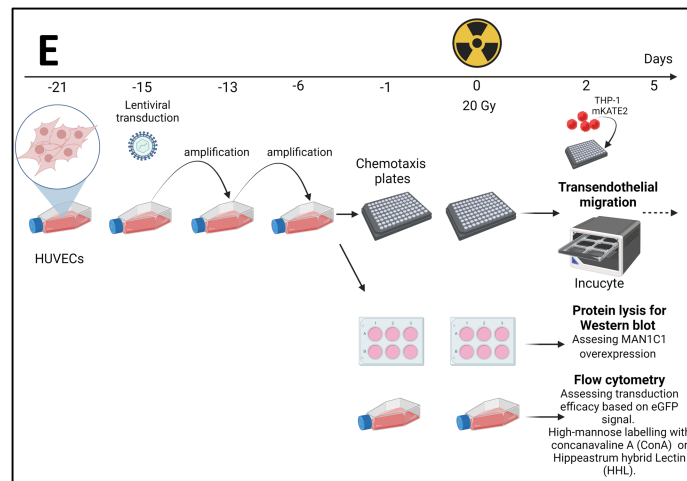
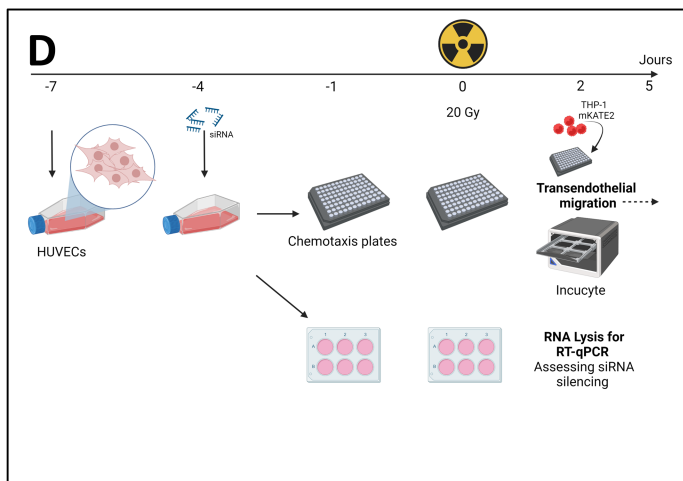
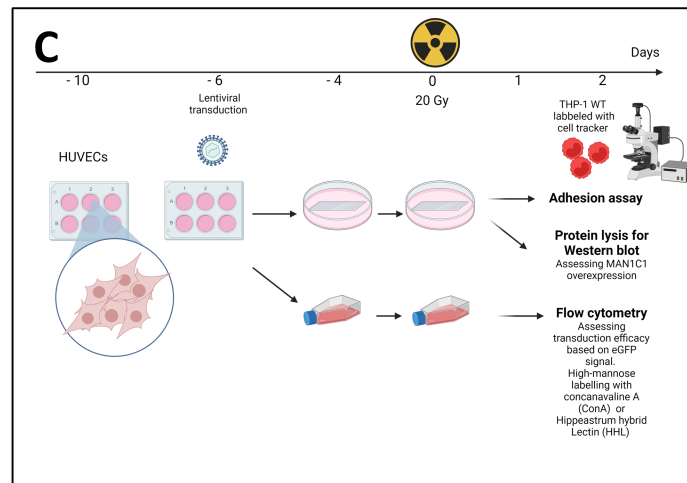
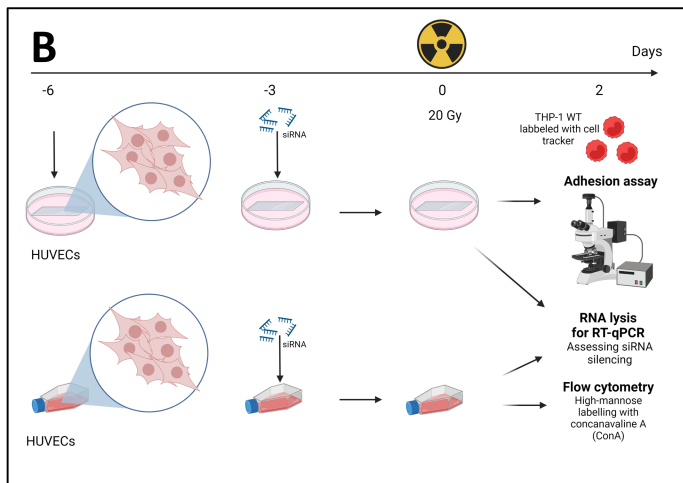
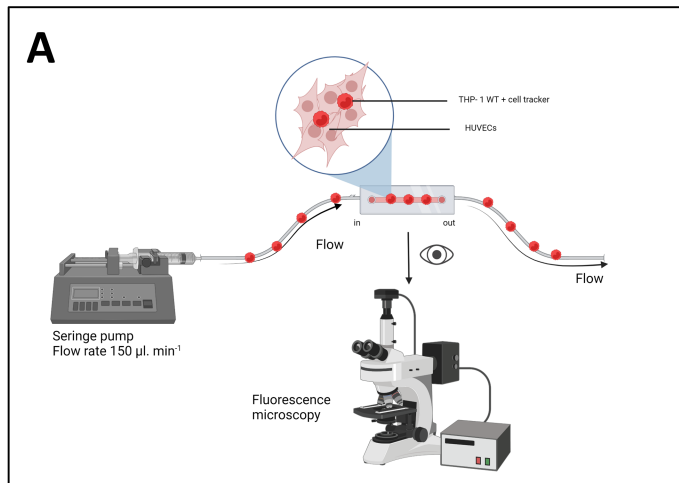
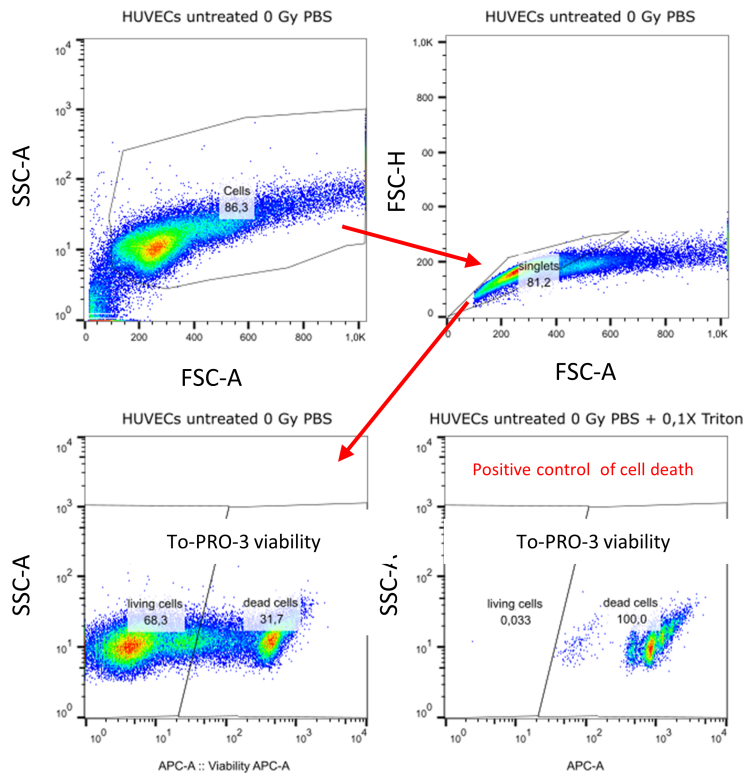


Figure S3. Experimental strategy for the functional study of monocyte-endothelium interactions after irradiation. Related to Figures 2, 3, 6 and 7. (A) Experimental installation for the study of monocyte adhesion on a HUVECs layer under flow. **(B)** Monocyte adhesion assay under flow after siRNA transfection. **(C)** Monocyte adhesion assay under flow after lentiviral transduction. **(D)** Monocyte transendothelial migration assay under flow after siRNA transfection. **(E)** Monocyte transendothelial migration assay under flow after lentiviral transduction.

A



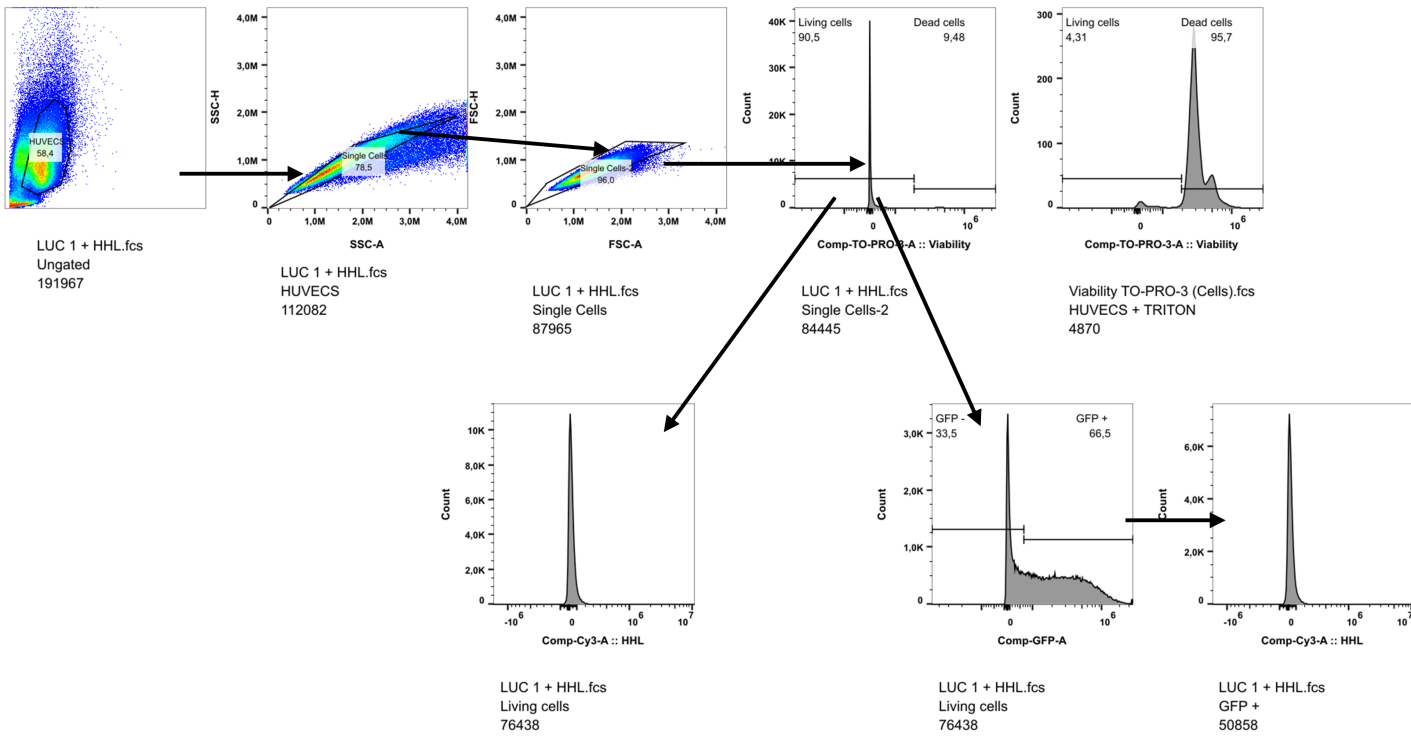
B

	Count 1	Cells/ singlets living cells Count 1	median FITC ConA
HUVECs untreated 0 Gy PBS	79416	38024	1,77
HUVECs untreated 0 Gy ConA 1	58280	11081	229
HUVECs untreated 0 Gy ConA 2	56017	11183	228
HUVECs untreated 0 Gy ConA 3	56730	10630	247
HUVECs untreated 20 Gy PBS	48794	16103	1,44
HUVECs untreated 20 Gy ConA 1	83824	12481	260
HUVECs untreated 20 Gy ConA 2	82150	11606	304
HUVECs untreated 20 Gy ConA 3	69347	11916	309
HUVECs si NT 0 Gy PBS	48949	18190	1,11
HUVECs si NT 0 Gy ConA 1	56947	11883	262
HUVECs si NT 0 Gy ConA 2	61628	10901	269
HUVECs si NT 0 Gy ConA 3	68634	11098	262
HUVECs si NT 20 Gy PBS	63705	22881	1,49
HUVECs si NT 20 Gy ConA 1	70370	11496	311
HUVECs si NT 20 Gy ConA 2	29636	4551	321
HUVECs si NT 20 Gy ConA 3	71796	12358	341
HUVECs si MAN1C1 0 Gy PBS	38750	15442	1,10
HUVECs si MAN1C1 0 Gy ConA 1	52049	12292	312
HUVECs si MAN1C1 0 Gy ConA 2	56544	13471	351
HUVECs si MAN1C1 0 Gy ConA 3	50747	11931	348
HUVECs si MAN1C1 20 Gy PBS	44733	16047	1,44
HUVECs si MAN1C1 20 Gy ConA 1	68262	11355	404
HUVECs si MAN1C1 20 Gy ConA 2	62124	13509	438
HUVECs si MAN1C1 20 Gy ConA 3	61876	12840	462

Figure S4. Gating strategy for flow cytometry analysis of HUVECs labeled with FITC-Concanavalin A (FITC-Con A). Related to Figure 2. (A) Gating strategy on a representative non-labeled (PBS) and non-irradiated (0 Gy) sample. Cells were first gated on the basis of their size (FSC-A) and granulometry (SSC-A), then on singlet cells and finally on their viability assessed by To-Pro-3 labeling (APC-A). The bottom right panel shows the location of dead cells using a sample of cells treated with Triton X100. **(B)** Individual values of FITC-Con A median values of fluorescence of singlet living cells for one representative experiment.

A

Positive control
of cell death



B

0 Gy	HUVECS/ Single Cells/ Single Cells-2 Living cells Count	HUVECS/ Single Cells/ Single Cells-2 Living cells Median Comp-Cy3-A :: HHL	HUVECS/ Single Cells/ Single Cells-2/ Living cells GFP - Freq. of Parent	HUVECS/ Single Cells/ Single Cells-2/ Living cells GFP + Freq. of Parent	HUVECS/ Single Cells/ Single Cells-2/ Living cells GFP + Median Comp-Cy3-A :: HHL
LUC 1 + HHL.fcs	76438	33650	33,5	66,5	32489
LUC 1.fcs	92836	-4060	35,2	64,8	-5799
LUC 2 + HHL.fcs	78228	32489	32,5	67,5	31908
LUC 2.fcs	74031	-3480	33,0	67,0	-5220
MAN 1 + HHL.fcs	72677	34811	59,6	40,4	36554
MAN 2 + HHL.fcs	109827	35392	59,8	40,2	37715
MAN 1.fcs	74178	580	60,3	39,7	580
MAN 2.fcs	72481	580	60,2	39,8	580
NT 1 + HHL.fcs	72990	44106	98,8	1,18	145001
NT 1.fcs	75571	3480	98,5	1,54	61558
NT 2 + HHL.fcs	75901	44106	99,0	0,96	147977
NT 2.fcs	74349	3480	98,9	1,12	66219
Unstained.fcs	81281	2320	98,3	1,66	61558

20 Gy	Living cells Count	Living cells Median Comp-Cy3-A :: HHL	Living cells GFP - Freq. of Parent	Living cells GFP + Freq. of Parent	Living cells GFP + Median Comp-Cy3-A :: HHL
LUC 1 + HHL.fcs	71114	51083	22,8	77,2	49338
LUC 1.fcs	48050	-6379	23,2	76,8	-8699
LUC 2 + HHL.fcs	70766	52246	22,8	77,2	50501
LUC 2.fcs	71679	-5799	23,2	76,8	-8699
MAN 1 + HHL.fcs	73003	53991	41,8	58,2	52246
MAN 2 + HHL.fcs	42002	57483	44,5	55,5	55155
MAN 1.fcs	76299	580	40,6	59,4	0
MAN 2.fcs	42679	580	43,5	56,5	-580
NT 1 + HHL.fcs	69671	67385	95,0	4,95	146786
NT 1.fcs	118706	5799	94,5	5,46	66802
NT 2 + HHL.fcs	69786	67385	94,7	5,27	143812
NT 2.fcs	48089	8119	93,9	6,06	67968
Unstained.fcs	22469	4640	94,5	5,51	63888

Figure S5. Flow cytometric analysis of HUVECs transduced with lentiviral particles expressing eGFP and labeled with HHL-Cy3 lectin. Related to Figure 3. (A) Gating strategy on a representative HHL-Cy3 non-irradiated sample transduced with pTrip-LUC. Cells were first gated on the basis of their size (FSC-A) and granulometry (SSC-A), then on the basis of singlet cells and viability assessed by To-Pro-3 labeling (APC-A). Representative flow cytometry plots of GFP and HHL-Cy3 signals analysis are shown at the bottom. The up-right panel shows the location of dead cells using a sample of cells treated with Triton X100. **(B)** Individual values of median fluorescence of HHL-Cy3 on living cells and eGFP+ cells, and percentage of GFP- and GFP+ cells for each samples.

