

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale 394 : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

IRSN / PRP-HOM / SRBE / Laboratoire de Recherche en Radiobiologie et Radiopathologie

Modifications du glycome endothélial vasculaire dans le contexte d'une irradiation à forte dose

Présentée par

Cyprien JAILLET

Thèse de doctorat de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Dirigée par le Dr Olivier GUIPAUD et le Pr Fabrice ALLAIN

Présentée et soutenue publiquement le 1^{er} Février 2017

Devant un jury composé de :

Pr Isabelle LIMON

Dr Sylvain JULIEN

Dr Marc-André MOUTHON

Dr Valegh FAID

Dr Stéphane SUPLOT

Dr Olivier GUIPAUD

Pr Fabrice ALLAIN

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Directeur de thèse

Joignez ce qui est complet et ce qui ne l'est pas, ce qui concorde et ce qui discorde, ce qui est en harmonie et en désaccord ; de toutes choses une et d'une, toutes choses.

Héraclite, *Fragments*

A mes grands-parents

Remerciements

Cette thèse est le fruit d'un travail collectif, pétri de nombreux échanges avec l'ensemble des personnes que j'ai eu la chance de pouvoir compter à mes côtés dans cette aventure et qui m'ont apporté aide, conseils et soutien. Je tiens donc à remercier :

Les membres du jury : **Isabelle Limon** pour avoir accepté d'examiner ce travail et de présider le jury, les rapporteurs **Sylvain Julien** et **Marc-André Mouthon**, les examinateurs **Valegh Faid** et **Stéphane Supiot** pour l'évaluation de mon travail.

Olivier Guipaud, mon directeur de thèse. Merci pour ta patience, ta très grande disponibilité et ton souci du détail.

Fabrice Allain, mon co-directeur de thèse, merci pour ton implication tout au long de ce projet, pour tes conseils avisés, délivrés avec humour.

Fabien Milliat, notre chef de labo pour sa disponibilité, son écoute et sa sérénité.

Marc Benderitter pour m'avoir accueilli dans son laboratoire (l'ancien LRTE) puis dans son service.

Mes collègues du L3R : **Agnès** pour tes conseils avisés, **Vincent** (Cytoman pour les intimes) pour ton énergie contagieuse, **Valérie** pour ton calme, pour tous ces kilolitres de milieu commandé et ces manip prise de tête résolues, **Georges** pour ta bonne humeur et tes mille et une cachettes à consommables, sans oublier **Céline**.

Les stagiaires longue durée du L3R : **Fanny** pour ton rire qui traverse même les murs, **Sonia** pour tous ces coups de mains en culture, **Elodie** pour ta bonne humeur, **Émilie** pour ton dynamisme inébranlable, **Jérémy L** pour ta sérénité et ton écoute, **Fred** pour ton autodérision et ta bonne humeur, **Jeremy C** pour ta gentillesse et ton calme. Je n'oublie pas les deux nouvelles **Annaig** et **Mariam** à qui je souhaite beaucoup de réussite.

Christelle (la toulousaine qui se fait oublier), merci pour ton soutien quotidien durant toute la phase d'écriture (et avant aussi bien sûr ;). **Aurore**, pour ce monitoring des week-ends à grand renfort de café et de rosé (attention aux mélanges), mais aussi pour tes conseils qui font relativiser. **Benoît**, pour ta bonne humeur et tes coups de gueule qui nous font toujours rire. Mais aussi pour nos échanges quotidiens qui nous ont aidés à traverser ce loooooong continuum d'événements qu'est la thèse ! **Alhondra**, pour ta sérénité sans limite et celle que tu as réussi à éveiller chez moi malgré la fin de thèse. **Sandra**, pour ton énergie contagieuse, et ta gentillesse constante qui contribuent à la

bonne ambiance :). **Amélie** from L.A. (bicheeeeeette), pour ta bonne humeur ! **Julianna**, merci pour ton positivisme et ton sourire. **Dimitri**, pour ta sérénité et ta bonne humeur. **Florence** pour ton énergie débordante, et tes conseils. **Yoan**, pour ta sérénité et ton écoute. **Amine**, pour ton aide impliquée au pied levé, et ta gentillesse. **Antony** notre physicien d'adoption. **Sabine** et **Lucie** pour nos conversations toujours animées. Je remercie aussi tous les « anciens » avec qui j'ai eu le plaisir et l'honneur d'user les paillasses : **Maeva**, ma stagiaire préférée. **Clélia**, pour ton énergie, le duo **Stéphanie** et **Marie** pour les pauses café si bien organisées. **Bastien** pour son sifflement contagieux. Mais aussi **Samir, Thelma, Fred T, Christine C.**

Les membres de l'ADI[N] (que je n'ai pas déjà cités) **Hugues, Nadia, Tiffany, Azza, Fabien, Zack** pour ces belles idées développées ensemble dans l'association, mais aussi pour nos repas, nos discussions, nos excursions... Longue vie à l'ADI[N] !

J'adresse tous mes remerciements aux membres du LR2I. En particulier **Claire**, pour ta gentillesse et ta bienveillance, merci aussi d'avoir parlé de moi à Nicolas. **Carine**, merci pour ta disponibilité et nos échanges tant scientifiques que personnels. **Alain**, merci pour nos échanges variés et tes conseils dans cette thèse. Merci également à **Alison, Stéphane, Bruno, Alexandre, Lara, Alexia, Christine, Christelle De, Noëlle, Alexandra, Valérie H.**

Merci au LRTOX pour son accueil toujours chaleureux et convivial. Un très grand merci à **Philippe, Maâmar, Stéphane, Jean-Marc, Dalila, Teni, Line, Céline** et **Christelle** avec qui j'ai toujours beaucoup de plaisir à discuter.

Merci aux membres du LDB un labo aussi discret qu'accueillant: **Aurèlie, Éric, Géraldine, Gaëtan, Pascale, Sandrine, Delphine, Cécile et Céline**

Merci à la team GSEA, toujours disponible et prête à rigoler : **Amandine, Mélanie, Romain, Fred, Sébastien et Delphine.**

Mes remerciements au SRBE ne seraient pas au complets si j'oubliais : **Chloé**, merci pour ta gentillesse, ton accueil et toutes les petites attentions dont tu fais preuve pour chacun de nous. **Morgane**, pour ta gentillesse et ton soutien. **Véronique** merci pour ton aide et ton accueil. **Radia** pour ton énergie.

Mes collaborateurs à Lille : **Willy Morelle, François Foulquier, Marie-Christine et Christian Slomianny** et **Anne-Sophie Lacoste** pour leur aide, leurs conseils et leur implication. **Pierre Martinez** pour son aide précieuse dans l'extraction des GAGs, **Mathieu Carpentier** pour la relève toujours dans l'extraction de GAGs. Je remercie aussi tous les membres de mes labos d'adoption lillois : **Agnès,**

Maxime, Charles, Anne-Sophie, Dorothée, Eudoxie, Sven, Clément, merci pour votre accueil, votre gentillesse, votre aide et votre disponibilité.

Merci à **Nicolas Bihoreau**, d'avoir insisté pour que je lui présente mes travaux et pour m'avoir présenté **Valegh Faid**, merci à vous deux pour l'intérêt que vous avez porté à mes travaux et au temps que vous m'avez consacré.

Mes pensées vont à **Marie-Christine**, qui m'a fait découvrir les joies de la spectrométrie de masse avec beaucoup de pédagogie et d'écoute. Tu nous as manqué pendant cette aventure.

Enfin, je veux remercier :

Mes **amis** (qui n'ont pas été cités plus haut déjà), merci pour vos encouragements, votre soutien et les petits breaks qu'on a réussi à se caler entre deux rédactions :)

Ma famille, pour son soutien et ses encouragements, vous êtes vraiment exceptionnels, j'ai de la chance de vous avoir et de pouvoir compter sur vous.

Et... **Marie-Hortense** ! Qui m'a supporté dans toutes les phases de cette longue aventure ! Merci pour ton soutien, et ta patience ;)

Publications, communications, et distinctions

Publications dans des revues à comité de lecture

Jaillet C, Morelle W, Slomianny M-C, Paget V, Tarlet G, Buard V, Selbonne S, Caffin F, Rannou E, Martinez P, François A, Foulquier F, Allain F, Milliat F, Guipaud O. *Radiation-induced changes in the glycome of endothelial cells with functional consequences*. Soumis en décembre 2016.

Rannou E, François A, Toullec, A, Guipaud O, Buard V, Tarlet G, Mintet E, **Jaillet C**, Iruela-Arispe M.L, Benderitter M, Sabourin J-C, Milliat F. *In vivo* evidence for an endothelium-dependent mechanism in radiation-induced normal tissue injury. *Sci Rep* **5**, 15738 (2015).

Communications orales

Jaillet C. *Le glycome vasculaire dans le contexte d'une irradiation à forte dose, jeudi du SRBE mai 2016*, IRSN Fontenay-aux-roses, France.

Jaillet C. *Modifications radio-induites du glycome de l'endothélium vasculaire : implications sur le recrutement des cellules circulantes et sur la thrombose vasculaire dans le tissu irradié, Journée des thèses de l'IRSN 2016*, le Croisic, France.

Jaillet C. *Role of endothelial cell glycosylation in initiation and development of radiation tissue injury, Plenary Session – From Bench to Clinic, 16th Jed 394 UPMC 2015*, Paris, France.

Jaillet C. *Modifications radio-induites du glycome de l'endothélium vasculaire : implications sur le recrutement des cellules circulantes et sur la thrombose vasculaire dans le tissu irradié, Journée des thèses de l'IRSN 2015*, L'Isle-sur-la-Sorgue, France.

Communications affichées

Jaillet C, Morelle W, Martinez P, Slomianny M-C, Buard V, Caffin F, Selbonne S, Benderitter M, Slomianny C, Lacoste A-S, Foulquier F, Francois A, Milliat F, Allain F, Guipaud O. *Role of endothelial glycome in a context of high doses radiation exposure, 17th Jed 394 UPMC 2016*, Paris, France.

Jaillet C; Martinez P; Slomianny M-C; Morelle W; Buard V; Benderitter M; Milliat F; Allain F; Guipaud O. *Role of endothelial cell glycosylation in the initiation and development of radiation tissue injury, 2015 : 61st Annual Meeting of the Radiation Research Society*, Weston, USA.

Jaillet C; Guipaud O. Radiation-induced modification of the endothelial glycome: action on cell circulation and thrombosis, **15th Jed 394 UPMC 2014**, Paris, France.

Prix scientifiques

Student in Training – Travel Award, 2015, **61st Annual Meeting of the Radiation Research Society**, Weston, USA.

Gagnant du concours de projet innovation en équipe pluridisciplinaire, **Doctoriales UMPC Avril 2016**, Sèvre, France.

Sommaire

Remerciements	4
Publications, communications, et distinctions.....	7
Sommaire	9
Abréviations	13
Avant-propos.....	16
Etat de l'Art.....	17
I. Exposition aux rayonnements ionisants.....	17
I.A. Rayonnements ionisants et origine des expositions	17
I.B. Application médicale : la radiothérapie	26
I.C. Effets secondaires des radiothérapies	33
II. Rôle du compartiment vasculaire dans la propagation des dommages radio-induits.....	46
II.A. Physiologie du compartiment endothélial	46
II.B. Rôle de l'endothélium dans la propagation des lésions radio-induites	61
III. La glycosylation, composante clé de l'organisation du vivant	72
III.A. Le glycome.....	72
III.B. Régulation de la synthèse, fonctions et structures associées.....	85
III.C. Le glycome endothélial.....	92
IV. Le glycome endothélial en contexte inflammatoire	99
IV.A. Modification du glycome en réponse aux stimuli inflammatoires.....	99
IV.B. Influence sur le recrutement des cellules circulantes.....	107
Problématique.....	124
Résultats.....	126
I. Présentation de l'article	126
I.A. Objectifs.....	126
I.B. Résultats	126

I.C.	Conclusion	127
II.	Justification des modèles	128
II.A.	HUVECs	128
II.B.	Modèle murin d'irradiation de l'anse intestinale.....	128
III.	Article	129
IV.	Synthèse des résultats.....	162
	Résultats supplémentaires.....	165
I.	Etude transcriptomique des gènes codant pour les enzymes impliqués dans la synthèse des GAGs.....	165
II.	Profil de glycosylation sur les tissus murins	166
III.	Profil de glycosylation sur résection de patients traités par radiothérapie.....	168
	Discussion.....	170
I.	L'irradiation provoque une modification du profil de glycosylation.....	170
I.A.	Modifications du N-glycome	170
I.B.	Modification du O-glycome	173
I.C.	Capping.....	175
I.D.	Modification du glycocalyx.....	178
I.E.	Existence de modifications radio-induites de la glycosylation <i>in vivo</i>	181
I.F.	Réflexions critiques sur les modèles utilisés	183
I.G.	Pour améliorer ces expériences	185
II.	La modification du glycome a des effets fonctionnels.....	187
II.A.	Effet fonctionnel de la modification du glycome	187
II.B.	Synergie entre le <i>shedding</i> et la modification des glycanes	191
II.C.	Pour améliorer les résultats	192
III.	Hypothèses sur la modification radio-induite du glycome	193
III.A.	Domages à l'ADN.....	193
III.B.	Rôle des molécules radio-induites	193
III.C.	Effets sur les compartiments cellulaires.....	194

Perspectives.....	197
I. Existence de modifications radio-induites du glycome <i>in vivo</i> . Conséquences et solution thérapeutiques.....	197
II. Rôle du sang et des autres protéines circulantes.....	201
II.A. Rôle du sang et des cellules sanguines.....	201
II.B. Interactions CE - plaquette : thrombose.....	201
III. Sénescence.....	202
III.A. Sénescence endothéliale radio-induite.....	202
III.B. Existence de modifications du glycome dues à la sénescence ?.....	205
III.C. Intérêt dans la modulation du recrutement des leucocytes.....	206
Conclusion générale.....	207
Références.....	208
I. Bibliographie.....	208
II. Tables des illustrations.....	232
III. Table des tableaux.....	235
Annexes.....	236
I. Nomenclature.....	236
II. Synthèse des résultats de la transcriptomique chez les HUVECs.....	237
II.A. O-glycanes de types non GalNAc.....	237
III. Synthèse des résultats de la transcriptomique chez la souris C57BL/6.....	238
III.A. N-glycanes.....	238
III.B. O-glycanes.....	239
III.C. Maturation (<i>capping</i>).....	240
III.D. O-glycanes de types non GalNAc.....	241
IV. Correspondance gènes/enzymes de glycosylation impliqués dans les étapes des chaînes de synthèse des glycanes.....	242
IV.A. Etape de synthèse dans le RE du précurseur de la N-glycosylation.....	242
IV.B. Etape de synthèse des N-glycanes.....	243

IV.C.	Synthèse et maturation des O-glycanes.....	244
IV.D.	Le <i>decorating</i> et le <i>capping</i> , processus communs au N- et aux O- glycanes.....	245
IV.E.	O-glycanes de type non GalNAc	247
V.	Modèle cellulaire.....	248
VI.	Modèle murin.....	249
VII.	CV du candidat	250