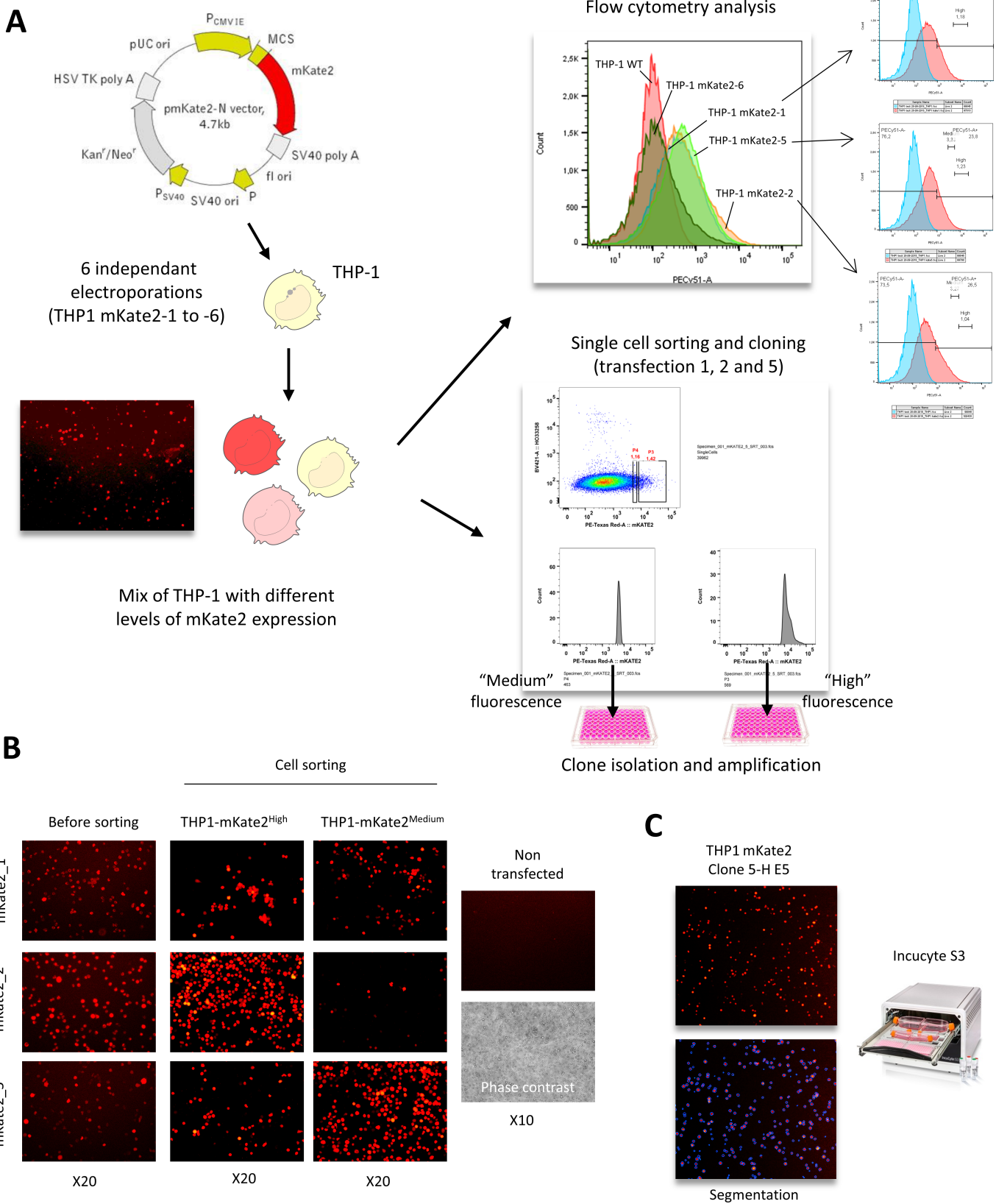


Figure S6. Creation a THP-1 line expressing the mKate2-N red protein to evaluate transendothelial migration. Related to Figure 4. (A) Six independent electroporations were performed with pmKate2-N plasmid . After amplification, cells were analyzed on a SORP LSR-II analyzer (upper panels). For the three independent electroporations THP-1 mKate2-1, THP-1 mKate2-2 and THP-1 mKate2-5, cells were sorted on a FACSaria II cell sorter based on their level of fluorescence (medium or high) and single cells were seeded in 96 wells culture plates. For each electroporation, medium and high fluorescence clones were sorted. The clones were then amplified and selected by fluorescence microscopy based on their fluorescence level by choosing the brightest red clones. Finally, three independent clones, named THP-1 mKate2 1-M C5 (1-M C5), THP-1 mKate2 2-H D11 (2-H D11) and THP-1 mKate2 5-H E5 (5-H E5) were selected and stored at -150°C for further transendothelial migration experiments. **(B)** Representative images of THP1 expressing mKate2 before and after sorting. **(C)** Representative images of THP1 5-H E5 obtained with the Incucyte® imaging system, before (top panel) and after (bottom panel) segmentation (circles in blue).

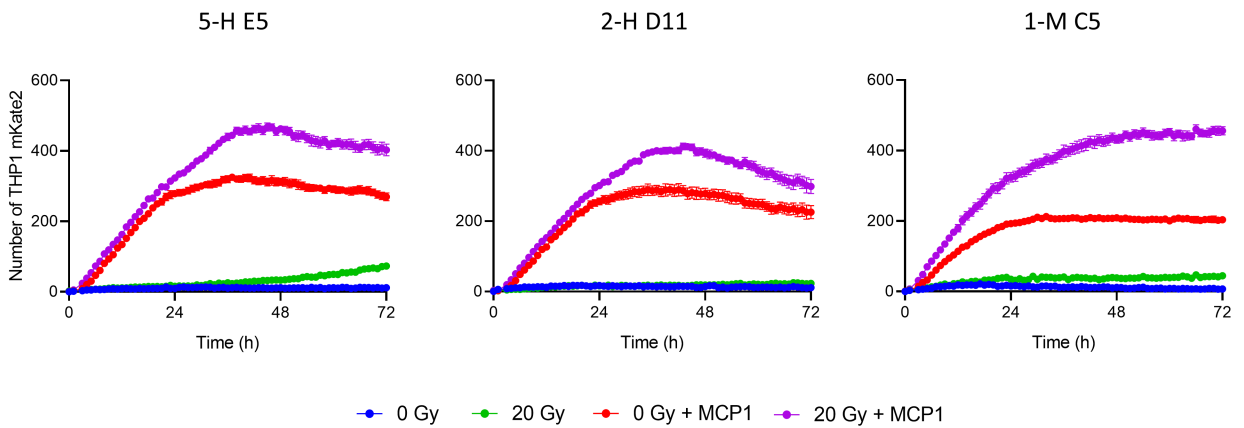
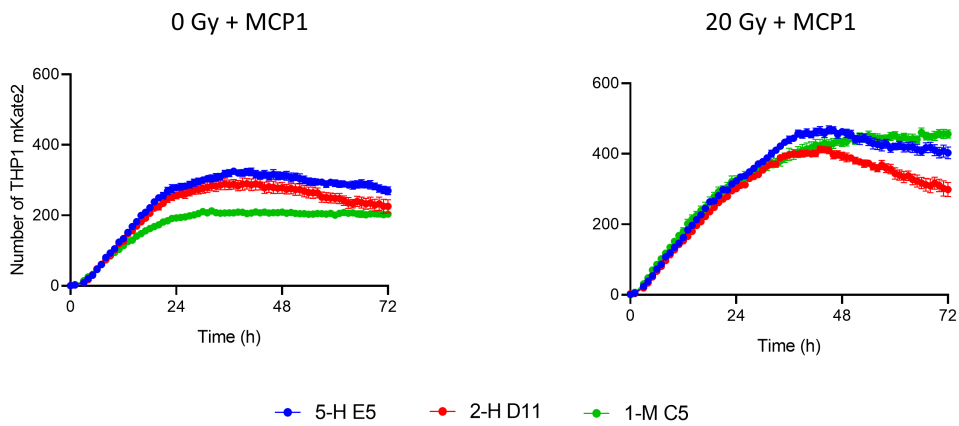
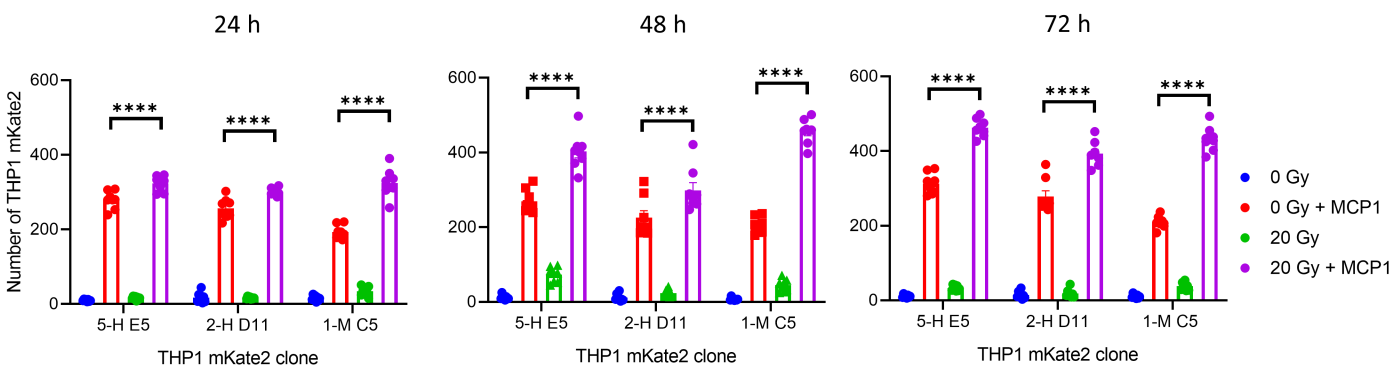
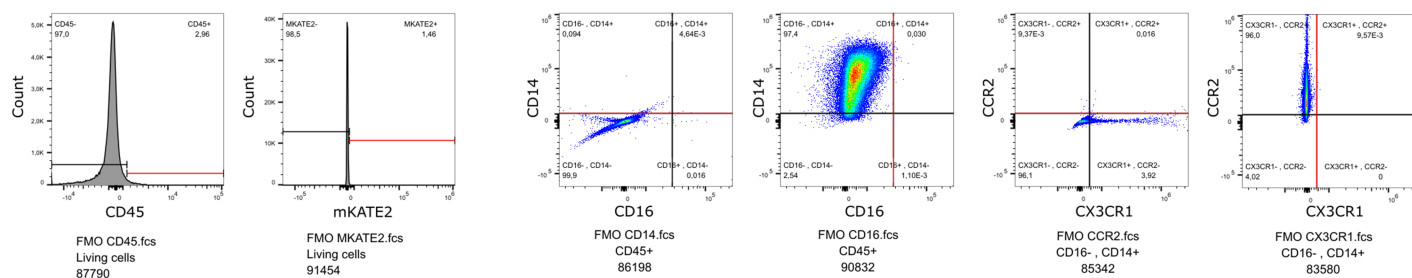
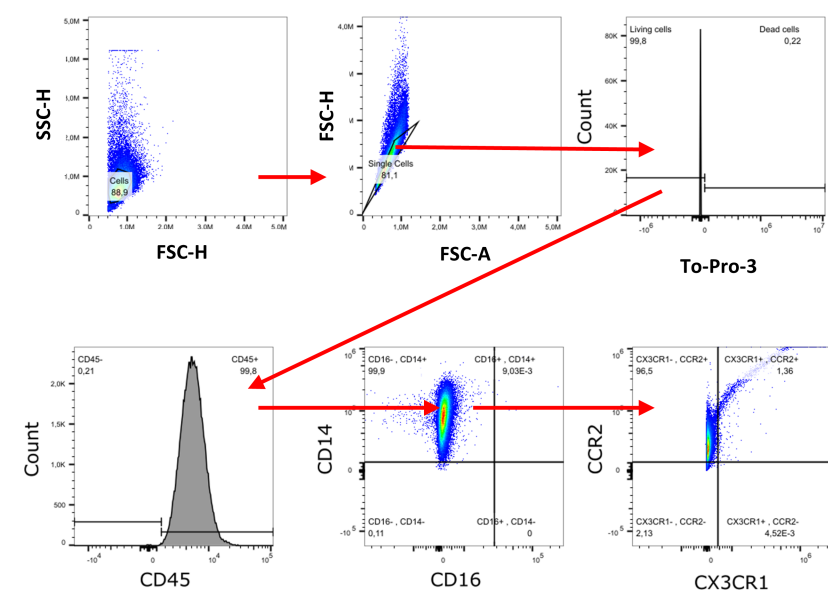
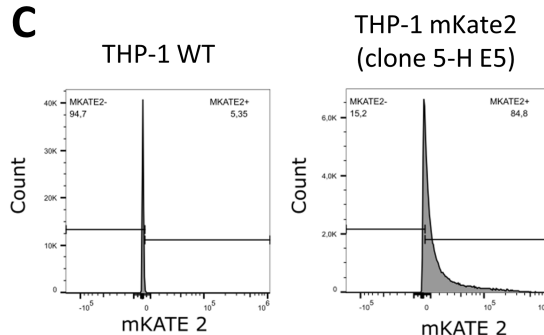
A**B****C**

Figure S7. Comparison of the abilities of three independent THP-1 mKate2 clones to perform transendothelial migration. Related to Figures 4 and 5. (A) Number of THP1 mKate2 5-H E5, 2-H D11 and 1-M C5 cells detected under the membrane by the Incucyte S3 module from 0 to 72 h after initiation of transendothelial migration. HUVECs were irradiated at 20 Gy or not irradiated. The reservoir plate wells contained 100 nM MCP1. **(B)** Same data as in (A) grouped by radiation dose. **(C)** Same data as in (A) for the quantification of transendothelial migration of THP-1 mKate2 cells at 24, 48 and 72 h after the initiation of the transmigration. Data are mean \pm SEM derived from n=8 technical replicates. One-way ANOVA test with Tukey correction. ****P \leq 0.0001.

A**B****C****D**

Sample	Cells / Single Cells Living cells	Cells / Single Cells / Living cells	Cells / Single Cells / Living cells	Cells / Single Cells / Living cells	Cells / Single Cells / Living cells	Cells / Single Cells / Living cells	Cells / Single Cells / Living cells	Cells / Single Cells / Living cells	CD45+ CD16-, CD14+	CD45+ CD16-, CD14+	MKATE2+	Cells / Single Cells Living cells
	Living cells	CD45+	CD45+	CD45+	CD45+ Medial	CD45+ Medial	CD45+ Medial	CD45+ Medial	Freq. of Parent	Freq. of Parent	Freq. of Parent	Count
	Medial	Medial	Medial	Medial	Medial	Medial	Medial	Medial				
MKATE2 E5 5-HIGH.fcs	6685	71698	147	3851	31956	8665	96.0	97.3	95.3	84.8	89310	
UNSTAINED MKATE2.fcs	418	3133	3817	5502	1568	7880	3.04	2.88	0	86.9	91716	
UNSTAINED WT.fcs	110	2404	2796	4952	1568	1334	1.45	2.60	14.3	0.22	92504	
WT.fcs	5165	84949	1799	5869	31030	1334	99.8	99.9	96.5	5.35	88815	

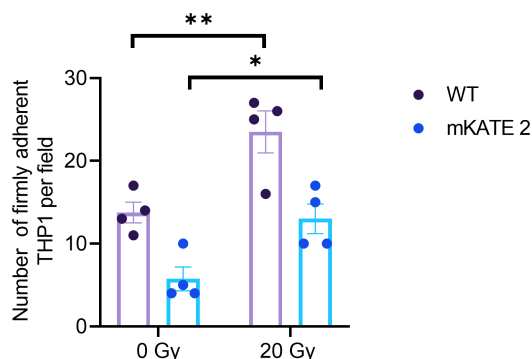
E

Figure S8. Cell-surface protein markers of THP-1 and THP-1 mKate2 H-5 E5 cells, and ability of H-5 E5 cells to adhere under flow condition to a monolayer of irradiated endothelial cells. Related to Figure 4. (A) Validation of the gating strategy using fluorescence-minus-one (FMO) controls. Background staining and negative/positive boundaries (red lines) were determined using FMO controls for the definition of (i) CD45⁺ cells, (ii) mkate2⁺ cells, (iii) CD14⁺ cells, (iv) CD16⁺ cells, (v) CCR2⁺ cells, (vi) CX3CR1⁺ cells. **(B)** Representative flow cytometry plots of the 6 fluorescent parameters of THP-1 WT cells. **(C)** Comparison of mKate2 signal between THP-1 (left) and THP-1 mKate2 clone 5-H E5 (right). **(D)** Median of fluorescence for each parameters (CD45, mKATE2, CD14, CD16, CCR2, CX3CR1) and frequency of parents for CD45⁺, CD45⁺CD14⁺CD16⁺, CD45⁺CD14⁺CD16⁺CCR2⁺CX3CR1⁺ populations in THP-1 and THP-1 mKATE2 clone 5-H E5 cells. **(E)** Adhesion assay under flow condition on a monolayer of non-irradiated or irradiated at 20 Gy HUVECs with either THP-1 or THP-1 mKate2 clone 5-H E5 cells both fluorescently labeled with CellTracker™ Red CMPTX. Data are mean ± SEM derived from n=4 technical replicates. One-way ANOVA test with Tukey correction. *P ≤ 0.05.

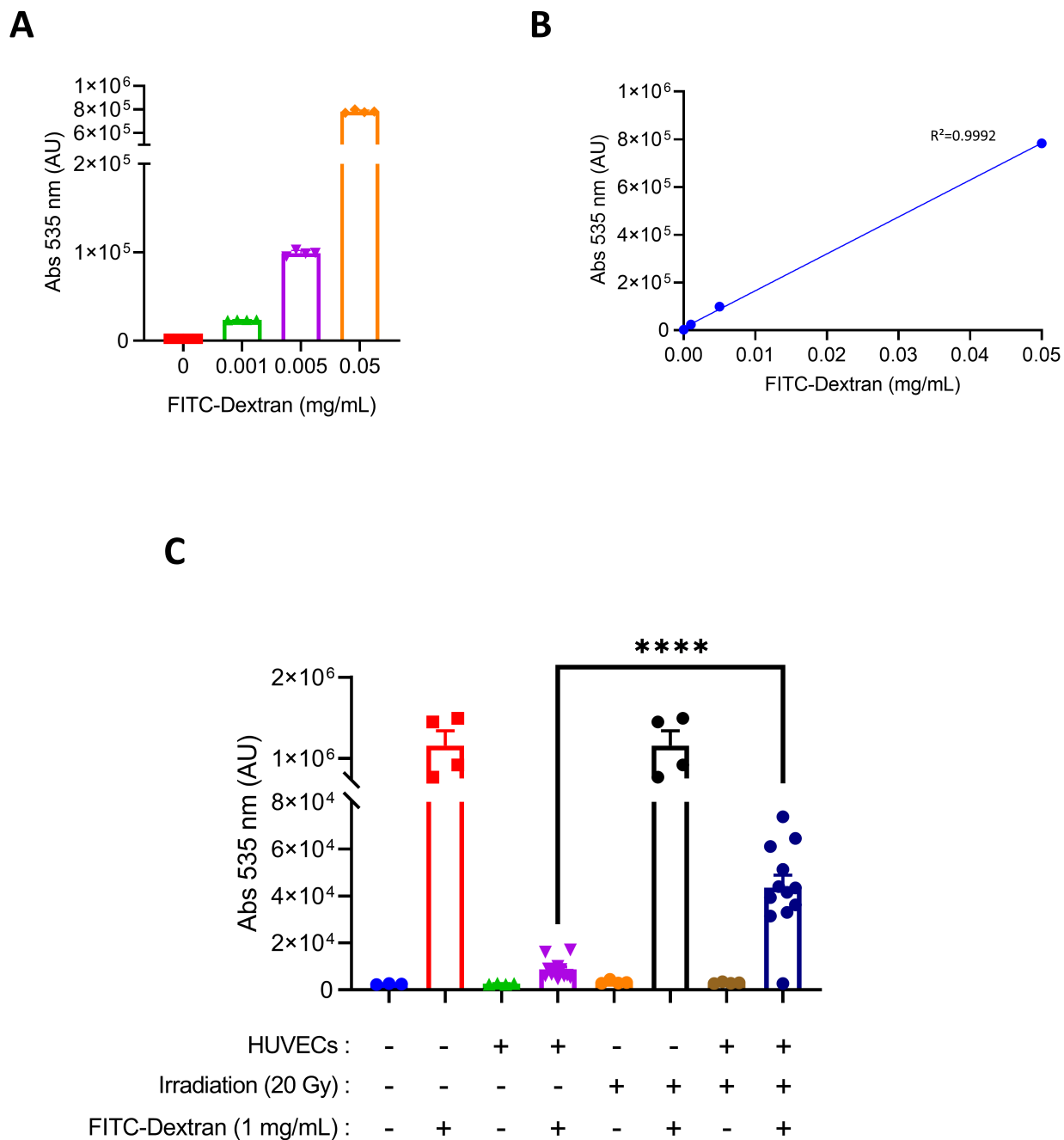


Figure S9. Integrity of the unirradiated and irradiated endothelial barrier in the transendothelial migration assessment model. Related to Figure 5. (A) Absorbance range of FITC-Dextran in PBS solution. **(B)** Same data as in (A) represented as a function of FITC-Dextran concentration. Curves were fitted by linear regression with line and least squares fitting parameters. **(C)** Quantification graph of FITC-Dextran absorbance in the reservoir plate wells of the chemotaxis cell migration plate. HUVECs were seeded on wells of a chemotaxis IncuCyte™ ClearView™ 96-Well Cell Migration Plate. 24 h after seeding HUVECs, the plates were not irradiated or irradiated at 20 Gy. 24 h after irradiation, FITC-Dextran at a concentration of 1 mg/mL was added to the top compartment of the cell migration plate. Plates were incubated at 37°C in the dark for 3 hours and fluorescence was measured at 535 nm in the PBS solution of the reservoir plate. Data are mean ± SEM derived from n=4 technical replicates. One-way ANOVA test with Tukey correction. ****P ≤ 0.0001.

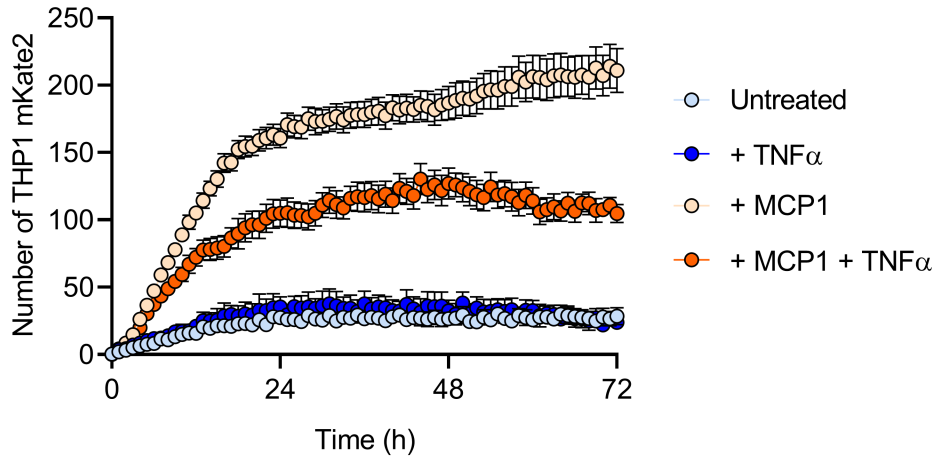
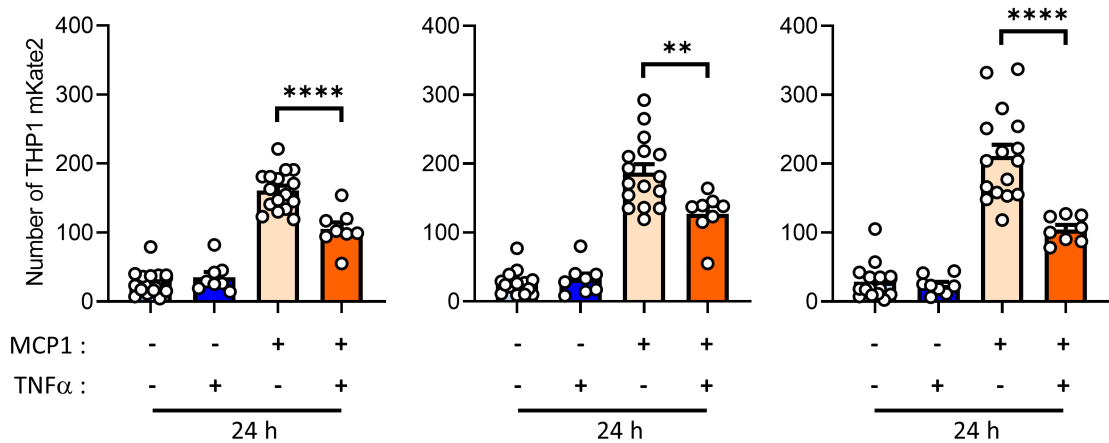
A**B**

Figure S10. Decreased transendothelial migration of THP-1 monocytes on a HUVEC monolayer treated with TNF α . Related to Figure 7. Cells were seeded on wells of a chemotaxis IncuCyte™ ClearView™ 96-Well Cell Migration Plate for transendothelial migration assay. 24 h after seeding, HUVECs were untreated or treated for 24 h with 10 μ g/mL TNF α . Two days after TNF α treatment, THP1 mKate2 clone 5-H E5 cells were added into the wells containing HUVECs and culture medium containing 100 nM MCP1 was added into the wells of the plate reservoir. Plates were placed in the IncuCyte S3 live cell analysis system in a cell culture incubator to monitor the transendothelial migration of monocytes for 3 days. **(A)** Number of THP1 mKate2 detected under the membrane by the IncuCyte S3 module from 0 to 72 h after initiation of transendothelial migration. **(B)** Quantification of transendothelial migration of THP-1 mKate2 cells as a function of TNF α treatment 24, 48 and 72 h after the initiation of the transmigration. The experiment was repeated twice. Data are mean \pm SEM derived from n=8-16 technical replicates. One-way ANOVA test with Tukey correction. **P \leq 0.01, ****P \leq 0.0001.

II. Résultats complémentaires *in vitro*

La majorité du travail de la thèse s'est articulée autour de l'étude de l'axe MAN1C1 – N-glycosylations hautement mannosylées. Cependant, nous nous sommes intéressés à d'autres acteurs potentiellement impliqués dans le recrutement des monocytes par l'endothélium irradié. Ainsi, nous avons étudié un autre motif de glycosylation, le motif sialyl Lewis X, et deux signalisations caractéristiques du recrutement des monocytes « classiques », à savoir le récepteur CCR2 et le ligand CCL2 (MCP-1), et des monocytes « non classiques », à savoir le récepteur CX3CR1 et le ligand CX3CL1 (ou fractalkine). Les résultats de ces expériences sont présentés ci-après. La discussion de ces résultats se fera au sein de la discussion générale de la thèse.

II.1 Étude préliminaire du motif Sialyl Lewis X sur les cellules endothéliales après irradiation

Les travaux de thèse de Cyprien Jaillet sur les modifications du glycome endothélial après irradiation ont suggéré l'augmentation de motifs sialylés à la surface des HUVECS (Jaillet et al. 2017). En effet, une augmentation des marquages par les lectines Mal II (*Maackia amurensis Leukoagglutinin*) et SNA (*Sambucus nigra Agglutinin*) fluorescentes à la surface des HUVECS après irradiation à 20 Gy suggèrent que des motifs sialylés sont plus exprimés à la surface des HUVECS en réponse à l'irradiation. Étant donné que l'adhésion radio-induite des monocytes sur l'endothélium irradié ne peut pas être totalement expliquée par les glycosylations hautement mannosylées (Jaillet et al. 2017), nous avons voulu savoir si ces motifs sialylés sont des motifs sialyl Lewis X (sLe^X) qui participent à l'adhésion des THP-1 à l'endothélium irradié. Les motifs sLe^X sont en effet les ligands privilégiés des sélectines, fortement exprimées par les lymphocytes, mais également par les cellules myéloïdes (L-sélectine, CD68 L), impliquées dans les interactions avec les cellules endothéliales. Des marquages spécifiques des motifs sLe^X par un anticorps ont été analysés par cytométrie en flux sur les HUVECS irradiées ou non à 20 Gy à deux, quatre et huit jours post-irradiation. Aucune différence n'a été mise en évidence dans ces expériences (résultats non montrés).

II.2 Étude préliminaire du rôle de la signalisation CCR2/CCL2 sur la transmigration endothéliale post-irradiation *in vitro*

Plusieurs études suggèrent que la signalisation CCR2/CCL2 a un rôle dans le recrutement des monocytes/macrophages et participerait au développement de toxicités radio-induites, comme abordé dans le paragraphe de l'état de l'art [II.3 Rôle du compartiment myéloïde dans les toxicités tardives de la radiothérapie](#). Le récepteur CCR2 est fortement exprimé par les monocytes et régule notamment la sortie de ces cellules de la moelle osseuse *in vivo*. Le ligand privilégié de CCR2, CCL2 (MCP-1) est sécrété par une multitude de cellules, dont les cellules endothéliales qui forment la barrière que toute cellule immunitaire doit traverser pour accéder au tissu.

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si la sécrétion de CCL2 était stimulée chez les HUVECS après irradiation. Pour cela, des mesures de la concentration en CCL2 ont été réalisées par la technique ELISA sur des surnageants d'HUVECS irradiées ou non à 20 Gy. Ces expériences montrent une augmentation d'un facteur 4 à 24 h et d'un facteur 2 à 48 h de la sécrétion de CCL2 par les HUVECS irradiées comparées à la condition non irradiée.

(Figure résultat complémentaire 1).

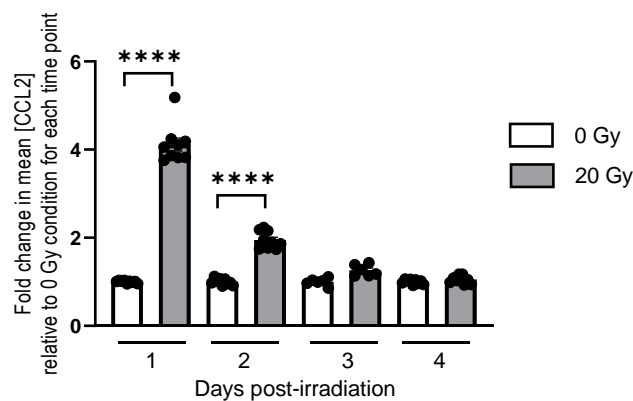


Figure résultat complémentaire 1 : Dosage de la chimiokine CCL2 dans le surnageant d'HUVECS après irradiation.

Les résultats sont présentés sous forme de ratio de la concentration en CCL2 en condition irradiée relativement à la condition non irradiée au temps correspondant. Ces résultats rassemblent n=3 expériences avec 2 ou 3 réplicats techniques par expérience. Chaque point correspond à un réplicat. Statistiques: One-way ANOVA, comparaisons multiples, ajustement des p-values par test de Tukey . ****, $p \leq 0.0001$.

Dans un second temps, nous avons évalué l'impact du traitement des HUVECS par des siRNA contre *ccl2* sur la migration transendothéliale, tout comme nous l'avons fait pour *man1C1* (voir l'article de thèse pour la méthode) (Figure résultat complémentaire 2).

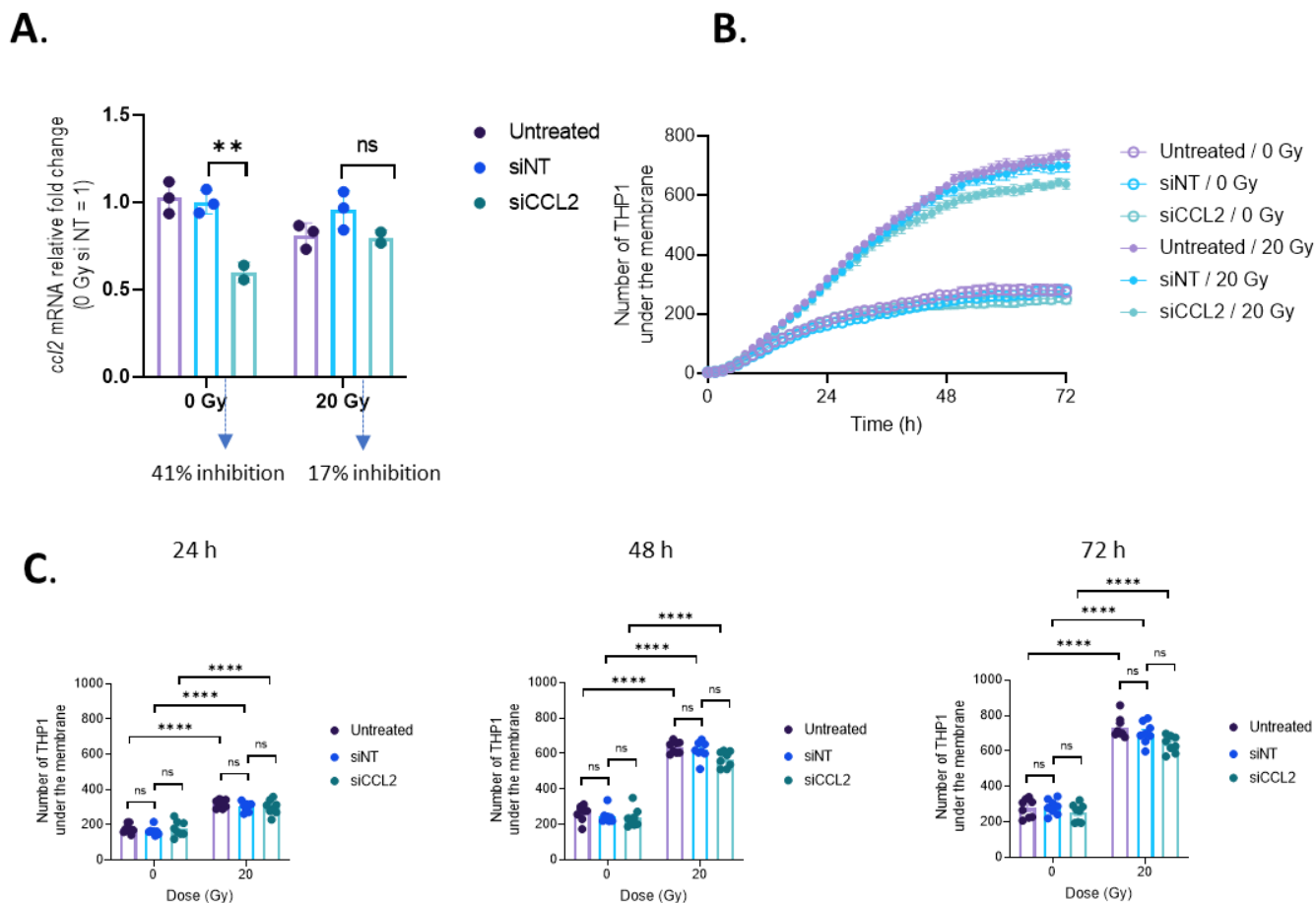


Figure résultat complémentaire 2 : Effet du siRNA contre *ccl2* sur la migration transendothéliale des monocytes après irradiation.

A. Effet du siRNA contre *ccl2* sur l'expression de *ccl2*. RT-qPCR le jour de l'initialisation de la migration transendothéliale (2 jours post-irradiation, 6 jours post-transfection). **B.** Nombre de THP-1 mKATE 2 ayant passé la membrane sur laquelle repose les HUVECs au cours du temps. **C.** Quantification du nombre de THP-1 mKATE 2 ayant passé la membrane après 24, 48 ou 72 heures d'expériences (soit 3, 4 et 5 jours post-irradiation et 7, 8 et 9 jours post-transfection, respectivement). Ces résultats sont ceux d'une expérience représentative parmi plusieurs expériences réalisées (deux en conditions irradiées et trois en conditions non irradiées). Statistiques: One-way ANOVA, comparaisons multiples, ajustement des p-values par test de Tukey ou de Sidak. ns=non significatif; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$; ****, $p \leq 0.0001$. Untreated : cellules non traitées, siNT : cellules transfectées avec un siRNA contrôle, siCCL2 : cellules transfectées avec un siRNA contre *ccl2*.

La **Figure 2A** présente les résultats de qPCR associés à l'expérience de migration transendothéliale. Ils révèlent une inhibition de 41% en condition non irradiée et de 17 % en condition irradiée en présence du siRNA contre *ccl2*, en comparaison au siRNA contrôle (siNT). La **Figure 2B** présente le nombre de THP-1 mKate2 ayant transmigrés au cours du temps et la **Figure 2C** montre la quantification des passages transendothéliaux des THP-1 mKATE 2 à 24, 48 et 72 h après le début de l'expérience. L'irradiation augmente les passages transendothéliaux des THP-1 mKATE 2, le traitement par le siRNA contre *ccl2* n'a aucun effet

sur le taux de passage des THP-1 à travers la couche d'HUVECs. Étant donné que les conditions expérimentales devaient sans doute être améliorées, notamment pour ce qui concerne le taux d'extinction de *cc12* et la concentration de chimioattractant MCP1 dans la plaque réservoir, nous avons décidé de ne pas approfondir l'étude de l'axe CCR2/CCL2 dans la suite de ce projet.

II.3 Étude préliminaire du rôle de la signalisation CX3CR1/CX3CL1 dans l'adhésion et la migration transendothéliale des monocytes post-irradiation *in vitro*

La signalisation CX3CR1/CX3CL1 concerne le recrutement de monocytes non classiques CX3CR1⁺ comme cela a été abordé dans l'état de l'art. Le ligand de CX3CR1, CX3CL1 (ou fractalkine), est retrouvé sous forme sécrétée avec une activité chimioattractante ou ancré à la membrane plasmique médiant une adhésion forte (Imai et al. 1997). Comme pour CCL2, nous avons mesuré la quantité de CX3CL1 sécrétée par les HUVECs après irradiation par technique ELISA. Comme pour CCL2, on observe une sécrétion de CX3CL1 plus importante par les cellules irradiées, d'un facteur 7 à 24 h et d'un facteur 3 à 48 h post-irradiation (**Figure résultat complémentaire 3**).

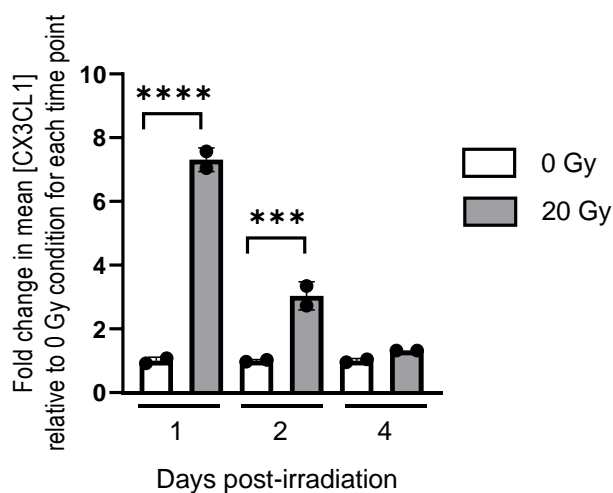


Figure résultat complémentaire 3 : Dosage de la chimiokine CX3CL1 dans le surnageant d'HUVECs après irradiation.

Les résultats sont présentés sous forme de ratio de la concentration en CX3CL1 en condition irradiée relativement à la condition non irradiée au temps correspondant. Ces résultats rassemblent une expérience avec 2 réplicats techniques. Statistiques: One-way ANOVA, comparaisons multiples, ajustement des p-values par test de Tukey. ns=non significant; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$; ****, $p \leq 0.0001$.

L'implication de CX3CL1 dans la migration transendothéliale radio-induite a ensuite été évaluée par un traitement des HUVECs par un siRNA contre *cx3cl1* (**Figure résultat complémentaire 4**). La **Figure 4A** présente les résultats de qPCR associés à l'expérience de migration transendothéliale. Au moment de l'initiation de la migration transendothéliale, nous ne mettons pas en évidence d'effet du siRNA sur l'expression de *cx3cl1*. De façon surprenante, l'irradiation entraîne une diminution de l'expression de *cx3cl1* (**Figure 4A**), alors qu'elle stimule l'expression de la protéine dans le surnageant de culture (**Figure 3**). A des temps plus précoces post-transfection, le siRNA induit bien une inhibition de l'ordre de 50 à 60% (**Figure 4B**), ce qui peut avoir de répercussions sur la production de la protéine, mais que nous n'avons pas investigué. La **Figure 4C** présente le nombre de THP-1 mKate2 ayant transmigrés au cours du temps et la **Figure 4D** montre la quantification des passages transendothéliaux à 24, 48 et 72 h après le début de l'expérience. Alors que l'irradiation augmente les passages transendothéliaux des THP-1 mKate2, comme cela est attendu, une diminution significative du nombre de passages des THP-1 mKATE est observée lorsque les HUVECs sont traitées par le siRNA contre *cx3cl1*, en conditions non irradiée et irradiée, à 24, 48 et 72 h après le début de l'expérience (soit 3, 4 et 5 jours post-irradiation).