Abréviations

AP-1	Activator protein (AP)-1	GalNAc	N-acétylgalactosamine
ApoE	Apolipoprotéine E	Glc	Glucose
CAM	Cell Adhesion Molecule (molécule d'adhésion)	GlcNAc	N-acétylglucosamine
CE	Cellules Endothéliales	GlyCAM-1	Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule-1
Con A	Concanavaline A (lectine)	GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
CS	Chondroïtine-Sulfates	Golgi	Appareil de Golgi
CSF1	Colony Stimulating Factor 1/macrophage colony-stimulating factor (facteur de croissance des colonies)	GOLPH3	Golgi phosphoprotein 3
CTGF	Connective Tissue Growth Factor	GPCR (RCPG)	G Protein Coupled Receptor (récepteur couplés à une protéine G)
CXC	Chimiokines CXC	GPI	Glycosylphosphatidylinositols
CXCL	Chimokine (C-X-C motif) Ligand	Gy	Gray (J/Kg)
DAMP	Damage-Associated Molecular Patterns	HA	Hyaluronane ou Acide Hyaluronique
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole	HBMEC	Human Brain Microvascular Endothelial Cells
DC	Dendritic cells (cellules dendritiques)	HEV	High Endothelial Venules (veinules à endothélium épais)
DE	Dysfonction Endothéliale	HIF	Hypoxia-Inducible Factors
DERI	Dysfonction Endothéliale Radio-Induite	HS	Héparane Sulfate
DNA-PKCS	DNA-dependent protein kinase	HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
DS	Dermatane-Sulfates	ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
DSA / DSL	Datura Stramonium Lectin (lectine)	IFN	Interferon
EBR	Efficacité Biologique Relative	IGRT	Image-Guided Radiation Therapy (RT guidée par l'image)
eNOS	Nitric Oxyde Synthase endothéliale	IL-	Interleukine
FGF	Fibroblast growth factor (facteurs de croissance des fibroblastes)	IMRT	Intensity-Modulated Radiation Therapy (RT conformationnelle avec modulation d'intensité)
FITC	Fluorescein Isothiocyanate	Jacaline	Jacalin (lectine)
Fuc	Fucose	JAM	Junctional Adhesion Molecules
GAG	Glycosaminoglycane	KO	Knockout (déléte pour le gène)
Gal	Galactose	KS	kératane-Sulfates

LB	lymphocyte B	OAR	Organes A Risques
LCA	Lens Culinaris Agglutinin (lectine)	PAF	Platelet Activating Factor
LDL	Low Density Lipoprotein (lipoprotéines de basse densité)	PAI-1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1
Le	Anticorps de Lewis	PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
Le ^x	Lewis X	PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1 ; intégrine (β2, CD18) + (αL, CD11a)	PGI ₂	Prostaglandine I2
LPS	Lipopolysaccharide	PHA-L	Phaseolus vulgaris leukoagglutinin (lectine)
LQ	(modèle) Linéaire Quadratique	PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
LT	lymphocyte T	RE	Réticulum Endoplasmique
LTL	Lotus Tetragonolobus Lectin (lectine)	RI	Rayonnements Ionisants
Mac-1	Macrophage-1 antigen ; intégrine (β2, CD18) + (αM, CD11b)	RNS	Reactive Nitrogen Species (especes réactives à l'azote)
MAdCAM-1	mucosal vascular addressin Cell Adhesion Molecule 1	ROS	Reactive Oxygen Species (especes réactives a l'oxygène)
MAL-II	Maackia amurensis Leukoagglutinin (lectine)	RT	Radiothérapie
Man	Mannose	SA	Sialic Acid (acide sialique)
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases	SASP	Senescence-Associated Secretory Phenotype
MEC	Matrice Extra Cellulaire	SERI	Sénescence Endothéliale Radio- Induite
MHC	Major Histocompatibility Complex (complexe majeur d'histocompatibilité)	SGI	Syndrome Gastro-Intestinal
MIC	Maladies Inflammatoires Chroniques	sLe ^x	sialyl Lewis X
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin	SNA	Sambucus nigra Agglutinin (lectine)
MMP	Matrix Metalloproteinase	SOD	Superoxyde dismutase
MPO	Myéloperoxydase	SPIS	Sénescence Prématuré Induite par un Stress
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin	SRI	Sénescence Radio-Induite
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule	Sv	Sievert
NFκB	Nuclear Factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells	TBI	Total Body Irradiation (irradiation corps entier)
NOS	Nitric Oxide Synthase	TF	Tissu Factor (facteur tissulaire)

TGF- β	Transforming Growth Gactor- β (facteur de croissance transformant)
THP-1	Lignée cancéreuse de monocytes
TNF- α	Tumor necrosis factor α (facteur de nécrose tumorale)
TP53 (ou p53)	Tumor Protein 53
UEA-I	Ulex Europaeus Agglutinin (lectine)
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VE-cad	VE-cadhérine
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)
VLA-4	Very Late Antigen-4; intégrine (β 1, CD29) + (α 4, CD49d)
VVL	Vicia Villosa Lectin (lectine)
vWF	von Willebrand Factor
WGA	Wheat Germ Agglutinin (lectine)
WPB	Weibel–Palade bodies (corps de Weibel–Palade)

Avant-propos

Les rayonnements ionisants ont été découverts à la fin du XIX^{ème} siècle. Dans le domaine médical, ils ont rapidement fait l'objet d'applications en imagerie et dans le traitement de certaines affections comme le cancer. La radiothérapie est un traitement médical qui met à profit les effets des rayonnements ionisants sur la matière biologique. Elle constitue l'une des principales modalités de traitement des cancers en France et dans le monde. Si elle permet l'éradication du cancer, la radiothérapie induit aussi un risque d'effets secondaires au niveau des tissus sains environnant la tumeur. Dans le but d'améliorer les connaissances sur les effets secondaires de radiothérapies, l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire a mis en place le programme de recherche ROSIRIS. Son objectif est d'améliorer la prédiction de l'apparition d'effets secondaires, et de proposer des pistes pour réduire les effets des rayonnements aux tissus sains.

Dans ce contexte, le Laboratoire de Recherche en Radiobiologie et Radiopathologie (L3R) a identifié la réponse du système vasculaire comme un facteur influençant l'apparition des effets secondaires de la radiothérapie. Cette sensibilité est particulièrement marquée au sein des micro-vaisseaux sanguins, composés uniquement de cellules endothéliales. Plusieurs travaux menés par de nombreuses équipes, dont la nôtre, ont mis en évidence le rôle de ce type cellulaire dans l'initiation et la propagation des affections radio-induites. La pathogénèse des lésions radio-induites met notamment en jeu un important recrutement de cellules circulant dans le sang. Les sucres (glycanes) exprimés à la surface des cellules sont par ailleurs connus pour influencer la communication-intercellulaire et le recrutement des cellules sanguines. De précédents travaux menés au sein du L3R avaient montré que les glycanes présents sur les protéines sériques sont modifiés par l'irradiation.

Dans cette thèse, nous avons voulu en savoir plus sur les mécanismes qui régissent le recrutement des cellules circulantes dans les tissus irradiés. Pour cela, nous avons identifié les effets de l'irradiation à forte dose sur la composition en glycanes membranaires de l'endothélium. Puis nous avons mené des investigations sur les effets fonctionnels de ces changements. Nous avons ainsi caractérisé l'influence de la modification radio-induite de la composition en sucres sur l'adhésion des monocytes. Ce travail ouvre des pistes intéressantes sur les mécanismes impliqués dans l'infiltration du tissu lésé par les cellules immunitaires dans le contexte d'une exposition à forte dose de rayonnements ionisants.

Etat de l'Art

I. Exposition aux rayonnements ionisants

I.A. Rayonnements ionisants et origine des expositions

Les rayonnements ionisants (RI) ont été découverts à la fin du XIX^{ème} siècle. Leurs usages ont révolutionné le monde des sciences, et notamment impacté les secteurs de l'énergie, de la médecine et de l'armement où ils trouvent leurs applications les plus connues.

I.A.1. Rayonnements ionisants

I.A.1.a. Définition et nature physique des rayonnements ionisants

Les rayonnements ionisants (RI) sont des émissions particulaires ou électromagnétiques qui possèdent une énergie suffisante pour provoquer une ionisation des atomes du milieu traversé. Les RI peuvent se présenter sous la forme de particules chargées, comme des particules alpha, bêta, des protons ou des ions lourds, directement ionisantes. Les RI peuvent aussi être des particules non chargées, comme des neutrons ou des photons (rayonnement γ ou X), indirectement ionisantes car l'énergie du rayonnement n'est déposée que lorsque la particule interagit avec une particule chargée présente dans la matière. Le Tableau 1 ci-dessous détaille la nature des RI les plus courants.

Tableau 1 : types de rayonnements ionisants.

Type de rayonnement	Ionisation	Nature du Rayonnement	Particule
Electromagnétique	Indirecte	Ultraviolet	Photon
		X	
		Gamma	
Particulaire	Directe	Neutron	Neutron
		β^-	Electron
		β^+	Positon
		Muon	Muon
		Proton (p+)	Proton
		α	Ion ^4He
		Ions lourd	C, Pb, O

Les RI sont d'origine naturelle (terrestre ou extraterrestre) ou artificielle. La radioactivité est la source la plus connue. Elle provient de la désintégration de noyaux atomiques naturellement instables nommés radioisotopes. En se désintégrant, ils accèdent à un niveau de stabilité supérieur et peuvent émettre des rayonnements α , β , γ et X. Les RI transmettent aux milieux qu'ils traversent toute ou partie de leur énergie, avec pour conséquences des modifications des matériaux traversés. Ces modifications dépendent de la nature des RI (α , β , γ , X) et de la dose d'irradiation. La dose correspond à la quantité d'énergie cédée par le rayonnement à la matière traversée. Plusieurs unités

de mesure sont utilisées pour rendre compte des différents effets de ces échanges d'énergie. Le Gray (Gy) est l'unité de dose absorbée par la matière. Elle représente l'énergie absorbée par un kilogramme de matière exposée à un rayonnement ionisant apportant une énergie d'un joule : $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$. La mesure de la dose en Gray ne tient pas compte de la nature de la matière exposée au RI. En particulier, la sensibilité de la matière biologique n'est pas prise en compte. Pourtant, la même quantité d'énergie cédée à des tissus de différentes natures produit des effets non équivalents. Le Sievert (Sv) permet d'évaluer l'impact du rayonnement sur la matière vivante. Cette grandeur permet de comparer l'effet d'une même dose délivrée par des rayonnements de natures différentes à l'organisme entier, à des organes ou à des tissus qui n'ont pas la même sensibilité aux rayonnements. Le Sievert est l'unité de mesure des doses équivalente (H) et efficace (E) qui sont calculées à partir de la dose absorbée (D). La dose équivalente tient compte de la distribution de l'énergie dans la matière vivante et diffère selon la nature du rayonnement. La dose efficace prend en compte la nature et la sensibilité de l'organe ou du tissu traversé par le RI. Elle permet d'apprécier l'impact à l'échelle de l'organisme entier d'une exposition aux rayonnements ionisants d'un ou plusieurs organes. Le Tableau 2 résume les grandeurs utilisées pour la mesure des doses.

Tableau 2 : unité de mesure des rayonnements.

Dose	Unité	Obtenu par	Spécificité de la mesure	Formule
Absorbée (D)	Gy	mesure	Indépendante de la nature de la matière traversée par les RI	$D = dE \text{ (J)} / dm \text{ (kg)}$
Equivalente (H)	Sv	calcul	Dépendante de la nature des RI	$H = D \times W_R$
Efficace (E)	Sv	calcul	Dépendante de la nature des RI et du tissu / organe	$E = H \times W_T$

dE : Energie absorbée (J) ; dm : masse (Kg) ; W_R : facteur de pondération de la nature de la RI ; W_T : facteur de pondération tissulaire

En physique et en radioprotection, le Transfert d'Energie Linéaire (TEL) est une grandeur qui mesure la quantité d'énergie que cède un RI par unité de distance parcourue dans la matière. Son unité est le $\text{keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$. Le TEL rend compte de la capacité d'un RI à traverser la matière et à déposer son énergie. Plus le TEL est élevé, plus la quantité d'énergie transmise par le RI est cédée sur une courte distance. Il dépend de la nature et de l'énergie du rayonnement, mais aussi de la masse volumique du milieu cible. Par exemple, les rayonnements α sont faiblement pénétrants mais de forte énergie, ils ont donc un TEL élevé. Pour estimer les effets biologiques, on utilise parfois le TEL, en considérant qu'un TEL élevé provoque localement de plus grands effets. Cependant la seule mesure du TEL est insuffisante pour estimer les effets biologiques.

1.A.2. Sources d'exposition aux rayonnements ionisants

L'exposition aux RI peut s'opérer selon trois modes : l'exposition externe, l'exposition interne et l'exposition de contact. L'exposition externe est le mode d'exposition le plus courant. La source de RI est située à l'extérieur de la cible (objet ou organisme) et l'irradiation a lieu sans contact direct entre la source de RI et la cible. La plupart des expositions naturelles et médicales sont externes. L'exposition a lieu à distance, elle privilégie surtout les RI faiblement ralentis par la matière (TEL faible), c'est-à-dire des rayonnements X et γ . L'exposition de contact (ou contamination externe) est rare. Dans ce cas, la source de RI est directement en contact avec la cible. Les RI à TEL élevé ou faible peuvent agir. Chez l'Humain, ce type d'exposition survient lors d'accident de manipulation de sources non scellées ou lors de traitement médicaux tel que la curiethérapie. L'exposition interne (ou contamination interne) consiste en la pénétration de sources de RI, dans l'organisme (par ingestion ou inhalation). Les sources se présentent majoritairement sous formes d'aérosols, de poussières ou de denrées contaminées. Les RI faiblement pénétrants peuvent déposer, à l'intérieur du corps, de très fortes doses de RI directement sur ou dans les cellules. Les radionucléides diffusent dans l'organisme en fonction de leur forme chimique (libre ou liée). Ainsi, certains radioéléments se fixent sur des tissus ou organes particuliers. L'iode 131 par exemple se fixe préférentiellement sur la thyroïde. La pénétration de ces émetteurs de RI dans le corps induit une radio-toxicité.

L'UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation) est un des organismes à avoir défini des échelles et seuils de dose d'exposition aux RI. Nous verrons dans la [partie 1.A.3](#) que les effets biologiques des RI conduisent au classement des expositions en deux grandes catégories : faible et forte dose. Pour mieux détailler les sources d'exposition, nous allons distinguer les expositions à faibles doses, inférieures à 100 mSv, des expositions à fortes doses supérieures à 2 Sv.

I.A.2.a. Faibles doses

Les expositions à de faibles doses peuvent être continues ou ponctuelles. Les expositions continues sont involontaires ou accidentelles et très majoritairement d'origine naturelle. Les expositions ponctuelles sont d'origine artificielle : elles proviennent presque exclusivement d'expositions diagnostiques médicales. On distingue ainsi :

- Les **expositions environnementales**, dues aux rayonnements cosmiques créés dans la haute atmosphère aux rayonnements telluriques issue des sols et au radon, un gaz radioactif émanant des sols.
- Les **expositions professionnelles**, reçues par les travailleurs du nucléaire ou les personnels médicaux aux cours de leurs activités professionnelles. Ces doses reçues font l'objet d'un suivi étroit.
- Les **expositions médicales**, reçues par les patients lors des examens médicaux (à visée diagnostique ou thérapeutique)¹.