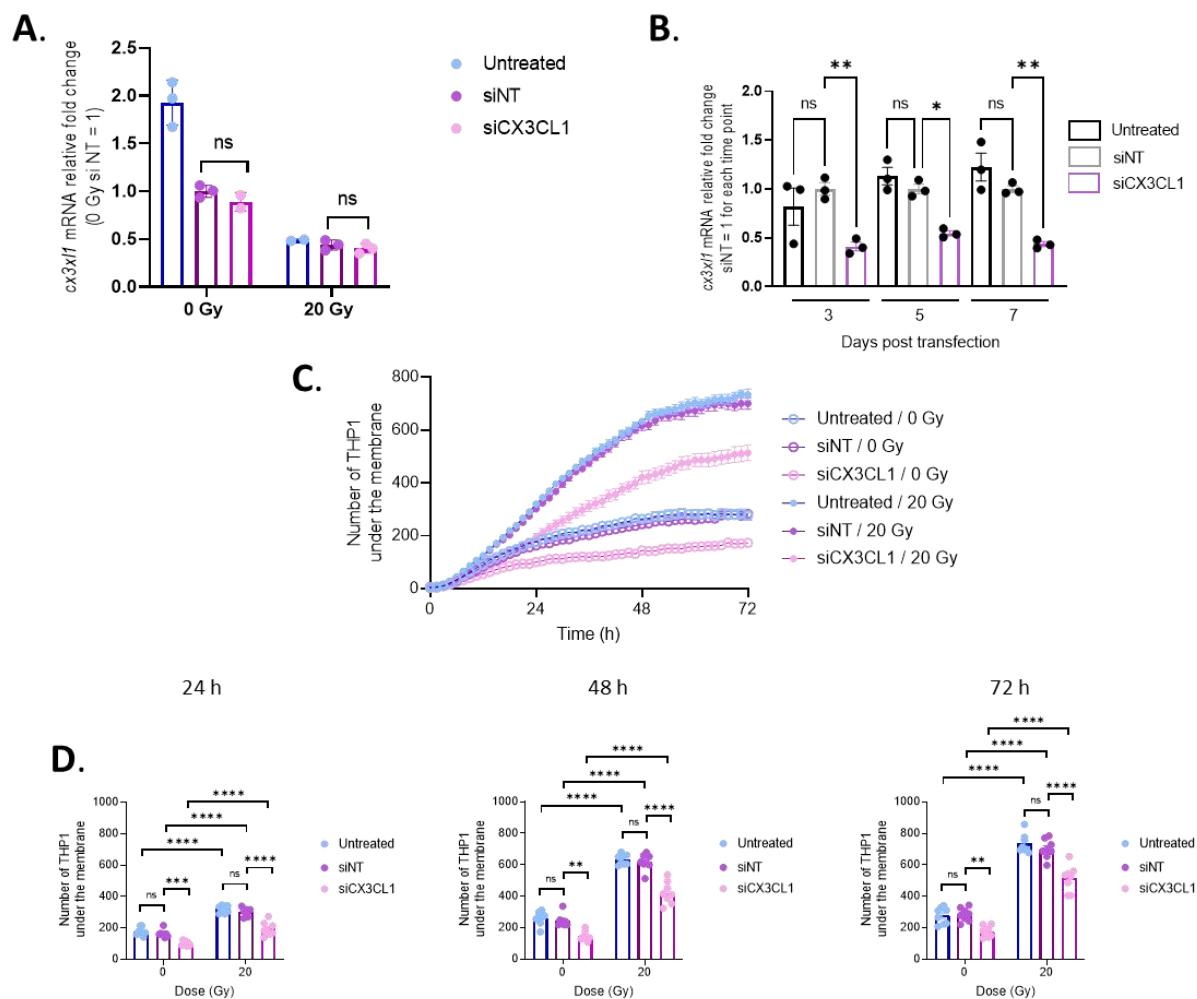


Figure résultat complémentaire 4 : Effet du siRNA contre *cx3cl1* sur migration transendothéliale des monocytes après irradiation.

A. Effet du siRNA contre *cx3cl1* sur l'expression de *cx3cl1*. RT-qPCR le jour de l'initialisation de la migration transendothéliale (2 jours post-irradiation, 6 jours post-transfection). **B.** Effet du siRNA contre *cx3cl1* sur l'expression de *cx3cl1* 3, 5 et 7 jours post-transfection. **C.** Nombre de THP-1 mKATE 2 ayant passés la membrane sur laquelle repose les HUVECs au cours du temps. **D.** Quantification du nombre de THP-1 mKATE 2 ayant passés la membrane après 24, 48 ou 72 heures d'expériences (soit 3, 4 et 5 jours post-irradiation et 7, 8 et 9 jours post-transfection, respectivement). Ces résultats sont ceux d'une expérience représentative parmi plusieurs expériences réalisées (deux en conditions irradiées et trois en conditions non irradiées). Statistiques: One-way ANOVA, comparaisons multiples, ajustement des p-values par test de Tukey ou de Sidak. ns=non significatif; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$; ****, $p \leq 0.0001$. Untreated : cellules non traitées, siNT : cellules transfectées avec un siRNA contrôle, siCX3CL1 : cellules transfectées avec un siRNA contre *cx3cl1*.

Des expériences de transmigration après une incubation préalable des THP-1 mKate2 avec 10 mM de Fractalkine/CX3CL1 ont également été menées, mais nous n'avons pas observé d'effet significativement différent sur la transmigration des THP-1 mKate2 (résultats non montrés). Des expériences d'adhésion en condition de flux ont aussi été réalisées en incubant les THP-1 préalablement marqués au Cell Tracker Red pendant 30 minutes avec 10 nM de Fractalkine/CX3CL1 juste l'expérience. Les résultats de trois expériences indépendantes sont

rassemblés dans la **Figure résultat complémentaire 5**. Le protocole de l'expérience d'adhésion est le même que celui utilisée dans l'article de thèse. Ces résultats indiquent que le traitement avec la Fractalkine/CX3CL1 inhibe l'adhésion en condition irradiée de façon statistiquement significative. L'ensemble des résultats suggèrent que l'axe CX3CL1-CX3CR1 joue un rôle dans le recrutement des monocytes par l'endothélium irradié. Cette thématique paraît donc intéressante à poursuivre et approfondir.

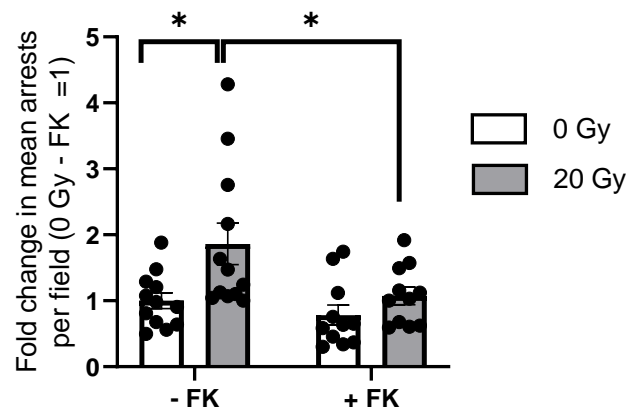


Figure résultat complémentaire 5 : Effet de la fractalkine/CX3CL1 sur l'adhésion des THP-1 en condition de flux *in vitro* après irradiation des HUVECs.

La figure représente le nombre de THP-1 arrêtés par champs de microscopie par rapport à la condition non irradiée et non traitée par CX3CL1 (0 Gy – FK) pour chaque expérience. FK = Fractalkine/CX3CL1. La figure rassemble les résultats de 3 expériences indépendantes avec 3 à 4 réplicats techniques. Statistiques: One-way ANOVA, comparaisons multiples, ajustement des p-values par test de Sidak. ns=non significant; *, $p \leq 0.05$.

III. Résultats complémentaires *in vivo*

Des travaux ont montré la présence de structures glycosylées hautement mannosylées dans les vaisseaux au niveau des plaques d'athérome chez la souris et l'humain (Regal-McDonald et al. 2020; Scott et al. 2012), mais il n'existe pas de preuve de l'augmentation de ces structures au niveau de l'endothélium irradié *in vivo*. Le lien entre augmentation des N-glycosylations hautement mannosylées endothéliales, infiltration immunitaire (en particulier monocytes) et lésions radio-induites est aussi une question à laquelle il n'y a pas d'éléments de réponses directes à notre connaissance. La stratégie du projet de thèse était d'apporter une preuve de concept *in vivo* de l'implication des N-glycosylations hautement mannosylées dans l'inflammation précoce en favorisant le recrutement des leucocytes au niveau de l'endothélium irradié. En fonction de ces résultats, nous voulions explorer leur éventuel rôle dans les lésions radio-induites, précoces et tardives. Pour ce faire, nous avons utilisé des modèles de toxicité radio-induite intestinale précoce et tardive. Ce choix a été motivé par notre volonté de réaliser des expérimentations de microscopie intravitale sur les veines du mésentère pour établir une preuve de concept, et par la disponibilité d'un modèle de toxicité précoce et tardive intestinale dont la mise en place est rapide (développement d'une fibrose en 6 semaines).

III.1 Etudes des interactions entre leucocytes et endothélium par microscopie intravitale sur les veinules du mésentère

La technique de microscopie intravitale sur les veinules du mésentère intestinal a été mise en place et intégrée à différentes thématiques de l'IRSN il y a plusieurs années. Elle a permis de montrer que l'irradiation augmentait les contacts des leucocytes avec la paroi vasculaire (Vereycken-Holler et al. 2002) et l'adhésion des plaquettes (Mouthon et al. 2003), et que l'inactivation chez la souris du gène codant pour PAI-1 diminuait ces interactions (Milliat et al. 2008). Nous avons utilisé cette technique pour quantifier les interactions des leucocytes avec la paroi vasculaire après irradiation après avoir injecté la lectine Concanavaline A (Con A) qui se fixe aux N-glycosylations hautement mannosylées.

Brièvement, le déroulé expérimental a été le suivant : des souris C57Bl6/ J mâles ont été irradiées avec d'un LINAC à 18 Gy à une tension de 10 MV au niveau de l'abdomen sur

une fenêtre de 2 cm au-dessus du pénis. 24 ou 48 h après, nous avons procédé à une analyse par microscopie intravivale. Les animaux ont été anesthésiés par anesthésie injectable (mélange de kétamine / xylasine), potentialisée par des injections de buprénorphine. Nous avons procédé à une laparotomie afin d'extérioriser l'intestin et étaler le mésentère sur une lame de verre pour permettre une visualisation directe sous un microscope inversé à fluorescence. Nous avons ensuite injecté de la rhodamine en intraveineuse par la voie rétro-orbitaire pour marquer les leucocytes puis du PBS ou de la concanavoline A (**Figure résultat complémentaire 6**).

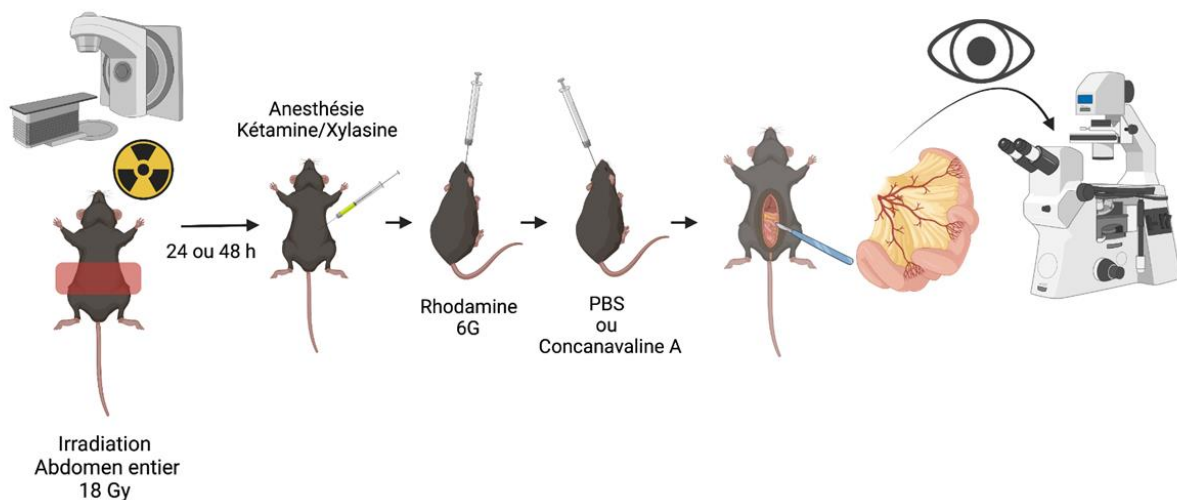


Figure résultat complémentaire 6 : Schéma expérimental de la technique de microscopie intravivale sur les veinules du mésentère.

La mise en place de cette technique s'est révélée complexe. Notamment, la manipulation du tube digestif entraîne une augmentation rapide de l'adhésivité de l'endothélium vis-à-vis des leucocytes circulants (Emre et al. 2015). Une période d'attente de 20 min permet de retrouver un endothélium non adhésif. Nous n'avons cependant pas pu mettre en évidence l'effet de l'irradiation, contrairement à ce qui a été publié. Ces difficultés n'ayant pas pu être surmontées, nous avons choisi une autre stratégie basée sur l'histologie pour évaluer le rôle de N-glycanes hautement mannosylés sur les interactions entre les monocytes et les macrophages.

III.2 Étude du rôle des glycosylations hautement mannosylées *in vivo*

Dans cette partie de l'étude nous avons choisi d'utiliser le même modèle animal d'irradiation abdominale pour évaluer le rôle des glycosylations hautement mannosylées sur l'infiltration des macrophages et sur les lésions précoces radio-induites. Le modèle d'irradiation

abdominale à 18 Gy est un modèle d'atteinte aiguë de type syndrome gastrointestinal avec une mortalité des animaux à partir de 8-10 jours post-irradiation (Bensemmane et al. 2021). L'objectif de ces expériences était d'évaluer l'impact de l'administration intraveineuse de molécules Con A et cyanovirine N (CV-N), qui se fixent aux N- glycosylations hautement mannosylées, sur la quantité de macrophages retrouvés dans le tissu et sur la sévérité des lésions radio-induites. De façon indirecte, ces expériences pouvaient alors être informatives quant à l'implication des N-glycanes hautement mannosylés exprimés en surface de l'endothélium vasculaire irradié sur les premières étapes du recrutement des monocytes. Nous avons choisi deux temps d'étude post-irradiation à 3 et 7 jours post-irradiation. Nous avons administré par injection intraveineuse l'une des deux lectines de façon répétée jusqu'au jour de l'euthanasie. L'intégralité de l'intestin grêle a été prélevée du pylore, pour la partie la plus proximale, au cæcum, pour la partie la plus distale. Pour des raisons pratiques liées au traitement des tissus, l'intestin a été séparé en deux avec une partie proximale et distale (**Figure résultats complémentaires 7**). Toutes les mesures ont été par la suite réalisées sur la partie distale. Les tissus ont été traités, inclus en paraffine et coupés en sections de 5 µm au microtome pour réaliser les colorations et les marquages. Pour observer les lésions, nous avons choisi de réaliser une coloration à l'hémalun-éosine safran (HES) pour visualiser l'architecture du tissu et un marquage avec un anticorps anti-ki67 pour visualiser la prolifération cellulaire. La quantification des macrophages a été possible grâce à un marquage pan-macrophage avec un anticorps anti-CD68.

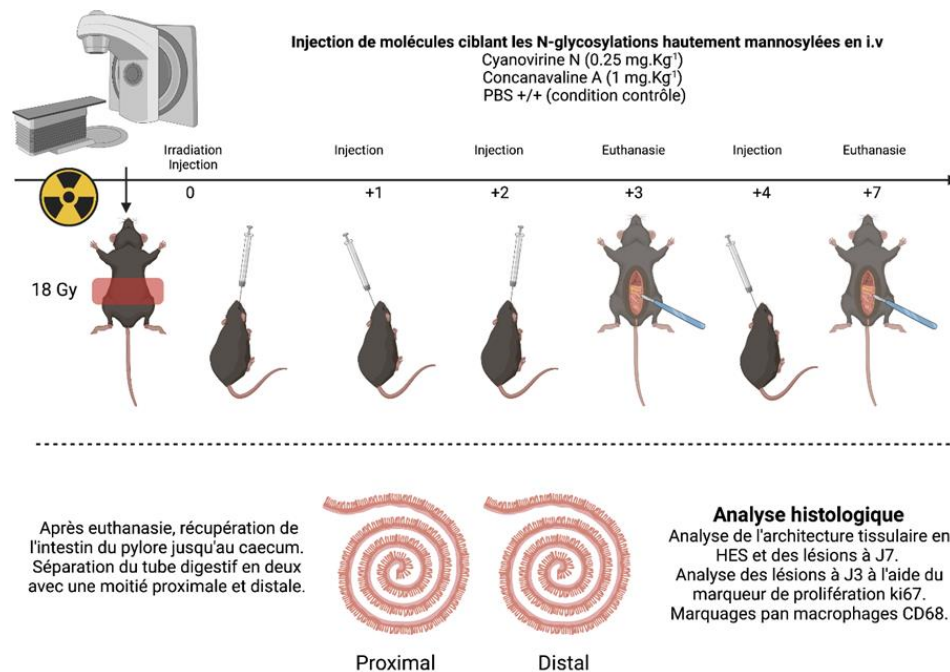


Figure résultat complémentaire 7 : Schéma expérimental de l'évaluation du rôle des N-glycosylations hautement mannosylées dans l'infiltration macrophagique et dans les lésions radio-induites intestinales *in vivo*.

L'intestin grêle est composé d'un épithélium continu organisé en villosités permettant d'assurer sa fonction dans les échanges nutritifs (**Figure résultat complémentaire 8**). On retrouve au niveau des villosités les entérocytes, les cellules en gobelet (ou caliciformes) et les cellules entéro-endocrines. À la base de ces villosités se trouve le compartiment souche composé de différents types cellulaires (crypte intestinale). On retrouve les cellules de Paneth au fond de la crypte, et des cellules souches intestinales qui assurent le renouvellement régulier de l'épithélium. Cet épithélium forme la muqueuse intestinale. En dessous de la muqueuse, on retrouve une fine couche de cellules musculaires et une couche sous-muqueuse très fine en condition non pathologique. Celle-ci peut contenir les plaques de Peyer, un organe lymphoïde

propre à l'intestin. Les couches plus internes sont composées de fibres musculaires circulaires et longitudinales.