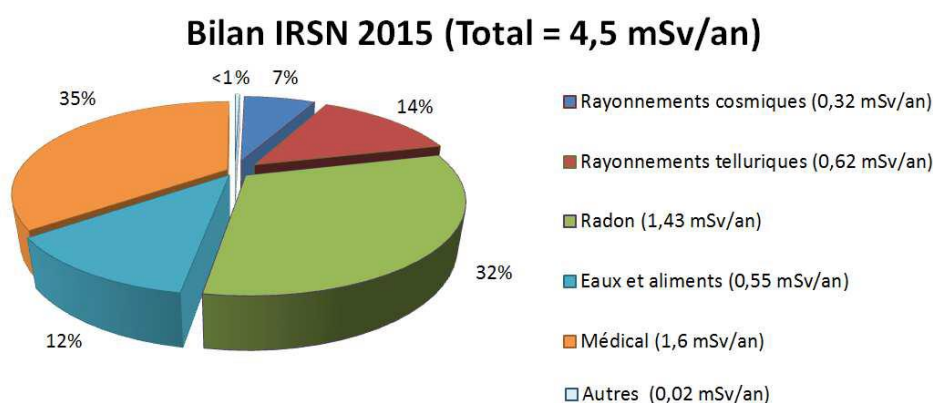


Figure 1 : exposition moyenne de la population française pour l'année 2015 (d'après les données IRSN¹).

L'exposition moyenne de la population française au RI toutes sources confondues est de 4,5 mSv/an, dont 2,9 mSv/an dû aux sources naturelles et 1,6 mSv/an dû aux sources artificielles. Cependant une grande variabilité interindividuelle est observée. La [Figure 1](#) résume l'ensemble des expositions.

I.A.2.b. Fortes doses

Les expositions à de fortes doses de rayonnements ionisants, c'est-à-dire supérieures à 1 Gy ont lieu dans deux cas de figures. Dans le cadre d'un traitement médical, l'exposition a lieu de manière volontaire et consciente en environnement maîtrisé. Dans le cas d'un accident, l'exposition survient de manière fortuite et imprévisible. Les expositions médicales (radiothérapie et radiologie interventionnelle) sont un volet particulier des expositions aux RI. Ils font l'objet de la [partie I.B Application médicale : la radiothérapie](#).

Dans le cas de l'accident, l'exposition entraîne ou risque d'entraîner des blessures ou des dommages à la santé des personnes directement impliquées de manière accidentelle et involontaire². La majorité des accidents reportés ont lieu dans le secteur médical (32% pour la radiothérapie et 31%

pour la fluoroscopie) suivi par le secteur industriel (27%). La part des accidents touchant les industriels et du public a tendance à diminuer. Ceci est notamment dû à l'édition et la diffusion de normes et de guides établissant des standards de sécurité. En revanche la proportion des accidents d'origine médicale, affectant majoritairement les patients, augmente, ce qui s'explique par l'utilisation de plus en plus fréquente de la radiothérapie et de la fluoroscopie. Aujourd'hui, la radiothérapie occupe la première place au rang des causes de surexposition.

Plusieurs paramètres déterminent le degré de sévérité de l'accident : la dose, le volume exposé, les organes touchés et la nature des RI. Si la survenue des accidents baisse dans l'industrie, ce secteur concentre tout de même la majorité des accidents sévères. Les victimes reçoivent une forte dose souvent invalidante. Ces accidents entraînent parfois la mort consécutive au syndrome d'irradiation aigu (ARS : Acute Radiation Syndrome)². La résolution des accidents est principalement dépendante de 2 facteurs : (1) Le temps nécessaire à la reconnaissance et la prise en charge de l'incident ; (2) Le niveau de difficulté de la gestion de l'incident. La rapidité de reconnaissance est ainsi un facteur d'une bonne gestion de crise qui, pour être efficace doit être minutieusement préparée en amont³.

I.A.3. Effets biologiques

La traversée de la matière vivante par les RI provoque des excitations et des ionisations sur les molécules impactées. Le retour à un état d'équilibre provoque la création de radicaux libres à l'échelle cellulaire. Lorsque les RI impactent des cellules ou tissus, ces radicaux libres, extrêmement réactifs, peuvent perturber les réactions biochimiques et les voies métaboliques. Ces effets moléculaires peuvent être directs ou indirects. Ils exposent les cellules à un stress important qui peut aboutir à la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. Il existe cependant des systèmes de réparation capables de rétablir un état physiologique. Les RI ont ainsi des effets à l'échelle cellulaire. Enfin, la disparition des types cellulaires les plus radiosensibles, concomitante à des arrêts du cycle cellulaire et à des phénomènes inflammatoires, impactent fortement l'organisation des systèmes biologiques qui induisent des atteintes tissulaires.

I.A.3.a. Effets physico-chimiques et moléculaires

A l'échelle moléculaire, les RI peuvent agir directement sur les biomolécules en provoquant leur ionisation ou leur excitation. Les acides nucléiques et notamment l'ADN y sont particulièrement sensibles. D'autre part, il existe une probabilité importante que l'ionisation/excitation ait lieu sur une molécule d'eau, provoquant ainsi sa radiolyse. Ce phénomène initie une cascade de réactions chimiques génératrices de radicaux libres pouvant réagir avec les biomolécules (*Figure 2*). Ces produits de la radiolyse de l'eau participent aux effets moléculaires indirects des RI⁴. Dans ce phénomène, les espèces synthétisées sont majoritairement e^-_{aq} , OH^\bullet , H^\bullet , H_2 , et H_2O_2 . Une partie

d'entre elles sont des espèces réactives de l'oxygène (ROS), comme le radical hydroxyle (OH^\bullet), ou l'eau oxygénée (H_2O_2). Chez les Mammifères, on estime que les deux tiers des dommages provoqués par une exposition aux rayons X sont dus à la radiolyse de l'eau⁵.

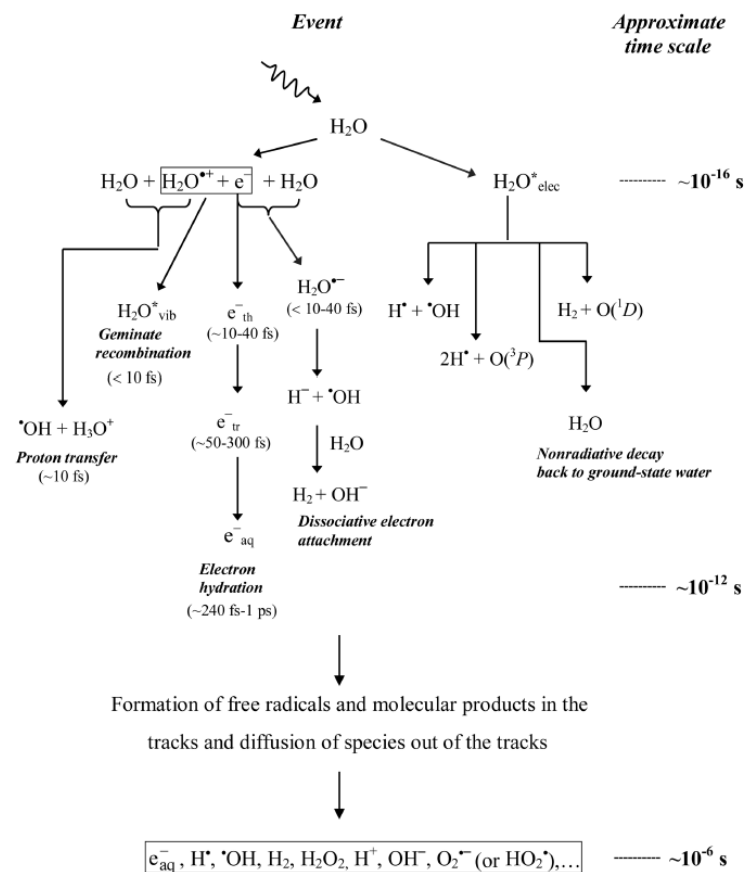


Figure 2 : radiolyse de l'eau (d'après Azzam et Al.⁴).

En présence d'oxygène, e^-_{aq} et H^\bullet sont rapidement convertis en ROS sous la forme de radicaux superoxyde et perhydroxyle ($\text{O}_2^{\bullet-}$, HO_2^\bullet) qui viennent s'ajouter à ceux naturellement présents en condition aérobie ($\text{O}_2^{\bullet-}$, OH^\bullet , H_2O_2). La proximité des molécules biologiques permet aussi l'apparition de radicaux organiques carbonés (R^\bullet) réactifs avec l'oxygène pour donner des radicaux peroxydes (RO_2^\bullet) plus réactifs encore. Ils vont réagir avec de nouvelles biomolécules pour former des hydroperoxydes (ROOH). Les radicaux organiques sont responsables de la peroxydation des lipides et de l'inactivation des protéines suite à l'irradiation.

Les RI provoquent aussi l'apparition d'espèces réactives de l'azote (RNS) comme l'oxyde nitrique (NO^\bullet). Cette espèce est produite par les enzymes de la famille des *nitric oxide synthase* (NOS), dont l'activité est stimulée par les RI. Le NO^\bullet réagit en présence d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ pour former l'anion peroxydinitrite (ONOO^-). Cet anion tout comme le radical hydroxyle est capable de réagir avec quantité de molécules biologiques telles que les lipides, les thiols, les protéines et les bases de l'ADN. Si la création des ROS et RNS a lieu presque instantanément, elle reste maintenue dans le temps (jusqu'à

plusieurs mois) et peut se transmettre aux cellules filles. D'autre part, des cellules proches mais non touchées par les rayonnements répondent également au stress oxydant suite à des mécanismes de communication cellulaire (effet *bystander*).

D'autres molécules que l'ADN subissent l'action des rayonnements ionisants. Les radicaux libres peuvent agir sur les acides aminés soufrés, menant à la création de ponts disulfures intra- ou inter-peptidiques affectant la conformation et l'activité des protéines. Au niveau des lipides, on observe la peroxydation des acides gras qui a pour conséquence une modification de la fluidité membranaire⁶.

I.A.3.b. Effets cellulaires

L'ADN peut être directement altéré par les RI mais aussi de manière indirecte par les radicaux libres⁷. La molécule d'ADN peut subir des cassures double- ou simple-brin, la modification et/ou l'élimination d'une ou plusieurs bases et/ou sucres, la formation de liaisons covalentes intra-chaines ou inter-chaines entre nucléotides, des délétions, des translocations et/ou inversions chromosomiques. Ces dommages à l'ADN mettent en péril l'intégrité du génome. Cependant, ils surviennent naturellement en dehors de toute exposition aux RI⁸. Pour s'en prémunir, les cellules possèdent des systèmes senseurs et de réparation des dommages à l'ADN⁹.

En cas de dommages à l'ADN, les systèmes senseurs provoquent l'arrêt du cycle au niveau des *checkpoints* (points de contrôles)¹⁰. Si la cellule détecte une réparation réussie, le cycle cellulaire reprend son cours. Une réparation infidèle, génératrice de mutation, pourra conduire à une carcinogénèse. Dans le cas où les dommages ne sont pas réparables, la cellule initie l'apoptose, la mort mitotique, la nécrose ou peut entrer en sénescence. L'apoptose est le processus de mort cellulaire le plus fréquent après irradiation¹¹. A la différence de l'apoptose, la nécrose est un phénomène accidentel et beaucoup plus rare après irradiation. La nécrose provoque la libération non contrôlée du contenu intracellulaire, ce qui induit une réponse inflammatoire locale. La mort mitotique (ou catastrophe mitotique) est le résultat d'une mitose aberrante¹².

La cassure double brin est le dommage le plus impactant car il peut entraîner la mort cellulaire¹³. La réponse cellulaire dépendra notamment de la phase du cycle à l'instant de la lésion. En phase G2/M, la lésion est détectée par les protéines kinases ATR et ATM. Elles phosphorylent la protéine BRCA1. Cette dernière initie la réparation de l'ADN par recombinaison homologue et régule le *checkpoint* G2/M. ATR et ATM agissent aussi via des voies de signalisations sur les *checkpoints* intra-S. Lors de la phase G1, l'activation d'ATM permet d'agir sur le *checkpoint* de restriction. ATM active la voie p53-p21 par phosphorylation de p53. ATM peut aussi phosphoryler le complexe protéique Ku70/80 (lié à l'ADN). Ce dernier recrute la sous-unité catalytique DNA-PKCS pour former le complexe Ku/DNA-PK qui active la réparation de l'ADN par jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ)¹⁴. Pour identifier

l'apparition de dommages à l'ADN tels que des cassures double-brin, les foci γ H2AX sont classiquement utilisés. Les foci γ H2AX sont issus de la phosphorylation de l'histone H2AX par les kinases ATM et ATR⁹.

I.A.3.c. Effets tissulaires

L'irradiation se manifeste donc par des mutations, translocations ou bien la survenue de la mort cellulaire, ce qui implique des conséquences au niveau tissulaire. La sévérité des dommages radio-induits dépend de la radiosensibilité, de la capacité de réparation, du taux de prolifération cellulaire et surtout du temps de survie des cellules fonctionnelles à l'état différencié. Dans le cas d'un renouvellement cellulaire très lent, les cellules sont peu sensibles aux rayonnements : elles pourront jouer leur rôle physiologique jusqu'à leur mort. Leurs cellules filles, assurant leur renouvellement, pourront cependant comporter des anomalies fonctionnelles ou des défauts de maturité. L'atteinte tissulaire n'apparaîtra que suite à ce remplacement. Les tissus à renouvellement cellulaire lent comme le tissu nerveux, conjonctif ou musculaire ne présenteront donc que tardivement des dysfonctionnements, sauf dans le cas des très fortes doses. A l'inverse, les irradiations affectant les tissus à fort renouvellement cellulaire (épithéliums, moelle osseuse ou micro-vascularisation) se manifestent cliniquement très rapidement (heures, jours).

Les effets tissulaires et systémiques observables suite à l'exposition ne sont pas le seul fait de la mort ou du dysfonctionnement de quelques cellules. Ces conséquences cellulaires sont l'élément déclencheur d'un phénomène plus global : on parle de cascade évènementielle. La mort ou la dysfonction cellulaire (effet direct) sont suivies d'effets indirects : la sécrétion de médiateurs de l'inflammation et de radicaux libres provoque une rupture d'équilibre dans certains mécanismes de régulation tels que le système de coagulation et la balance cytokines anti/pro-inflammatoires. Ces dérégulations affectent les cellules non lésées en modifiant leur environnement et peut conduire à la mort de certains types cellulaires : c'est le cas des cellules endothéliales des micro-vaisseaux¹⁵. Cette mortalité indirectement radio-induite conduit à son tour à de nouvelles dérégulations comme des troubles vasculaires qui amplifient encore la réponse inflammatoire. Les rayonnements ionisants modifient donc le microenvironnement tissulaire et affectent indirectement les types cellulaires non exposés dans leur capacité de multiplication, de différenciation et/ou leur fonctionnalité¹⁶. Nous reviendrons de manière plus approfondie sur les effets tissulaires des RI dans la [partie I.C Effets secondaires des radiothérapies](#).

I.A.3.d. Effets déterministes et effets stochastiques

L'effet des rayonnements ionisants sur les cellules et les tissus est dépendant de la dose reçue. On distinguera les effets déterministes et les effets stochastiques (aussi appelés aléatoires ou

probabilistes). Les effets déterministes surviennent systématiquement au-delà d'une certaine dose seuil. Ils apparaissent rapidement et sont principalement la conséquence directe de la mort cellulaire radio-induite. La disparition de certains types cellulaires radiosensibles (théorie de la cellule cible) cause des effets reproductibles. Les effets stochastiques sont observés en dessous des doses seuils des effets déterministes, mais aussi au-dessus de ces seuils. Que l'exposition soit ponctuelle, continue ou répétée, ils apparaissent tardivement (plusieurs années plus tard), mais pas systématiquement. Pour ces effets, il existe uniquement une probabilité d'apparition qui augmente avec la dose reçue. Ils sont dus aux effets causés et conservés chez les cellules survivantes, comme par exemple des mutations cellulaires ou des aberrations chromosomiques.