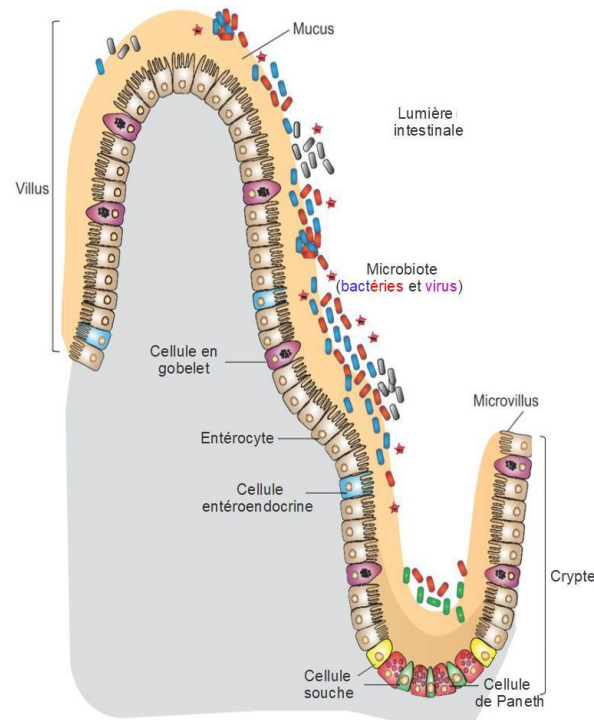


Figure résultat complémentaire 8 : Vue schématique de la structure intestinale.
(Source : Wikipédia)

Résultats

Le temps 3 jours post-irradiation a été choisi car, d'un point de vue histologique, c'est un temps auquel on observe une forte désorganisation du compartiment souche et une arrivée des macrophages dans le tissu lésé. À ce temps, les lésions radio-induites s'illustrent notamment par la perte de cellules ayant des capacités prolifératives et une désorganisation de la crypte où se trouvent les cellules souches (hypoplasie). Les lésions ont été quantifiées sur une longueur de 50 mm depuis le cæcum en mesurant des longueurs d'épithélium sain, non lésé, présentant une structure normale de cryptes associée à un marquage ki67 au niveau des cellules progénitrices de la crypte, et des longueurs d'épithélium lésé avec des cryptes hypoplasiques et une perte du marquage ki67. Les cellules CD68⁺ ont été quantifiés par détection automatique

de bleu. La **figure résultat complémentaire 9** illustre les lésions et l'infiltration de cellules CD68⁺ chez des animaux non irradiés ou irradiés trois jours après irradiation.

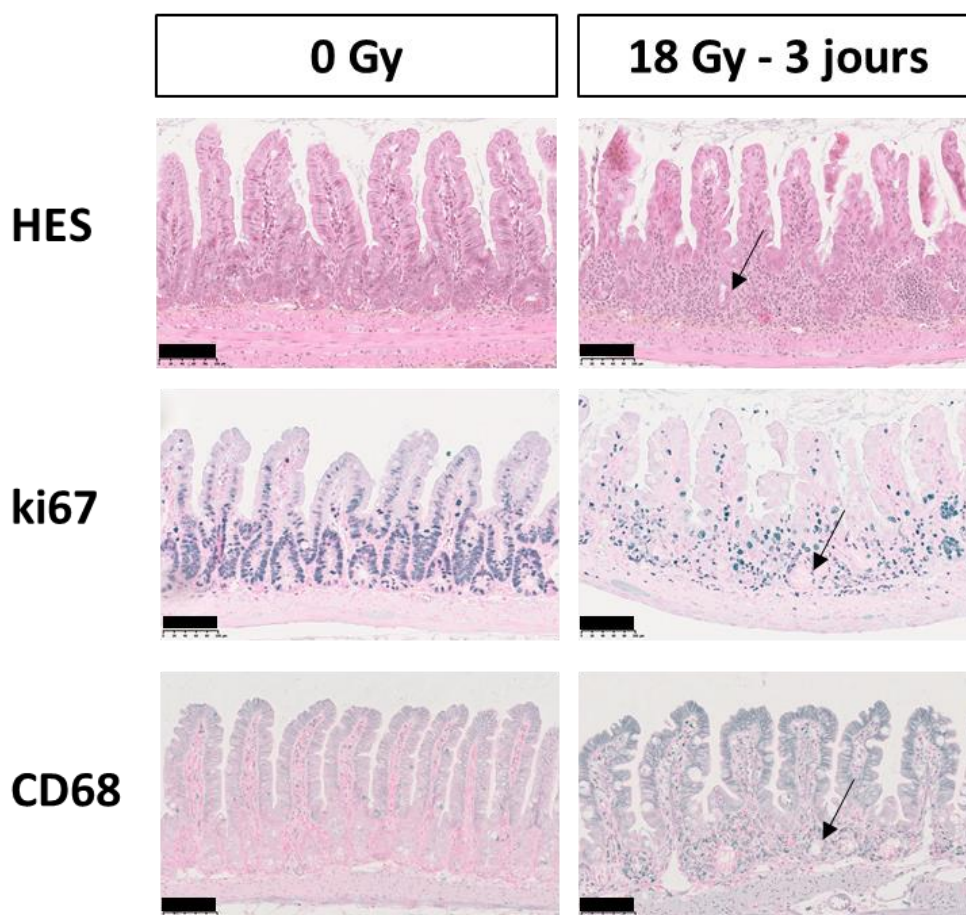


Figure résultat complémentaire 9 : Illustration des lésions et de l'infiltration des macrophages de l'intestin grêle chez la souris 3 jours post-irradiation à 18 Gy.

Les images de gauche correspondent à une muqueuse d'intestin grêle présentant une structure cryptovillositaire normale. Le marquage ki67 souligne les cryptes bien organisés et riches en cellules proliférantes. Le marquage CD68 (bleu) est extrêmement faible et éparse au sein des villosités non irradiées. Les images de droite correspondent à une muqueuse d'intestin grêle lésée avec une forte atteinte des cryptes stérilisés par l'irradiation (flèches noires). Cela est confirmé avec le marquage ki67 qui n'est plus localisé au niveau du compartiment de prolifération et suggère une perte des cellules proliférantes. Le marquage CD68 est important au niveau de la base des villosités, suggérant une infiltration de macrophages dans les zones lésées. Grossissement x20, barre d'échelle, 100 μ m. Les marquages ont été révélés grâce à un anticorps couplé à HRP. Les tissus ont été contre-colorés au *Nuclear fast red*.

Le traitement par les lectines des animaux non irradiés n'a pas révélé de différences d'architecture tissulaire et de marquage CD68. Nous avons comparé le niveau des lésions et le marquage CD68 entre les animaux irradiés traités au PBS, et ceux traités par la Con A ou la CV-N. Nous n'avons pas observé de différences significatives sur aucun des paramètres entre les groupes d'animaux (6 à 9 animaux par groupe).

Pour le temps 7 jours post-irradiation, la coloration HES a suffi pour évaluer les lésions. Nous avons également réalisé un marquage de CD68. Nous avons procédé de la même manière qu'à J3 pour effectuer les mesures. Les lésions les plus sévères s'illustrent par des zones d'ulcérations franches ou dénudation luminale. La structure crypto-villositaire de l'épithélium est totalement perdue et associée à une forte infiltration de cellules inflammatoires. Des lésions moins sévères peuvent être observées lorsque l'ulcération présente une couverture de cellules épithéliales bordantes. Des reprises glandulaires (atypies) et des zones d'épithélium pseudo-normal avec une atteinte variable de la structure des cryptes (hyperplasie) peuvent être observées. La **figure résultat complémentaire 10** présente des images représentatives des lésions et de l'infiltration de cellules CD68 positives au point J7.

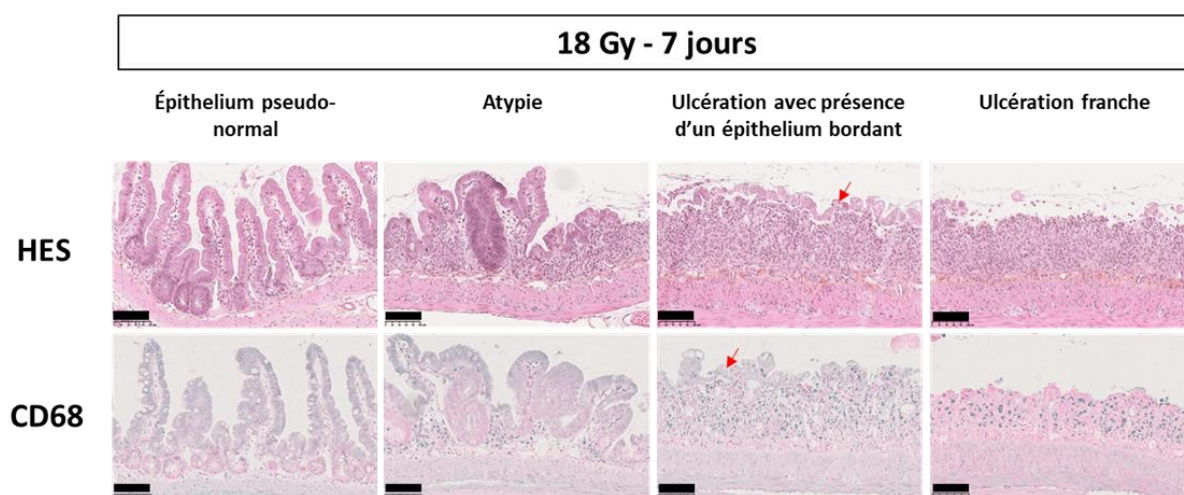


Figure résultat complémentaire 10 : Illustration des lésions et de l'infiltration de macrophages de l'intestin grêle chez la souris à 7 jours post-irradiation à 18 Gy

Les images HES illustrent les différents types de lésions observées 7 jours post-irradiation. Par ordre de sévérité croissante, on retrouve quatre types de zones : des **zones pseudo-normales**, avec la présence de villosités et une désorganisation des cryptes variable, des **zones d'atypies**, où la présence d'une organisation crypto-villositaire est perdue et signe une régénération glandulaire, et des **zones ulcérées**, avec la présence d'une fine couverture épithéliale (flèche rouge) ou non. Ces zones sont caractérisées par une absence totale des villosités et des cryptes, un épaissement de la sous-muqueuse et une infiltration massive de cellules inflammatoires. Le marquage CD68 (bleu) est quasi-inexistant dans les zones pseudo-normales. En revanche il est présent de façon importante dans toutes les zones lésées, suggérant une infiltration de macrophages. Grossissement x20, barre d'échelle, 100 μ m. Les marquages ont été révélés grâce à un anticorps couplé à HRP. Les tissus ont été contre-colorés au *Nuclear fast red*.

Le traitement par les lectines des animaux non irradiés n'a pas révélé de différences d'architecture tissulaire et de marquage CD68. Nous avons comparé le niveau des lésions et le marquage CD68 entre les animaux irradiés traités au PBS, et ceux traités par la Con A ou la CV-N. Nous n'avons pas observé de différences significatives sur aucun des paramètres entre les groupes d'animaux (6 à 9 animaux par groupe).

Discussion & Perspectives

Ce travail de thèse explore le rôle de différents acteurs endothéliaux impliqués dans le recrutement des monocytes *in vitro* par l'endothélium irradié. Nous avons utilisé des techniques d'imagerie en temps réel afin de modéliser deux étapes clés du recrutement immunitaire : l'adhésion et la migration transendothéliale. L'étude la plus complète a porté sur le rôle de la mannosidase MAN1C1 et des N-glycosylations hautement mannosylées sur les interactions entre les monocytes et les cellules endothéliales. Nous avons également obtenu des résultats préliminaires intéressants concernant l'axe CX3CR1/ CX3CL1.

I. Choix des modèles

I.1 Modèles cellulaires

Ce projet a utilisé deux types cellulaires différents que sont les cellules endothéliales et les monocytes. Pour toutes les expérimentations, nous avons fait le choix d'utiliser les *Human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) comme modèle de cellules endothéliales et les cellules THP-1 comme monocytes.

Les **HUVECs** sont des cellules endothéliales primaires humaines issues de veines de cordon ombilical largement utilisées en recherche. Ces cellules ont l'avantage d'être issues de tissus jeunes car associées à l'embryon, et qui n'ont pas subi un nombre important de divisions avant d'être disponibles pour la culture cellulaire, contrairement à des cellules issues d'individus adultes. Nous avons utilisé des lots de cellules commerciales pour la reproductibilité entre les expériences. Notre approche cherchant à établir une preuve de concept, nous avons fait le choix de ne pas utiliser de cellules microvasculaires, plus spécifiques d'un tissu, pour mener nos expériences. De plus, une étude récente concernant la sénescence radio-induite réalisée dans le laboratoire et menée sur cinq types de cellules endothéliales différentes (HUVECs, cellules artérielles de poumon, cellules microvasculaires de poumon, de derme, cardiaques et intestinales) a montré que, en réponse à l'irradiation, les HUVECs récapitulaient la réponse transcriptionnelle, basée sur des gènes impliqués dans la sénescence, de tous les types cellulaires endothéliaux utilisés (Benadjaoud et al. 2021). Ces résultats suggèrent que les HUVECs constituent un modèle cellulaire approprié à l'étude de la réponse de l'endothélium à l'irradiation. Les HUVECs expriment tous les marqueurs endothéliaux nécessaires au mécanisme de recrutement immunitaire, comme les sélectines et les protéines CAM qui se lient

aux intégrines. Enfin, on pourrait se demander s'il est judicieux d'utiliser un modèle cellulaire issu de veines et non d'artères, mais il n'existe pas d'argument en faveur de l'un ou de l'autre.

Les **THP-1** sont des cellules immortelles provenant de leucémie myéloïde aiguë. Elles possèdent les marqueurs spécifiques des monocytes classiques ($CD45^+ CD16^- CD14^+ CCR2^{hi} CX3CR1^{low}$). Toujours dans l'optique d'une preuve de concept, il est intéressant d'utiliser une lignée cellulaire homogène d'un point de vue génétique et phénotypique. D'autre part, il est difficile de maintenir des monocytes primaires en culture sans induire une différenciation vers un état de macrophage M0, qui induit leur adhérence. Il serait cependant intéressant de réaliser les expériences d'adhésion en flux sur les cellules endothéliales avec du sang humain, des *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) humains ou des monocytes primaires, sans mise en culture, afin de se rapprocher au mieux des conditions physiologiques. En revanche, les tests de migration transendothéliale nécessitent que les monocytes soient fluorescents, cependant le marquage par des molécules fluorescentes entraîne un marquage progressif des cellules endothéliales pendant le test par relargage de la molécule. Il a donc fallu construire une lignée exprimant une protéine fluorescente (mKate2-N) de façon stable, ce qui n'était pas possible avec des monocytes primaires, mais réalisable avec la lignée THP-1.

I.2 Modèles animaux

Le modèle d'irradiation de l'abdomen à 18 Gy a dans un premier temps été choisi en raison de la possibilité de réaliser des expériences de microscopie intravitale sur les veines du mésentère. D'autre part, le choix de l'irradiation au niveau de la sphère abdominale était cohérent avec l'utilisation d'un modèle d'entérite radique induite par l'irradiation à 19 Gy en anse intestinale extériorisée chez la souris, un modèle qui permet notamment le développement de lésions fibrotiques en 6 semaines après irradiation. C'est grâce à ce modèle que le rôle de l'endothélium dans les complications radio-induites a été démontré au laboratoire (Rannou et al. 2015; Toullec et al. 2018). Bien que ce modèle ne soit pas totalement cliniquement pertinent lorsqu'on s'intéresse aux complications de la radiothérapie, il permet d'établir des preuves de concept.

I.3 Les modalités d'irradiations : dose, temps et cible

Le rôle du compartiment endothélial dans le développement des complications *in vivo* a été montré dans des modèles animaux irradiés en dose unique de manière localisée à 19 Gy

(Rannou et al. 2015; Toullec et al. 2018). Comme nous avons envisagé d'utiliser ce modèle dans le projet initial de la thèse, il était cohérent de choisir la dose de 20 Gy pour les expérimentations *in vitro*. Le choix d'une forte dose se justifie dans l'optique d'induire une réponse fonctionnelle des HUVECs pour leur capacité d'adhésion des monocytes en condition de flux. Pour les tests de migration transendothéliale, la dose de 20 Gy permet d'obtenir le meilleur effet différentiel. D'autre part, le développement des techniques d'irradiations telles que la SBRT permettent la délivrance de fortes doses en dose unique ou en un petit nombre de fractions de 10-20 Gy voir plus de 30 Gy. Ces avancées impliquent que la tumeur, mais aussi un volume de tissu sain dont l'endothélium, soit irradié à des fortes doses. La radiothérapie FLASH pourrait également induire l'irradiation de volume de tissus sains à une dizaine de Gy. Ces modalités justifient donc l'utilisation de fortes doses comme celle que nous avons utilisée.

Nous avons choisi d'irradier uniquement la composante endothéliale du système. Or, la radiothérapie entraîne l'irradiation des cellules circulantes dans le champ de l'irradiation, dont les monocytes circulants, qui font partie des cellules les plus radio-résistantes (Falcke et al. 2018). Néanmoins, il n'existe à ce jour, à notre connaissance, aucune étude s'intéressant à la réponse des monocytes circulants après irradiation locale en dose unique ou fractionnée. Il serait intéressant d'estimer la dose reçue par les monocytes pendant la radiothérapie et d'effectuer ces tests en irradiant les deux types cellulaires.

Enfin, toutes les expériences effectuées *in vitro* évaluent une réponse précoce (deux jours post-irradiation) des cellules endothéliales vis-à-vis de l'adhésion ou de la transmigration des monocytes. La réponse inflammatoire post-irradiation est un processus qui se met en place très précocement après irradiation. Certaines études montrent que la persistance de l'inflammation dans le temps fait partie du développement des pathologies tardives de la radiothérapie (Rubin et al. 1995). Il est raisonnable de penser qu'au moins une partie des signaux impliqués dans le recrutement précoce radio-induit sont les mêmes que ceux impliqués dans le recrutement tardif et chronique. De plus, d'un point de vue pratique, il est nécessaire de réaliser les expériences *in vitro* à un temps précoce afin de ne pas induire de différences expérimentales autres que l'irradiation ou le traitement d'intérêt par siRNA et vecteurs lentiviraux. En effet, les cellules non irradiées continuent de proliférer, en comparaison aux cellules irradiées, ce qui peut changer le taux de confluence des cellules, un point critique pour les expériences d'adhésion et de transmigration. S'il existe une forte variation du nombre de cellules entre les témoins non irradiés et les autres conditions d'intérêt, cela peut biaiser les différences, ou non-différences, observées. Les travaux précédents du laboratoire avaient

montré que l'adhésion des monocytes et l'augmentation des glycanes hautement mannosylés persistait jusqu'à 21 jours après irradiation en dose unique. Cependant il avait pour cela fallu adapter l'ensemencement des cellules contrôles non irradiées, car leur hyperconfluence à ces temps d'étude entraînait des résultats artéfactuels (Jaillet et al. 2017). Dans cette thèse, nous montrons que la diminution de l'expression de MAN1C1 endogène est maintenue jusqu'à 21 jours après irradiation, ce qui conforte nos résultats obtenus aux temps précoces.

Pour les expérimentations *in vivo*, nous avons choisi des irradiations en dose unique au niveau de la sphère digestive. L'objectif de ces expérimentations était d'entraîner une inflammation radio-induite et un recrutement précoce de macrophages afin d'établir une preuve de concept du rôle des N-glycosylations hautement mannosylées dans les interactions entre l'endothélium et les leucocytes.

II. Discussion et perspectives

L'ensemble de nos résultats suggèrent un rôle de l' α -mannosidase MAN1C1 dans la régulation du recrutement des monocytes *in vitro* via les glycosylations hautement mannosylées. Cependant, le rôle des glycosylations hautement mannosylées dans le recrutement des macrophages *in vivo* n'a pas pu être démontré avec le modèle de toxicité radio-induite intestinale. Enfin, les études préliminaires concernant le rôle des récepteurs ligands CCR2/CCL2 et CX3CR1/CX3CL1 ont souligné un rôle de potentiel de CX3CL1.