Le seuil au-dessus duquel les effets d'une exposition deviennent déterministes est défini pour une dose efficace au cours d'une exposition globale. Cependant, la dose seuil est matière à controverse. L'UNSCEAR (*United Nations Committee on the Effects of Atomic Radiation*) définit des gammes de doses présentées dans le Tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3 : échelle de dose selon l'UNSCEAR.

Exposition TBI en Sv	Echelle de dose selon l'UNSCEAR
> 10	Très forte dose
2-10	Forte dose
0,2-2	Dose moyenne
0,02-0,2	Faible dose
0-0,02	Très faible dose

Les études épidémiologiques peinent à relier les effets de faibles doses d'exposition à l'apparition d'effets stochastiques. Pour le moment, les données disponibles ne permettent qu'une extrapolation à partir des données sur les fortes doses. L'extrapolation la plus courante est effectuée à partir des données issues des irradiés survivants de l'attaque d'Hiroshima. Les modèles permettant l'extrapolation de la dose seuil sont cependant controversés. Pour l'heure, chez l'adulte, aucun effet néfaste n'a été observé en dessous de 200 mSv. Chez l'enfant, la dose seuil considérée est de 100 mSv. On retiendra qu'en dessous de 100 mSv, considérée comme une exposition à faible dose, aucune étude n'a révélé l'apparition d'effets déterministes ou stochastiques)¹⁷.

A l'échelle d'un organisme, les effets de l'irradiation dépendent aussi du volume et de la localisation de la zone irradiée. On distingue ainsi l'irradiation corps entier (TBI) et les irradiations localisées. Chez les Humains, les irradiations TBI sont observées lors d'accidents, d'utilisation d'armes atomiques ou en clinique avant une greffe de moelle osseuse. Ils sont donc plutôt rares. Les irradiations localisées, quant à elles, sont beaucoup plus fréquentes. Elles sont notamment observées lors de l'utilisation des RI à des fins médicales.

I.B. Application médicale : la radiothérapie

La découverte des RI a rapidement débouché sur des applications médicales telles que l'imagerie par radiographie et le traitement d'affections par l'exposition à des doses plus ou moins modérées de RI. Les effets biologiques des RI ont été exploités avec succès dès le début du XXème siècle dans le traitement des cancers. Aujourd'hui encore, l'arsenal thérapeutique utilisé en oncologie tire parti des propriétés des RI dans les traitements connues sous le nom de radiothérapies. L'incidence mondiale des cancers est sans cesse en augmentation. Un nombre croissant de personnes est donc traité par radiothérapie. Ce traitement utilise une exposition localisée, mais il peut engager des tissus sains. Il constitue donc une opportunité d'étudier les effets de l'irradiation à forte dose sur les tissus sains.

I.B.1. Usages et principes

I.B.1.a. Utilisation

Les cancers figurent parmi les principales causes de morbidité et de mortalité à travers le monde. L'OMS a estimé à 14 millions le nombre de nouveaux cas de cancers en 2012¹⁸. En France, le nombre de nouveaux cas de cancers est estimé à 385 000 en 2015¹⁹. Il existe de nombreux types de cancers, cependant 4 d'entre eux représentent 50 % des cas en France. Ces affections graves et de longue durée touchent principalement la prostate chez l'homme (28 % des cas), le sein chez la femme (31 % des cas), le colon-rectum (12% des cas), et le poumon (14 % des cancers chez l'homme, 7 % chez la femme). Les protocoles anti-tumoraux mettent en jeu des techniques telles que la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie, souvent utilisées en combinaison pour augmenter les probabilités de réussite.

La radiothérapie (RT) est une technique locorégionale de traitement des cancers. Elle permet le contrôle tumoral par stérilisation de la tumeur. Son action repose sur les propriétés des rayonnements ionisants à haute énergie. Dans le monde, 52 % des patients traités pour un cancer reçoivent une radiothérapie²⁰. En France, en 2015, 198 168 personnes ont reçu une radiothérapie pour le traitement de leur cancer²¹. La sphère abdomino-pelvienne, la zone ORL et la zone thoracique sont les 3 principales aires d'application. On distingue 3 usages de la radiothérapie : curative, palliative et symptomatique. La RT curative a pour objectif le contrôle et idéalement la stérilisation de la tumeur. La RT palliative est délivrée lorsque le cancer est trop avancé pour traiter le malade. Son objectif est de soulager la douleur. La RT symptomatique vise à résoudre un symptôme particulier en recherchant un effet antalgique, hémostatique ou décompressant. Les RT peuvent être délivrées selon 3 techniques : la RT externe (dont la RT de contact), la curiethérapie et la RT métabolique. La curiethérapie (aussi appelée brachythérapie) utilise une source radioactive scellée qui est mise directement en contact ou à proximité de la zone à traiter (exposition de contact). Elle

est couramment utilisée pour les cancers du col de l'utérus, de la prostate, du sein et de la peau. La RT métabolique consiste en l'introduction par voie orale ou sanguine de sources non scellées (exposition interne). On utilise les propriétés des radioéléments à diffuser dans l'organisme et à se concentrer dans certains organes. La radiothérapie externe représente plus de 90 % des prises en charges²¹. Cette technique met en jeu des sources de RI situées à l'extérieur du corps. Les RI proviennent majoritairement d'accélérateurs linéaires produisant des rayons X ou des électrons. Ils sont dirigés en faisceau vers la tumeur. Les RI traversent la peau et les organes sains, et l'énergie est déposée au niveau de la tumeur. La difficulté de cette technique consiste à déposer une dose maximale de rayonnement au tissu cancéreux tout en minimisant la dose aux tissus sains.

I.B.1.b. Stérilisation de la tumeur : dose de contrôle tumoral et atteintes aux organes à risque

L'objectif de la RT est de provoquer la mort des cellules cancéreuses. La RT n'est pas un traitement spécifique des cellules cancéreuses. Cependant, la prolifération rapide des cellules tumorales et la disparition des points de contrôle du cycle cellulaire les rendent plus radiosensibles. On admet que la cible des RI est l'ADN et que l'effet recherché est une cassure double-brin. Elle aura pour conséquence la mort mitotique ou l'apoptose des cellules tumorales. Le succès d'un traitement anticancéreux par RT dépend principalement de la dose délivrée à la tumeur. Cependant, le défaut de spécificité des RI oblige les radiothérapeutes à prendre en compte la tolérance des tissus sains environnant la tumeur. La dose utilisée pour traiter un cancer est donc un compromis entre la dose à atteindre pour stériliser la tumeur et la dose seuil à partir de laquelle un impact sur les tissus sains est observé (notion de balance bénéfique/risque). Les protocoles de RT prennent donc en compte des paramètres inhérents à la tumeur (type, localisation, volume, extension et stade de développement), mais aussi des tissus sains environnants (structure des tissus, présence de types cellulaires radiosensibles).

Pour stériliser la tumeur, la dose à atteindre est dite dose de contrôle tumoral. C'est la dose nécessaire pour obtenir dans 90 % des cas la stérilisation locale définitive de la tumeur. Cette dose est fixée empiriquement. Parmi les facteurs qui la déterminent, on retrouve le type histologique, le volume et l'aspect de la tumeur. Le type histologique permet une première définition de la dose. Une dose comprise entre 80 et 90 Gy suffit pour stériliser la majorité des tumeurs. Plus le volume tumoral est important, plus la dose doit être élevée. Enfin, l'aspect végétant ou infiltrant de la tumeur, qui donne des informations sur sa vascularisation, peut influencer le choix de la dose prescrite.