Quelles sont les limites des expériences d'adhésion et de transmigration *in vitro* ?

Les cellules endothéliales n'ont pas été cultivées sous flux de milieu, ce qui peut changer l'expression de certains acteurs importants pour l'adhésion et la transmigration. Il a notamment été montré qu'en l'absence de *shear stress*, les interactions avec les sélectines diminuent alors qu'elles gèrent l'étape de *rolling* (Lawrence et al. 1997). Dans nos conditions, l'expérience de transmigration se déroule en condition statique. Le *rolling* n'est pas une nécessité pour observer la transmigration. En revanche, il est possible que l'activation cellulaire médiée par les sélectines n'ait pas lieu, ce qui pourrait donner des résultats différents (Hauselmann et al. 2016).

La culture en flux impacte également la morphologie des cellules endothéliales, la répartition des protéines de jonctions et les fibres du cytosquelette d'actine. Il est possible que notre modèle s'éloigne du mécanisme physiologique de transmigration. Le fait que nous n'utilisons pas une matrice plus complexe que de la fibronectine pourrait aussi modifier les

dernières étapes de la transmigration. Enfin, il serait intéressant de réaliser des marquages des protéines de jonctions en complément des tests de perméabilité pour apporter des éléments supplémentaires sur l'intégrité de la barrière endothéliale.

Si l'on souhaitait modéliser au mieux la séquence d'évènements du processus de recrutement immunitaire (*rolling*, adhésion, transmigration, et déplacement dans la MEC), il serait nécessaire d'utiliser un système de culture 3D afin de recréer une structure de vaisseaux. Des systèmes de microfluidiques permettent la culture de cellules endothéliales primaires sous un format de tube avec l'application d'un *shear stress* en circuit fermé. Ces systèmes ont pu être couplés à de l'imagerie afin d'observer des évènements de transmigration. Pour l'appliquer à notre problématique, il faudrait cependant trouver une configuration d'irradiation compatible.

La réponse de l'endothélium à l'irradiation dépend-elle du lit vasculaire ?

L'équipe de R. Patel s'est intéressée à la réponse de différents lits vasculaires, leur activation et leurs capacités adhésives (Scott and Patel 2013). Ils ont montré qu'il existait des différences significatives entre les différents lits. Pour pouvoir généraliser nos résultats, il serait intéressant de réaliser les expérimentations avec des cellules endothéliales de différentes origines.

Par quelles voies moléculaires MAN1C1 est-elle régulée après irradiation ?

Les travaux réalisés par R. Patel ont montré que l'inhibition de MAN1C1 et l'expression des glycosylations hautement mannosylées étaient inductibles par le facteur pro-inflammatoire TNF α (Chacko et al. 2011). Il y a un parallèle entre nos résultats obtenus en condition d'inhibition de MAN1C1 et le traitement des HUVECs avec le TNF α . Dans ces deux conditions, l'adhésion des THP-1 est augmentée et leur transmigration diminuée. Ce parallèle sous-tend que la signalisation du TNF α pourrait, au moins en partie, réguler MAN1C1 en condition d'irradiation. La sécrétion de TNF α est d'ailleurs un des premiers marqueurs de l'inflammation secrétés en réponse à l'irradiation (D. E. Hallahan et al. 1989; D. E. Hallahan et al. 1994).

L'irradiation diminue l'expression de MAN1C1 et augmente les N-glycanes hautement mannosylés, augmente l'adhésion, mais aussi la transmigration des monocytes, contrairement à nos observations en cas d'inhibition de MAN1C1 et en présence de TNF α . Il est possible que l'inhibition de MAN1C1 par le siRNA ou encore le traitement exogène au TNF α soit des signaux moléculaires induisant une adhésion trop forte qui retiendrait les monocytes à la surface

des HUVECs dans nos conditions expérimentales. Cette adhésion pourrait empêcher les THP-1 de réaliser les interactions suivantes nécessaires à la transmigration. Cela est cohérent avec le fait que la surexpression de MAN1C1 dans les HUVECs facilite la transmigration.

D'autre part, le réseau moléculaire réalisé à l'aide du logiciel Pathway Studio a mis en évidence des régulations potentielles par les voies de l'IL-1 β ou du TGF β (Pabst et al. 2010), qui sont induites par l'irradiation, elles-mêmes modulées par le NF- κ B. Il serait intéressant d'étudier l'influence de la voie NF- κ B sur l'expression de MAN1C1 et des glycosylations hautement mannosylées. Plusieurs papiers ont référencé l'utilisation d'isoflavones issues de soja comme des régulateurs de l'activation de la voie NF- κ B et de la réponse immunitaire innée (Abernathy et al. 2015; Abernathy et al. 2017). Dans l'idée d'expliquer la régulation de MAN1C1 par l'irradiation, nous pourrions utiliser ce type de molécules pour savoir si leur effet influence aussi le statut de MAN1C1 et les glycanes hautement mannosylés. Des inhibiteurs directs de cette voie pourraient également être utilisés (Pordanjani and Hosseinimehr 2016).

MAN1C1 est-elle la seule responsable de l'augmentation des glycosylations hautement mannosylées endothéliales après irradiation ?

MAN1C1 n'est pas la seule α 1,2 mannosidase. Il existe deux autres mannosidases golgiennes MAN1A2 et MAN1A2 ainsi qu'une mannosidase endoplasmique MAN1B1 (Z. C. Jin et al. 2018; K.W Moremen and Nairn 2014). Notre étude s'est focalisée sur MAN1C1 car seule cette mannosidase, parmi les quatre, présentait une diminution de l'expression de son gène après irradiation des cellules endothéliales (Jaillet et al. 2017). Nos résultats en conditions d'inhibition prouvent que la seule extinction de MAN1C1 suffit à induire une augmentation de l'adhésion des monocytes associés à une augmentation des N-glycanes hautement mannosylés. Les résultats en condition de surexpression de MAN1C1 révèlent des réponses contraires, en cohérence, bien que nous n'ayons pas pu mettre en évidence de modification des glycosylations hautement mannosylées avec la surexpression. Cela suggère que MAN1C1 serait la principale mannosidase régulant les glycosylations hautement mannosylées dans ce processus *in vitro*.

Concernant le rôle de la mannosidase MAN1C1 *in vivo*, il n'existe pas de données, à notre connaissance, provenant de cellules endothéliales irradiées *in vivo*. Jaillet et al ont néanmoins mesuré l'expression en ARNm de différents gènes liés au processus de glycosylation sur des échantillons d'intestins irradiés. Ces résultats ont montré la diminution de l'expression de MAN1A1 et MAN1B1, mais pas de MAN1C1. Cependant, ces résultats représentent la réponse transcriptionnelle de l'intestin entier, et non de l'endothélium seul. Pour

attester de l'impact de l'irradiation sur les cellules endothéliales *in vivo*, il serait intéressant d'isoler ces cellules d'un tissu irradié et de mesurer l'expression des différents gènes des mannosidases. Un projet s'intéresse en ce moment à la réponse endothéliale après irradiation et met en place une digestion de tissu suivi d'une sélection des cellules endothéliales par système de tri à l'aide de billes magnétiques. L'objectif de ce projet, à plus long terme, est de réaliser des études à l'échelle de la cellule unique avec des techniques de cytométrie en flux et de séquençage de l'ARN (scRNAseq). Des mesures d'expression génique des différentes mannosidases et des marquages des glycosylations hautement mannosylées pourraient également être réalisées sur ces cellules endothéliales isolées.

Sur quelle(s) protéine(s) les glycosylations hautement mannosylées sont-elles portées ?

Les glycosylations régulent la fonction des protéines. Le recrutement immunitaire fait intervenir une multitude de protéines décorées par des glycosylations (Marth and Grewal 2008). Dans une revue, Scott et al. ont avancé que les protéines ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, PECAM-1, JAM 3 portaient potentiellement plusieurs sites de N-glycosylations (Scott et al. 2013a). Il existe des études sur le rôle de la forme hautement mannosylée d'ICAM-1 dans un contexte inflammatoire (induit par le TNF α *in vitro*) ou d'athérosclérose *in vivo* (Regal-McDonald et al. 2020; Scott et al. 2013b). ICAM-1 est une protéine de la famille des immunoglobulines intervenant principalement dans l'étape d'adhésion, augmentée lors de l'activation endothéliale radio-induite (Gaugler et al. 1997; D. E. Hallahan and Virudachalam 1997). Il serait intéressant d'évaluer si l'irradiation induit l'expression de la forme hautement mannosylée de ICAM-1. Pour investiguer cette piste, nous pourrions réaliser des expériences de *Proximity Ligation Assay*. Le principe de cette technique est de mettre en évidence une proximité entre deux protéines ou entre une protéine et une modification post-traductionnelle comme une glycosylation. Pour cela, une protéine d'intérêt est ciblée par un anticorps et la glycosylation par une lectine. L'anticorps et la lectine sont tous deux couplés à des sondes d'ADN complémentaires. Si les épitopes reconnus par la lectine et l'anticorps sont suffisamment proches, alors les oligonucléotides peuvent s'hybrider et révéler un signal fluorescent après une étape d'amplification. Cette technique peut se faire en microscopie à immunofluorescence (Regal-McDonald et al. 2020) et en cytométrie en flux (Leuchowius et al. 2011). Cette technique suppose un *a priori* sur les protéines portant les glycosylations hautement mannosylées. Nous pourrions ainsi tester des protéines candidates parmi les acteurs connus du recrutement immunitaire impliqués dans l'adhésion ou la transmigration

endothéliale. Une étude sans *a priori* demanderait de réaliser des techniques de glycoprotéomiques en utilisant la spectrométrie de masse.

Enfin on pourrait également se demander par quelle molécule ou récepteur, les glycosylations hautement mannosylées sont reconnues par les monocytes ? Mac-1 pourrait être une piste intéressante, selon l'équipe de R. Patel (Regal-McDonald et al. 2019).

Les N-glycosylations hautement mannosylées endothéliales régulent-elles le recrutement des monocytes *in vivo* ?

Nous avons essayé de répondre à cette question en utilisant d'abord un modèle de microscopie intravitale sur les veines du mésentère. Cependant nous n'avons pas réussi à observer de différences dans le recrutement des leucocytes radio-induits, contrairement à de précédentes publications (Vereycken-Holler et al. 2002). Dans ce protocole expérimental, l'ensemble des leucocytes était marqué par de la rhodamine. Pour visualiser de manière plus fine le comportement des monocytes, l'utilisation de souris transgéniques comportant des rapporteurs fluorescents pourrait être intéressante. Nous pourrions utiliser des souris portant un rapporteur fluorescent sur CSFR1 ou un marqueur plus spécifique de certains sous-types de monocytes comme CX3CR1. Le désavantage de ces animaux transgéniques est que souvent le rapporteur fluorescent est inséré dans la séquence codante d'une des deux copies du gène et peut potentiellement changer l'expression de molécules directement impliquées dans le recrutement, comme dans le cas de CX3CR1.

Concernant l'approche histologique, nous avons utilisé un traitement à base de lectines afin de voir si le ciblage des glycosylations hautement mannosylées impactait le recrutement des macrophages et/ou les lésions radio-induites. Nous avons utilisé deux lectines qui se lient aux glycosylations hautement mannosylées, la Con A et la CV-N. La CV-N a l'avantage d'avoir une plus grande spécificité envers les glycosylations hautement mannosylées et a montré des résultats intéressants quant au ciblage d'un mécanisme dépendant de ces glycosylations *in vivo* (Lotfi et al. 2018). Nous avons étudié différents paramètres à savoir les lésions, par coloration HES et par un marquage ki67, et la quantité de macrophages présents dans les tissus par un marquage des macrophages exprimant CD68. Ces expériences n'ont pas montré de différences significatives sur aucun des paramètres entre les groupes contrôles non traités et les groupes traités par les lectines. Ce résultat pourrait vouloir dire que les glycosylations hautement mannosylées *in vivo* ne sont pas impliquées dans le recrutement des macrophages, mais nous ne pouvons pas dire si les glycanes étaient efficacement ciblés dans cette étude.

Plusieurs améliorations pourraient être faites pour infirmer ou confirmer cette conclusion. D'une part, il faudrait évaluer la présence des lectines dans les tissus et plus particulièrement au niveau de l'endothélium. La CV-N que nous avons utilisée est notamment étiquetée avec un HIS-tag et serait repérable dans les tissus des animaux injectés. D'autre part, dans notre étude, nous ne savons pas si la dose de lectine utilisée est appropriée. Elle avait été choisie en se basant sur les études existantes pour lesquelles il n'existait pas de toxicité. La quantité de lectine pourrait être augmentée.

Enfin, nous pourrions envisager une autre stratégie expérimentale. Le modèle animal d'irradiation abdominale à 18 Gy se rapproche d'un modèle de syndrome gastro-intestinal très sévère (Bensemmane et al. 2021). Un modèle de complication tardive de la radiothérapie serait peut-être plus indiqué pour évaluer l'impact des lectines, qui peut se révéler subtil. Il existe un modèle d'entérite radique induit par l'irradiation d'une anse intestinale extériorisée qui permet d'obtenir des lésions fibrotiques en 6 semaines (Rannou et al. 2015; Toullec et al. 2018). Le modèle de rectocolite radique, également en place dans le laboratoire (Blirando et al. 2011), pourrait s'avérer également intéressant pour adresser cette question.

Enfin, les analyses que nous avons effectuées ne sont peut-être pas suffisamment poussées. Nous nous sommes intéressés aux macrophages via le marqueur CD68. Il aurait été intéressant d'évaluer quelques marqueurs spécifiques des macrophages pro- ou anti-inflammatoires, comme CD80 et iNOS pour les pro- inflammatoires et CD206 et Arg1 pour les anti-inflammatoires. Cependant, toutes les techniques sur coupes histologiques restent semi-quantitatives. Différentes techniques de digestion tissulaires suivies de marquages en cytométrie en flux seraient sans doute pertinentes pour aller plus loin dans cette étude.

La mannosidase MAN1C1 est-elle impliquée dans le recrutement des macrophages *in vivo* ?

Pour répondre à cette question, il est nécessaire d'utiliser des animaux génétiquement modifiés. La stratégie n'est toutefois pas simple, car la baisse de MAN1C1 est supposée participer au recrutement. Il n'existe pas de modèle de souris invalidées pour MAN1C1. Des cellules embryonnaires de souris sont disponibles, mais il est probable que le phénotype de ces animaux soit létal (K.W Moremen and Nairn 2014). Il serait intéressant de générer des souris surexprimant MAN1C1 de manière conditionnelle dans l'endothélium afin d'aller à l'encontre des effets de l'irradiation sur les glycosylations hautement mannosylées. L'utilisation de lentivirus *in vivo* contenant la séquence codante de MAN1C1 couplée à un promoteur actif

spécifiquement l'endothélium pourrait constituer une stratégie pour répondre à cette question (De Palma et al. 2003).

Quelle est l'origine des macrophages dans les tissus irradiés ?

Les macrophages peuvent venir de la circulation sanguine ou proliférer *in situ* depuis la population résidente du tissu. De nombreuses études soulignent le rôle des macrophages dans les complications radio-induites tardives (Bickelhaupt et al. 2017; Groves et al. 2018; Meziani et al. 2018b; Meziani et al. 2018a). La question de l'origine de ces macrophages se pose. Le contexte de notre étude suppose que les macrophages impliqués dans le développement des lésions radiques proviennent, au moins en partie, du pool de monocytes circulants. L'utilisation d'animaux dont le recrutement des macrophages est abrogé par l'inactivation du récepteur CCR2 permet d'avoir une première idée. C'est notamment par ce biais que Groves et al. suggèrent que les monocytes circulants sont impliqués dans le développement de la fibrose radio-induite (Groves et al. 2018). Cependant, le phénotype principal de ces souris est une rétention des monocytes CCR2⁺ dans la moelle osseuse. Cette rétention risque de changer l'équilibre qu'il existe entre toutes les sous-populations de monocytes et ne pas être représentatif. L'utilisation de liposome contenant du clodronate permet également d'apporter des éléments de réponse. Le clodronate induit la déplétion des cellules myéloïdes dans le compartiment dans lequel il est injecté. Avec cette stratégie, Meziani et al. ont montré que la déplétion en macrophages alvéolaires du poumon n'impactait pas le développement d'une fibrose radio-induite. Cette observation a apporté une confirmation supplémentaire du rôle des macrophages interstitiels provenant de la circulation dans le développement de la fibrose pulmonaire dans leur modèle (Meziani et al. 2018b). Dans une autre étude menée par Loinard et al. dans un modèle de rectocolite radique, il a été montré que la déplétion des cellules myéloïdes après injection intra-veineuse de clodronate diminuait le dépôt de collagène au niveau des cryptes intestinales lorsque la déplétion était précoce et non tardive (Loinard et al. 2017). Ces études suggèrent que l'augmentation des macrophages, associée aux lésions dans les tissus après irradiation, provient de la circulation. Il n'existe pas à ma connaissance d'études attestant de la preuve directe et formelle du recrutement des macrophages après irradiation au niveau des lésions radio-induites. Cette réponse peut être dépendante de l'organe et de la modalité d'irradiation utilisée. La question de l'origine des macrophages pourraient aussi être adressée par des techniques de transplantation de cellules de moelle osseuse fluorescentes ou encore par des techniques de parabiose.

Les glycosylations hautement mannosylées recrutent-elles des sous-populations de monocytes particulières ?

Les monocytes constituent une population cellulaire hétérogène. Trois classes de monocytes ont été décrites chez l'homme (classiques, intermédiaires et non-classiques) et deux chez la souris (classiques et non classiques). Le rôle des monocytes non classiques a été mis en évidence dans le contexte de l'athérosclérose. R. Patel et son équipe ont notamment montré que la protéine ICAM-1 hautement mannosylée favorisait le recrutement de monocytes non classiques CD14⁺ CD16⁺. Étant donné les résultats que nous obtenons dans notre étude, il serait intéressant de savoir si l'endothélium irradié recrute sélectivement un type particulier de monocyte. Des expériences avec des monocytes primaires CD14⁺ CD16⁻ ou CD14⁺ CD16⁺ permettraient d'apporter des éléments de réponse à cette question.

Malgré le fait que nous utilisons un modèle de monocytes qui se rapproche des monocytes classiques (THP-1), nous avons voulu évaluer le rôle de la signalisation CCL2 et CX3CL1 dans nos tests fonctionnels *in vitro*. Les tests de transmigration effectués en conditions d'inhibition de l'expression *ccl2* endothéliale par des siRNA n'ont pas donné de résultats concluants. Cependant, ce résultat pourrait être biaisé par l'utilisation d'une forte concentration du chimioattractant MCP-1 (CCL2) pour stimuler la transmigration. Il serait intéressant de réaliser ces mêmes expériences avec un autre chimioattractant, comme le SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*), qui stimule également la migration des monocytes.

Concernant le rôle de CX3CL1, l'utilisation de siRNA contre CX3CL1 induit une diminution significative de la transmigration des THP-1. Cela suggère que la forme sécrétée ou membranaire de CX3CL1 est impliquée dans la migration transendothéliale des monocytes après irradiation. Cependant, nous n'avons pas observé d'inhibition de l'ARNm *cx3cl1* par le siRNA sur les cellules cultivées en parallèle de nos expériences. L'effet du siRNA sur l'inhibition de l'ARNm avait cependant été vérifié. Des tests d'adhésions réalisés avec des THP-1 préalablement incubés avec de la fractalkine ont montré une légère inhibition de l'adhésion des monocytes suggérant que l'axe CX3CR1/CX3CL1 est impliqué dans l'adhésion médiée par l'endothélium irradié. Cela est en accord avec la fonction pro-adhésive de CX3CL1 (Goda et al. 2000). Enfin, nous avons également réalisé des tests de transmigrations après incubation des THP-1 mKate2 avec la fractalkine, mais nous n'avons pas vu d'effet sur la transmigration. Ces résultats pourraient être dus à l'engagement de l'axe CX3CL1/CX3CR1 dans l'étape d'adhésion plutôt que de transmigration, ou bien au fait que CCL2 induit un chimiotactisme bien plus fort que CX3CL1 (Umehara et al. 2001).

Ces résultats renforcent l'intérêt d'effectuer des expériences avec des monocytes primaires, notamment des monocytes non classiques CD14⁺ CD16⁺ CX3CR1^{hi}. Ces observations ne sont cependant pas en accord avec les résultats obtenus en cytométrie en flux pour comparer les marqueurs monocytaires (CD45, CD14, CD16, CCR2 et CX3CR1) sur les THP-1 WT et mKate avec lesquels nous faisons nos expériences n'ayant en effet pas observé de marquage CX3CR1 sur nos cellules. Il est possible que cet anticorps ne fonctionne pas ou n'ait pas été utilisé à la bonne dilution, car il a été publié que les THP-1 expriment CX3CR1.

Quels devenir pour les monocytes recrutés ?

Plusieurs éléments mènent à penser que les macrophages sont au moins en partie recrutés dans les lésions radio-induites. On ne sait cependant pas comment les monocytes recrutés impactent cette population de macrophages en termes de phénotype. Vers quel(s) phénotype(s) s'orientent ces cellules après le passage de la barrière endothéliale, pro- ou anti-inflammatoire ? D'autre part, est-ce que l'endothélium irradié émet des signaux qui orientent ces cellules ? On sait par exemple que l'endothélium irradié peut présenter des cellules sénescentes qui sécrètent des facteurs du SASP. Dans notre système, il serait intéressant de connaître l'influence des sécrétions de l'endothélium irradié sur les monocytes avec milieux conditionnés de cellules endothéliales irradiées. Enfin, même si le système de transmigration que nous avons développé ne reflète pas la complexité d'un environnement tissulaire, il serait intéressant de comparer le phénotype des cellules avant et après passage de la barrière endothéliale irradiée (morphologie, capacité d'adhérence signent leur différenciation). Une étude d'expression génique par scRNAseq ou RT-qPCR serait également informative.

Quel serait l'impact d'une stratégie visant à limiter le recrutement des monocytes dans un environnement tumoral ?

Les tumeurs peuvent être impactées dans une stratégie qui vise à limiter le recrutement des monocytes/macrophages par des agents thérapeutiques injectés par voie systémique. Pour répondre précisément à cette question, il faudrait utiliser des modèles animaux cliniquement pertinents comme des modèles de tumeurs orthotopiques chez la souris. De tels modèles présentent des limites car il est complexe d'allier une croissance tumorale qui ne tue pas les animaux et qui laisse des complications tardives se développer. Avec de tels modèles, on pourrait étudier précisément la meilleure fenêtre thérapeutique pour agir sur le développement des effets délétères dus à l'irradiation des tissus sains. De plus, de nombreuses études ont

montré que l'environnement tumoral immunitaire peut favoriser la persistance de la tumeur. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) et les *Myeloid derived cells* (MDCs) proviennent en partie de la circulation sanguine et sont connus pour favoriser un environnement anti-inflammatoire et pro-tumoral. Une thérapie visant le recrutement des monocytes via les glycosylations hautement mannosylées pourrait également avoir un effet bénéfique sur le contrôle de la tumeur en limitant l'arrivée de cellules immunosuppressives. Enfin, MAN1C1 est un suppresseur de tumeur potentiel qui limiterait la dissémination métastatique (H. Li et al. 2018). Cibler les glycosylations hautement mannosylées pourrait également entraîner des conséquences sur cet aspect du développement cancéreux.

Conclusion générale

Ce travail de thèse a principalement permis de mettre en lumière un acteur potentiel du recrutement des monocytes par l'endothélium radio-induit *in vitro* : la mannosidase MAN1C1. Nous avons pu établir un lien tangible entre les N-glycosylations hautement mannosylées, l'expression de la mannosidase MAN1C1 ainsi que les mécanismes d'adhésion et de transmigration des monocytes radio-induits. Ces observations mettent en évidence une conséquence fonctionnelle de la modulation des glycosylations qui pourrait impacter d'autres mécanismes impliqués dans l'inflammation, le développement tumoral et les toxicités radio-induites. De nombreuses questions restent à investiguer, comme la pertinence de ce mécanisme *in vivo*, son rôle dans le recrutement des macrophages et son impact sur lésions radio-induites.

Bibliographie

- Abderrahmani, R., et al. (2009), 'Effects of pharmacological inhibition and genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 in radiation-induced intestinal injury', *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 74 (3), 942-8.
- Abderrahmani, R., et al. (2012), 'PAI-1-dependent endothelial cell death determines severity of radiation-induced intestinal injury', *PLoS One*, 7 (4), e35740.
- Abernathy, L. M., et al. (2017), 'Innate Immune Pathways Associated with Lung Radioprotection by Soy Isoflavones', *Front Oncol*, 7, 7.
- Abernathy, L. M., et al. (2015), 'Soy Isoflavones Promote Radioprotection of Normal Lung Tissue by Inhibition of Radiation-Induced Activation of Macrophages and Neutrophils', *J Thorac Oncol*, 10 (12), 1703-12.
- Azzam, E. I., Jay-Gerin, J. P., and Pain, D. (2012), 'Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury', *Cancer Lett*, 327 (1-2), 48-60.
- Azzam, E. I., et al. (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.
- Benadjaoud, M. A., et al. (2021), 'Deciphering the Dynamic Molecular Program of Radiation-Induced Endothelial Senescence', *Int J Radiat Oncol Biol Phys*.
- Bensemmane, L., et al. (2021), 'The stromal vascular fraction mitigates radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice', *Stem Cell Res Ther*, 12 (1), 309.
- Bertozzi, C. R. and Rabuka, D. (2009), 'Structural Basis of Glycan Diversity', in nd, et al. (eds.), *Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor (NY)).
- Bessout, R., et al. (2015), 'TH17 predominant T-cell responses in radiation-induced bowel disease are modulated by treatment with adipose-derived mesenchymal stromal cells', *J Pathol*, 237 (4), 435-46.
- Bickelhaupt, S., et al. (2017), 'Effects of CTGF Blockade on Attenuation and Reversal of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis', *J Natl Cancer Inst*, 109 (8).
- Blidirando, K., et al. (2011), 'Mast cells are an essential component of human radiation proctitis and contribute to experimental colorectal damage in mice', *Am J Pathol*, 178 (2), 640-51.
- Bourhis, J., et al. (2019), 'Treatment of a first patient with FLASH-radiotherapy', *Radiother Oncol*, 139, 18-22.
- Boustani, J., et al. (2019), 'The 6th R of Radiobiology: Reactivation of Anti-Tumor Immune Response', *Cancers (Basel)*, 11 (6).

- Brockhausen, I. and Stanley, P. (2015), 'O-GalNAc Glycans', in rd, et al. (eds.), *Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor (NY)), 113-23.
- Candas-Green, D., et al. (2020), 'Dual blockade of CD47 and HER2 eliminates radioresistant breast cancer cells', *Nat Commun*, 11 (1), 4591.
- CentreFranoisBaclesse 'Tumeurs ORL - Carcinome adnoide kystique traité par radiothérapie, faisceaux de traitements (gauche) planimtrie compare et différence entre photons (RCMI) et protons (protonthérapie en modulation d'intensité) montrant l'excès de dose priphriques en photons'.
- Chacko, B. K., et al. (2011), 'Endothelial surface N-glycans mediate monocyte adhesion and are targets for anti-inflammatory effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands', *J Biol Chem*, 286 (44), 38738-47.
- Chaze, T., et al. (2013), 'Alteration of the serum N-glycome of mice locally exposed to high doses of ionizing radiation', *Mol Cell Proteomics*, 12 (2), 283-301.
- Chen, Q., et al. (2007), 'Potential role for heparan sulfate proteoglycans in regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) by modulating assembly of latent TGF-beta-binding protein-1', *J Biol Chem*, 282 (36), 26418-30.
- Chiang, C. S., et al. (2012), 'Irradiation promotes an m2 macrophage phenotype in tumor hypoxia', *Front Oncol*, 2, 89.
- Ciorba, M. A. and Stenson, W. F. (2009), 'Probiotic therapy in radiation-induced intestinal injury and repair', *Ann N Y Acad Sci*, 1165, 190-4.
- Constanzo, J., et al. (2021), 'Radiation-Induced Immunity and Toxicities: The Versatility of the cGAS-STING Pathway', *Front Immunol*, 12, 680503.
- Cross, M. J. and Claesson-Welsh, L. (2001), 'FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition', *Trends Pharmacol Sci*, 22 (4), 201-7.
- De Palma, M., Venneri, M. A., and Naldini, L. (2003), 'In vivo targeting of tumor endothelial cells by systemic delivery of lentiviral vectors', *Hum Gene Ther*, 14 (12), 1193-206.
- De Ruysscher, D., et al. (2019), 'Radiotherapy toxicity', *Nat Rev Dis Primers*, 5 (1), 13.
- Delanian, S., Balla-Mekias, S., and Lefaix, J. L. (1999), 'Striking regression of chronic radiotherapy damage in a clinical trial of combined pentoxifylline and tocopherol', *J Clin Oncol*, 17 (10), 3283-90.
- Demaria, S. and Formenti, S. C. (2020), 'The abscopal effect 67 years later: from a side story to center stage', *Br J Radiol*, 93 (1109), 20200042.
- Dent, P., et al. (2003), 'Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways', *Radiat Res*, 159 (3), 283-300.

- Ding, X., et al. (2020), 'Fecal microbiota transplantation: A promising treatment for radiation enteritis?', *Radiother Oncol*, 143, 12-18.
- Duong, C. N. and Vestweber, D. (2020), 'Mechanisms Ensuring Endothelial Junction Integrity Beyond VE-Cadherin', *Front Physiol*, 11, 519.
- Emre, Y., Jemelin, S., and Imhof, B. A. (2015), 'Imaging Neutrophils and Monocytes in Mesenteric Veins by Intravital Microscopy on Anaesthetized Mice in Real Time', *J Vis Exp*, (105).
- England, R. N., et al. (2013), 'Interleukin-19 decreases leukocyte-endothelial cell interactions by reduction in endothelial cell adhesion molecule mRNA stability', *Am J Physiol Cell Physiol*, 305 (3), C255-65.
- Falcke, S. E., et al. (2018), 'Clinically Relevant Radiation Exposure Differentially Impacts Forms of Cell Death in Human Cells of the Innate and Adaptive Immune System', *Int J Mol Sci*, 19 (11).
- Fan, H., et al. (2014), 'New approach for the treatment of osteoradionecrosis with pentoxifylline and tocopherol', *Biomater Res*, 18, 13.
- Favaudon, V., et al. (2014), 'Ultrahigh dose-rate FLASH irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice', *Sci Transl Med*, 6 (245), 245ra93.
- Folkman, J. (1971), 'Tumor angiogenesis: therapeutic implications', *N Engl J Med*, 285 (21), 1182-6.
- Fuks, Z., et al. (1994), 'Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death in vitro and in vivo', *Cancer Res*, 54 (10), 2582-90.
- Gaugler, M. H., et al. (1997), '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 (2), 201-9.
- Gerhardt, T. and Ley, K. (2015), 'Monocyte trafficking across the vessel wall', *Cardiovasc Res*, 107 (3), 321-30.
- Goda, S., et al. (2000), 'CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms', *J Immunol*, 164 (8), 4313-20.
- Gordon, S. R., et al. (2017), 'PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity', *Nature*, 545 (7655), 495-99.
- Graham, G. J., Handel, T. M., and Proudfoot, A. E. I. (2019), 'Leukocyte Adhesion: Reconceptualizing Chemokine Presentation by Glycosaminoglycans', *Trends Immunol*, 40 (6), 472-81.

- Greven, J., et al. (2018), 'Update on the role of endothelial cells in trauma', *Eur J Trauma Emerg Surg*, 44 (5), 667-77.
- Groves, A. M., et al. (2018), 'Role of Infiltrating Monocytes in the Development of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis', *Radiat Res*, 189 (3), 300-11.
- Guipaud, O., et al. (2018), 'The importance of the vascular endothelial barrier in the immune-inflammatory response induced by radiotherapy', *Br J Radiol*, 91 (1089), 20170762.
- Guipaud, O., et al. (2007), 'Time-course analysis of mouse serum proteome changes following exposure of the skin to ionizing radiation', *Proteomics*, 7 (21), 3992-4002.
- Ha, Y. M., et al. (2010), 'Molecular activation of NF-kappaB, pro-inflammatory mediators, and signal pathways in gamma-irradiated mice', *Biotechnol Lett*, 32 (3), 373-8.
- Haimovitz-Friedman, A., et al. (1994), 'Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis', *J Exp Med*, 180 (2), 525-35.
- Hallahan, D., Kuchibhotla, J., and Wyble, C. (1996), 'Cell adhesion molecules mediate radiation-induced leukocyte adhesion to the vascular endothelium', *Cancer Res*, 56 (22), 5150-5.
- Hallahan, D. E. and Virudachalam, S. (1997), 'Intercellular adhesion molecule 1 knockout abrogates radiation induced pulmonary inflammation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (12), 6432-7.
- Hallahan, D. E., Kuchibhotla, J., and Wyble, C. (1997), 'Sialyl Lewis X mimetics attenuate E-selectin-mediated adhesion of leukocytes to irradiated human endothelial cells', *Radiat Res*, 147 (1), 41-7.
- Hallahan, D. E., et al. (1998), 'X-ray-induced P-selectin localization to the lumen of tumor blood vessels', *Cancer Res*, 58 (22), 5216-20.
- Hallahan, D. E., et al. (1989), 'Increased tumor necrosis factor alpha mRNA after cellular exposure to ionizing radiation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (24), 10104-7.
- Hallahan, D. E., et al. (1994), 'Membrane-derived second messenger regulates x-ray-mediated tumor necrosis factor alpha gene induction', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (11), 4897-901.
- Hauselmann, I., et al. (2016), 'Monocyte Induction of E-Selectin-Mediated Endothelial Activation Releases VE-Cadherin Junctions to Promote Tumor Cell Extravasation in the Metastasis Cascade', *Cancer Res*, 76 (18), 5302-12.
- Herzog, B. H., Fu, J., and Xia, L. (2014), 'Mucin-type O-glycosylation is critical for vascular integrity', *Glycobiology*, 24 (12), 1237-41.
- Hneino, M., et al. (2012), 'The TG-interacting factor TGIF1 regulates stress-induced proinflammatory phenotype of endothelial cells', *J Biol Chem*, 287 (46), 38913-21.

- Holler, V., et al. (2019), 'Early and Late Protective Effect of Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation on Radiation-Induced Vascular Dysfunction and Skin Lesions', *Cell Transplant*, 28 (1), 116-28.
- Hoogewerf, A. J., et al. (1997), 'Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines', *Biochemistry*, 36 (44), 13570-8.
- ICRU (2016), 'Report 83 : Prescribing, Recording, and Reporting Intensity-Modulated Photon-Beam Therapy (IMRT)'.
- Imai, T., et al. (1997), 'Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion', *Cell*, 91 (4), 521-30.
- Inca (2008), 'Médecin traitant et patient en radiothérapie : conseils pratiques ', *Traitements et soins*
- (2011), 'Situation de la radiothérapie en 2010', (Institut national du cancer).
- (2019), 'Les cancers en France en 2018 - L'essentiel des faits et des chiffres (édition 2019)'.
- 'Les données.e-cancer.fr 2020 : Thèmes - Soins - La radiothérapie - L'activité et les techniques de traitement - La radiothérapie externe (Dernière date d'accès 10-03-2022)', <<https://lesdonnees.e-cancer.fr/Themes/Soins/La-radiotherapie/L-activite-et-les-techniques-de-traitement/La-radiotherapie-externe2>>.
- IRSN (2006), 'Informations - Le syndrome aigu d'irradiation '. <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKewjqmMzS3av0AhV9QfEDHSYRCswQFnoECA0QAw&url=https%3A%2F%2Fwww.irsn.fr%2FFR%2FActualites_presse%2FCommuniqués_et_dossiers_de_presse%2FDocuments%2FIRSN_syndrome_aigu_d_irradiation.pdf&usg=AOvVaw3z4ObkXADjAUCfCm9b7s2B>.
- Jaillet, C., et al. (2017), 'Radiation-induced changes in the glycome of endothelial cells with functional consequences', *Sci Rep*, 7 (1), 5290.
- Jin, J. Y., et al. (2020), 'Ultra-high dose rate effect on circulating immune cells: A potential mechanism for FLASH effect?', *Radiother Oncol*, 149, 55-62.
- Jin, Z. C., et al. (2018), 'Genetic disruption of multiple alpha1,2-mannosidases generates mammalian cells producing recombinant proteins with high-mannose-type N-glycans', *J Biol Chem*, 293 (15), 5572-84.
- Karamysheva, A. F. (2008), 'Mechanisms of angiogenesis', *Biochemistry (Mosc)*, 73 (7), 751-62.
- Kim, W., et al. (2019), 'Cellular Stress Responses in Radiotherapy', *Cells*, 8 (9).
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985), 'Assembly of asparagine-linked oligosaccharides', *Annu Rev Biochem*, 54, 631-64.

- Lavigne, J., et al. (2017), 'Conditional Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Deletion in the Endothelial Compartment Has No Beneficial Effect on Radiation-Induced Whole-Lung Damage in Mice', *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 99 (4), 972-82.
- Lavigne, J., et al. (2019), 'Lung Stereotactic Arc Therapy in Mice: Development of Radiation Pneumopathy and Influence of HIF-1alpha Endothelial Deletion', *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 104 (2), 279-90.
- Lawrence, M. B., et al. (1997), 'Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E)', *J Cell Biol*, 136 (3), 717-27.
- Leach, J. K., et al. (2001), 'Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen', *Cancer Res*, 61 (10), 3894-901.
- Leuchowius, K. J., Weibrecht, I., and Soderberg, O. (2011), 'In situ proximity ligation assay for microscopy and flow cytometry', *Curr Protoc Cytom*, Chapter 9, Unit 9 36.
- Li, C. W., et al. (2016), 'Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity', *Nat Commun*, 7, 12632.
- Li, H., et al. (2018), 'alpha-1,2-Mannosidase MAN1C1 Inhibits Proliferation and Invasion of Clear Cell Renal Cell Carcinoma', *J Cancer*, 9 (24), 4618-26.
- Li, T., et al. (2017), 'Modulating IgG effector function by Fc glycan engineering', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114 (13), 3485-90.
- Liauw, S. L., Connell, P. P., and Weichselbaum, R. R. (2013), 'New paradigms and future challenges in radiation oncology: an update of biological targets and technology', *Sci Transl Med*, 5 (173), 173sr2.
- Lin, B., et al. (2021), 'FLASH Radiotherapy: History and Future', *Front Oncol*, 11, 644400.
- Liu, R. M. and Desai, L. P. (2015), 'Reciprocal regulation of TGF-beta and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis', *Redox Biol*, 6, 565-77.
- Loinard, C., et al. (2017), 'Monocytes/Macrophages Mobilization Orchestrate Neovascularization after Localized Colorectal Irradiation', *Radiat Res*, 187 (5), 549-61.
- Lotfi, H., Sheervalilou, R., and Zarghami, N. (2018), 'An update of the recombinant protein expression systems of Cyanovirin-N and challenges of preclinical development', *Bioimpacts*, 8 (2), 139-51.
- Lowe, D. and Raj, K. (2014), 'Premature aging induced by radiation exhibits pro-atherosclerotic effects mediated by epigenetic activation of CD44 expression', *Aging Cell*, 13 (5), 900-10.
- Lumniczky, K., et al. (2021), 'Low dose ionizing radiation effects on the immune system', *Environ Int*, 149, 106212.

- Malipatlolla, D. K., et al. (2019), 'Long-term mucosal injury and repair in a murine model of pelvic radiotherapy', *Sci Rep*, 9 (1), 13803.
- Malouff, T. D., et al. (2020), 'Carbon Ion Therapy: A Modern Review of an Emerging Technology', *Front Oncol*, 10, 82.
- Malouff, T. D., et al. (2021), 'Boron Neutron Capture Therapy: A Review of Clinical Applications', *Front Oncol*, 11, 601820.
- Marathe, S., et al. (1998), 'Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling', *J Biol Chem*, 273 (7), 4081-8.
- Marth, J. D. and Grewal, P. K. (2008), 'Mammalian glycosylation in immunity', *Nat Rev Immunol*, 8 (11), 874-87.
- McKeown, S. R., et al. (2015), 'Radiotherapy for benign disease; assessing the risk of radiation-induced cancer following exposure to intermediate dose radiation', *Br J Radiol*, 88 (1056), 20150405.
- Mensah, S. A., et al. (2017), 'Regeneration of glycocalyx by heparan sulfate and sphingosine 1-phosphate restores inter-endothelial communication', *PLoS One*, 12 (10), e0186116.
- Meziani, L., Deutsch, E., and Mondini, M. (2018a), 'Macrophages in radiation injury: a new therapeutic target', *Oncoimmunology*, 7 (10), e1494488.
- Meziani, L., et al. (2018b), 'CSF1R inhibition prevents radiation pulmonary fibrosis by depletion of interstitial macrophages', *Eur Respir J*, 51 (3).
- Michiels, C. (2003), 'Endothelial cell functions', *J Cell Physiol*, 196 (3), 430-43.
- Milliat, F. and Francois, A. (2018), '[The roles of mast cells in radiation-induced damage are still an enigma]', *Med Sci (Paris)*, 34 (2), 145-54.
- Milliat, F., et al. (2008), 'Essential role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation enteropathy', *Am J Pathol*, 172 (3), 691-701.
- Mintet, E., et al. (2017), 'Endothelial Hey2 deletion reduces endothelial-to-mesenchymal transition and mitigates radiation proctitis in mice', *Sci Rep*, 7 (1), 4933.
- Mintet, E., et al. (2015), 'Identification of Endothelial-to-Mesenchymal Transition as a Potential Participant in Radiation Proctitis', *Am J Pathol*, 185 (9), 2550-62.
- Miossec, P. and Kolls, J. K. (2012), 'Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation', *Nat Rev Drug Discov*, 11 (10), 763-76.
- Molla, M., et al. (2003), 'Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation', *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 57 (1), 264-73.

- Mondini, M., et al. (2020), 'Radiotherapy-immunotherapy combinations - perspectives and challenges', *Mol Oncol*.
- Montay-Gruel, P., et al. (2019), 'Expanding the therapeutic index of radiation therapy by normal tissue protection', *Br J Radiol*, 92 (1093), 20180008.
- Montay-Gruel, P., et al. (2017), 'Irradiation in a flash: Unique sparing of memory in mice after whole brain irradiation with dose rates above 100Gy/s', *Radiother Oncol*, 124 (3), 365-69.
- Moremen, K. W., Tiemeyer, M., and Nairn, A. V. (2012), 'Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13 (7), 448-62.
- Moremen, K.W and Nairn, A.V (2014), 'Mannosidase, Alpha, Class 1 (MAN1A1 (Golgi Alpha-Mannosidase IA), Man1A2 (Golgi Alpha-Mannosidase IB), MAN1B1(ER Alpha-Mannosidase D), MAN1C1 (Golgi Alpha-Mannosidase IC)) ', *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes* (Springer Japan), 1297-312.
- Mouthon, M. A., et al. (2003), 'Irradiation increases the interactions of platelets with the endothelium in vivo: analysis by intravital microscopy', *Radiat Res*, 160 (5), 593-9.
- Mulivor, A. W. and Lipowsky, H. H. (2002), 'Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283 (4), H1282-91.
- Munkley, J. (2016), 'The Role of Sialyl-Tn in Cancer', *Int J Mol Sci*, 17 (3), 275.
- Nguyen, H. Q., et al. (2018), 'Ionizing radiation-induced cellular senescence promotes tissue fibrosis after radiotherapy. A review', *Crit Rev Oncol Hematol*, 129, 13-26.
- Nyman, J., et al. (2016), 'SPACE - A randomized study of SBRT vs conventional fractionated radiotherapy in medically inoperable stage I NSCLC', *Radiother Oncol*, 121 (1), 1-8.
- Owen, J., Punt, J., and Stranford, S. U. <https://books.google.fr/books?id=mfzcAwAAQBAJ> (2014), *Immunologie - 7e édition: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision* (Dunod).
- Pabst, M., et al. (2010), 'IL-1beta and TNF-alpha alter the glycophenotype of primary human chondrocytes in vitro', *Carbohydr Res*, 345 (10), 1389-93.
- Pakshir, P., et al. (2019), 'Dynamic fibroblast contractions attract remote macrophages in fibrillar collagen matrix', *Nat Commun*, 10 (1), 1850.
- Pan, J., et al. (2017), 'Inhibition of Bcl-2/xl With ABT-263 Selectively Kills Senescent Type II Pneumocytes and Reverses Persistent Pulmonary Fibrosis Induced by Ionizing Radiation in Mice', *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 99 (2), 353-61.
- Panes, J., et al. (1995), 'Role of leukocyte-endothelial cell adhesion in radiation-induced microvascular dysfunction in rats', *Gastroenterology*, 108 (6), 1761-9.
- Paris, F., et al. (2001), 'Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice', *Science*, 293 (5528), 293-7.

- Pellizzon, A.C.A (2017), 'Proton therapy - An evolving technology', *Adv Mod Oncol Res*, 3 (4), 153-55.
- Piera-Velazquez, S., Mendoza, F. A., and Jimenez, S. A. (2016), 'Endothelial to Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Human Fibrotic Diseases', *J Clin Med*, 5 (4).
- Pober, J. S. and Sessa, W. C. (2007), 'Evolving functions of endothelial cells in inflammation', *Nat Rev Immunol*, 7 (10), 803-15.
- Pollard, J. M., et al. (2017), 'The future of image-guided radiotherapy will be MR guided', *Br J Radiol*, 90 (1073), 20160667.
- Pordanjani, S. M. and Hosseinimehr, S. J. (2016), 'The Role of NF-kB Inhibitors in Cell Response to Radiation', *Curr Med Chem*, 23 (34), 3951-63.
- Prise, K. M., et al. (2005), 'New insights on cell death from radiation exposure', *Lancet Oncol*, 6 (7), 520-8.
- Puck, T. T. and Marcus, P. I. (1956), 'Action of x-rays on mammalian cells', *J Exp Med*, 103 (5), 653-66.
- Quarmby, S., et al. (1999), 'Irradiation induces upregulation of CD31 in human endothelial cells', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19 (3), 588-97.
- Raman, J., et al. (2012), 'UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases: completion of the family tree', *Glycobiology*, 22 (6), 768-77.
- Rannou, E., et al. (2015), 'In vivo evidence for an endothelium-dependent mechanism in radiation-induced normal tissue injury', *Sci Rep*, 5, 15738.
- Regal-McDonald, K., et al. (2019), 'High-mannose intercellular adhesion molecule-1 enhances CD16(+) monocyte adhesion to the endothelium', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 317 (5), H1028-H38.
- Regal-McDonald, K., et al. (2020), 'Assessment of ICAM-1 N-glycoforms in mouse and human models of endothelial dysfunction', *PLoS One*, 15 (3), e0230358.
- Reily, C., et al. (2019), 'Glycosylation in health and disease', *Nat Rev Nephrol*, 15 (6), 346-66.
- Renkonen, J., et al. (2002), 'Glycosylation might provide endothelial zip codes for organ-specific leukocyte traffic into inflammatory sites', *Am J Pathol*, 161 (2), 543-50.
- Risau, W. (1997), 'Mechanisms of angiogenesis', *Nature*, 386 (6626), 671-4.
- Rubin, P., et al. (1995), 'A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis', *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 33 (1), 99-109.

- Ryschich, E., et al. (2003), 'Radiation-induced leukocyte adhesion to endothelium in normal pancreas and in pancreatic carcinoma of the rat', *Int J Cancer*, 105 (4), 506-11.
- Sandoo, A., et al. (2010), 'The endothelium and its role in regulating vascular tone', *Open Cardiovasc Med J*, 4, 302-12.
- Schmidt, J., et al. (2000), 'Vascular structure and microcirculation of experimental pancreatic carcinoma in rats', *Eur J Surg*, 166 (4), 328-35.
- Schnaar, R. L. (2016), 'Glycobiology simplified: diverse roles of glycan recognition in inflammation', *J Leukoc Biol*, 99 (6), 825-38.
- Schott, U., et al. (2016), 'The endothelial glycocalyx and its disruption, protection and regeneration: a narrative review', *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*, 24, 48.
- Scott, D. W. and Patel, R. P. (2013), 'Endothelial heterogeneity and adhesion molecules N-glycosylation: implications in leukocyte trafficking in inflammation', *Glycobiology*, 23 (6), 622-33.
- Scott, D. W., Vallejo, M. O., and Patel, R. P. (2013a), 'Heterogenic endothelial responses to inflammation: role for differential N-glycosylation and vascular bed of origin', *J Am Heart Assoc*, 2 (4), e000263.
- Scott, D. W., et al. (2013b), 'Identification of a high-mannose ICAM-1 glycoform: effects of ICAM-1 hypoglycosylation on monocyte adhesion and outside in signaling', *Am J Physiol Cell Physiol*, 305 (2), C228-37.
- Scott, D. W., et al. (2012), 'Role of endothelial N-glycan mannose residues in monocyte recruitment during atherogenesis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32 (8), e51-9.
- Sebastian, N. T., Xu-Welliver, M., and Williams, T. M. (2018), 'Stereotactic body radiation therapy (SBRT) for early stage non-small cell lung cancer (NSCLC): contemporary insights and advances', *J Thorac Dis*, 10 (Suppl 21), S2451-S64.
- Soysouvanh, F., et al. (2020), 'Stereotactic Lung Irradiation in Mice Promotes Long-Term Senescence and Lung Injury', *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 106 (5), 1017-27.
- Sperandio, M., Gleissner, C. A., and Ley, K. (2009), 'Glycosylation in immune cell trafficking', *Immunol Rev*, 230 (1), 97-113.
- Su, L., et al. (2021), 'Potential role of senescent macrophages in radiation-induced pulmonary fibrosis', *Cell Death Dis*, 12 (6), 527.
- Svanberg, L., Astedt, B., and Kullander, S. (1976), 'On radiation-decreased fibrinolytic activity of vessel walls', *Acta Obstet Gynecol Scand*, 55 (1), 49-51.
- Szajek, L. P. (2014), 'Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection', *Antioxid Redox Signal*, 21 (2), 260-92.

- Takeuchi, O. and Akira, S. (2010), 'Pattern recognition receptors and inflammation', *Cell*, 140 (6), 805-20.
- Tatti, O., et al. (2008), 'MT1-MMP releases latent TGF-beta1 from endothelial cell extracellular matrix via proteolytic processing of LTBP-1', *Exp Cell Res*, 314 (13), 2501-14.
- Toth, E., et al. (2016), 'Changes of protein glycosylation in the course of radiotherapy', *J Pharm Biomed Anal*, 118, 380-86.
- Toullec, A., et al. (2018), 'HIF-1alpha Deletion in the Endothelium, but Not in the Epithelium, Protects From Radiation-Induced Enteritis', *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 5 (1), 15-30.
- Umehara, H., et al. (2001), 'Fractalkine, a CX3C-chemokine, functions predominantly as an adhesion molecule in monocytic cell line THP-1', *Immunol Cell Biol*, 79 (3), 298-302.
- UNSCEAR (2012), 'Sources, effects and risks of ionizing radiation', (Annex A).
- Van der Meeren, A., et al. (2003), 'Inflammatory reaction and changes in expression of coagulation proteins on lung endothelial cells after total-body irradiation in mice', *Radiat Res*, 160 (6), 637-46.
- Varki, A. (1997), 'Selectin ligands: will the real ones please stand up?', *J Clin Invest*, 99 (2), 158-62.
- Venkatesulu, B. P., et al. (2018), 'Radiation-Induced Endothelial Vascular Injury: A Review of Possible Mechanisms', *JACC Basic Transl Sci*, 3 (4), 563-72.
- Vereycken-Holler, V., Aigueperse, J., and Gaugler, M. H. (2002), 'Radiation effects on circulating and endothelial cell interactions studied by quantitative real-time videomicroscopy', *Int J Radiat Biol*, 78 (10), 923-30.
- Voswinkel, J., et al. (2013), 'Use of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic inflammatory fistulizing and fibrotic diseases: a comprehensive review', *Clin Rev Allergy Immunol*, 45 (2), 180-92.
- Vujaskovic, Z., et al. (2001), 'Radiation-induced hypoxia may perpetuate late normal tissue injury', *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 50 (4), 851-5.
- Wang, X., et al. (2005), 'Dysregulation of TGF-beta1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (44), 15791-6.
- Wang, Y., Boerma, M., and Zhou, D. (2016), 'Ionizing Radiation-Induced Endothelial Cell Senescence and Cardiovascular Diseases', *Radiat Res*, 186 (2), 153-61.
- Wang, Y. Y., et al. (2017), 'Macrophage-to-Myofibroblast Transition Contributes to Interstitial Fibrosis in Chronic Renal Allograft Injury', *J Am Soc Nephrol*, 28 (7), 2053-67.

- Wiesemann, A., et al. (2019), 'Inhibition of Radiation-Induced Ccl2 Signaling Protects Lungs from Vascular Dysfunction and Endothelial Cell Loss', *Antioxid Redox Signal*, 30 (2), 213-31.
- Williamson, R., et al. (2008), 'Adverse radiation effects after radiosurgery may benefit from oral vitamin E and pentoxifylline therapy: a pilot study', *Stereotact Funct Neurosurg*, 86 (6), 359-66.
- Wynn, T. A. (2004), 'Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm', *Nat Rev Immunol*, 4 (8), 583-94.
- Yang, E. H., et al. (2021), 'Radiation-Induced Vascular Disease-A State-of-the-Art Review', *Front Cardiovasc Med*, 8, 652761.
- Yentrapalli, R., et al. (2013), 'The PI3K/Akt/mTOR pathway is implicated in the premature senescence of primary human endothelial cells exposed to chronic radiation', *PLoS One*, 8 (8), e70024.
- Zaorsky, N. G., et al. (2016), 'Comparison of outcomes and toxicities among radiation therapy treatment options for prostate cancer', *Cancer Treat Rev*, 48, 50-60.
- Zhao, W., Diz, D. I., and Robbins, M. E. (2007), 'Oxidative damage pathways in relation to normal tissue injury', *Br J Radiol*, 80 Spec No 1, S23-31.
- Zhong, Y., et al. (2019), 'CCL2-CCL5/CCR4 contributed to radiation-induced epithelial-mesenchymal transition of HPAEpiC cells via the ERK signaling pathways', *Am J Transl Res*, 11 (2), 733-43.
- Ziegler-Heitbrock, L. and Hofer, T. P. (2013), 'Toward a refined definition of monocyte subsets', *Front Immunol*, 4, 23.

Régulation des interactions entre monocytes et cellules endothéliales après irradiation à forte dose

Résumé :

Les toxicités aux tissus sains, qui peuvent être particulièrement invalidantes pour les patients, constituent les principales limites de l'efficacité thérapeutique de la radiothérapie. Les macrophages pourraient jouer un rôle dans ces toxicités, mais leur mode d'action et de recrutement reste assez mal connu. Les monocytes interagissent avec l'endothélium vasculaire pour pénétrer dans le tissu et se différencier en macrophages. L'endothélium présente de multiples réponses à l'irradiation et participe au développement des complications. L'objectif de cette thèse est d'étudier le rôle d'acteurs endothéliaux régulant le recrutement des monocytes induit par les radiations. Pour cela, nous avons développé et utilisé des techniques d'imagerie en temps réel *in vitro* afin de modéliser deux étapes du processus de recrutement : l'adhésion dans des conditions de flux et la migration transendothéliale des monocytes. Ce travail s'est particulièrement intéressé au rôle de la mannosidase MAN1C1, enzyme impliquée dans la maturation des N-glycanes en hydrolysant les mannoses. Les résultats mettent en évidence le rôle de MAN1C1 dans le recrutement des monocytes induit par les radiations *in vitro*. L'étude de l'implication des N-glycanes hautement mannosylés dans le recrutement des macrophages *in vivo* dans un modèle de toxicité intestinale radio-induite n'a pas donné de résultats concluants. Ces travaux explorent également le rôle des couples de récepteurs/ligands CCR2/CCL2 et CX3CR1/CX3CL1. Les résultats préliminaires suggèrent un rôle de l'axe CX3CR1/CX3CL1 dans le recrutement des monocytes *in vitro*. Collectivement, ces travaux suggèrent un rôle pour MAN1C1 dans le recrutement des monocytes.

Mots clés : [Irradiation, endothélium, cellules myéloïdes, effets secondaires de la radiothérapie]

Regulation of interactions between monocytes and endothelial cells after high dose irradiation

Abstract :

Toxicities to healthy tissues, which can be particularly invalidating for patients, are the main limitations of the therapeutic efficacy of radiotherapy. Macrophages may play a role in these toxicities, but their modes of action and recruitment remain elusive. Monocytes interact with the vascular endothelium to enter the tissue and differentiate into macrophages. The endothelium shows multiple responses to irradiation and participates in the development of complications. The objective of this thesis is to study the role of endothelial actors regulating radiation-induced monocyte recruitment. For this purpose, we developed and used real-time *in vitro* imaging techniques to model two steps of the recruitment process: adhesion under flow conditions and transendothelial migration of monocytes. This work particularly focused on the role of MAN1C1 mannosidase, involved in N-glycan maturation by trimming mannoses. The results highlight the role of MAN1C1 in radiation-induced monocyte-endothelium interactions *in vitro*. Investigation of the involvement of high-mannose N-glycans in macrophage recruitment *in vivo* in a model of radiation-induced intestinal toxicity did not yield conclusive results. This work also explores the role of the receptor/ligand pairs CCR2/CCL2 and CX3CR1/CX3CL1. Preliminary results suggest a role for the CX3CR1/CX3CL1 axis in monocyte-endothelium interactions *in vitro*. Collectively, this work suggests a role for MAN1C1 in monocyte recruitment.

Keywords : [Radiations, endothelium, myeloid cells, radiotherapy adverse effects]