Les organes sains présents dans la zone avoisinant la tumeur sont nommés organes à risques (OAR). Leur radiosensibilité est le premier paramètre limitant à prendre en compte. La dose de tolérance

des OAR limite la dose nécessaire à la stérilisation de la tumeur. La radiosensibilité varie beaucoup entre les différents organes : elle est notamment fonction des types cellulaires qui les composent. Ainsi, la moelle osseuse qui abrite les cellules souches hématopoïétiques est très radiosensible. Une faible dose de RI, de l'ordre de quelques Gy, peut détruire ces cellules dont le renouvellement est très rapide. A l'inverse, des organes dont les cellules ont un cycle cellulaire beaucoup plus lent comme le système nerveux central peuvent supporter des doses de plusieurs dizaines de Gy. La nécessité vitale du maintien de la fonctionnalité d'un organe doit aussi être prise en compte dans le calcul de la dose de tolérance des OAR. En effet, il faut distinguer les organes dont le maintien de la fonction est vitale (comme le cœur ou les poumons) et ceux dont la perte ou le défaut de fonction, bien qu'impactant sur la santé du patient, ne relève pas du pronostic vital (comme l'intestin, l'os ou l'œil). L'organisation (en série ou en parallèle) des organes entre aussi en jeu. Dans des organes en série comme le tube digestif, la destruction d'une sous-unité entraîne directement l'arrêt de la fonction. A l'inverse, des organes doubles ou en structure parallèle comme les poumons ou les reins seront affectés par les RI, mais une irradiation localisée n'empêchera pas la fonctionnalité générale du système²².

L'objectif des RT est de réussir à éradiquer la tumeur tout en préservant la fonctionnalité des OAR. Leur délivrance doit se situer à l'équilibre entre la dose de contrôle tumorale et la dose seuil de sensibilité des OAR environnants. Le radiothérapeute dispose d'une étroite fenêtre thérapeutique (voir [Figure 3](#)) où cet équilibre est maintenu.

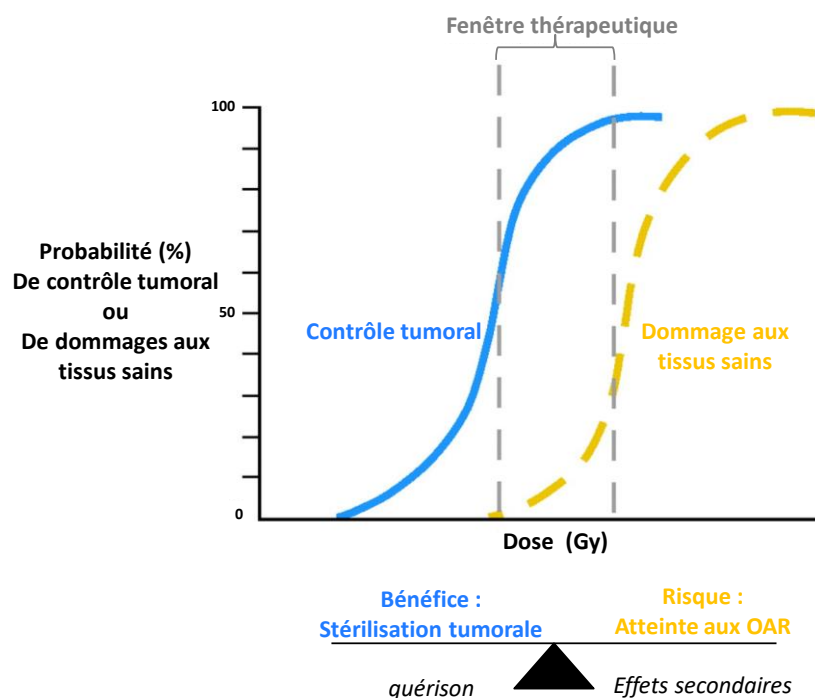


Figure 3 : utilisation des RI dans le traitement de cancers : balance bénéfice risque et fenêtre thérapeutique (d'après Brizel *et al.*²³).

Des techniques de sensibilisation de la tumeur ou de protection des tissus sains permettent d'élargir cette fenêtre afin d'optimiser le contrôle tumoral et d'amoindrir les effets secondaires. Les protocoles utilisés en RT tendent systématiquement à maximiser l'effet des RI sur les zones tumorales tout en minimisant les dommages aux OAR. A ce titre, la planification des RT, la caractérisation de la tumeur et l'établissement d'un plan de traitement spécifique et adapté à chaque patient jouent un rôle primordial dans le succès des RT.

I.B.2. Protocoles et techniques

I.B.2.a. Volume cible

Lors d'un protocole de RT, on définit plusieurs volumes. Le GTV et le CTV tiennent compte de la tumeur et le PRV tient compte de la tumeur et des organes à risque environnants. Le GTV (*Gross Tumour Volume*) est le volume de la tumeur tel qu'il est défini par les outils d'imagerie médicale, par observation directe ou palpation. C'est la zone où la densité des cellules tumorales est maximale. Le CTV (*Clinical Target Volume*) comprend le GTV plus une marge. Il correspond aux extensions moyennes des tumeurs autour du GTV qui ne peuvent pas être identifiées directement. Dans le CTV, on retrouve de faibles concentrations tumorales dues à des micro-extensions des cellules malignes individualisées ou de petits clusters tumoraux. Le PTV (*Planning Target Volume*) est un concept géométrique qui rend compte du volume effectif dans lequel la dose sera délivrée. Il s'agit d'un volume plus technique qu'anatomique : il vise à s'assurer que la dose nécessaire sera bien déposée dans le CTV. Il peut donc en partie être extérieur au corps du patient. Le PTV tient compte des mouvements (volontaires ou naturels) du malade qui définissent une marge interne (IM : *Internal Margin*). Il tient aussi compte de la variabilité du dépôt de dose entre chaque séance due aux variations dans le placement des patients, la précision de l'appareil, le degré d'expérience des manipulateurs (SM : *Set-up Margin*). Dans certains cas, on utilise le PRV (*Planning organ at Risk Volume*). C'est une marge d'incertitude autour des OAR. Elle permet de détourner une partie d'un organe à risque et d'intégrer cet organe comme une zone à éviter dans la définition du PTV. Elle matérialise le dilemme entre la dose de contrôle tumorale à atteindre au niveau du CTV et la dose délivrée par le PTV aux OAR²⁴.

I.B.2.b. Fractionnement et étalement

Le facteur temporel est vite apparu dans l'histoire de la RT comme une solution de choix pour limiter les effets secondaires. Il doit être approché de 2 manières : l'étalement du traitement et son fractionnement. L'étalement du traitement dans le temps permet aux tissus à prolifération rapide, et donc aux OAR, une meilleure récupération et une diminution des effets secondaires. Cependant, la plupart des tumeurs malignes prolifèrent rapidement et sont donc protégées par une augmentation

de l'étalement²⁵. Le fractionnement (ou dose par fraction) correspond à la dose de RI délivrée à chaque séance de RT. De manière empirique, il est connu que la délivrance de fortes doses par fractions (hypofractionnement) impacte fortement les tissus sains et entraîne des complications tardives. A l'inverse, le fractionnement modéré (dose de 1,8 à 2 Gy/fraction) limite les effets aux tissus sains à renouvellement lent et donc les réponses tardives. De manière empirique, la plupart des protocoles de RT utilisent des fractions de 1,8 à 2 Gy une fois par jour, à raison de 5 séances par semaine²⁶.

Des études *in vitro* ont permis de modéliser la survie cellulaire suite à une exposition aux RI. La comparaison des effets des RI peut être évaluée par l'Efficacité Biologique Relative (EBR). L'EBR est une grandeur adimensionnelle. Elle sert à comparer les effets biologiques de deux rayonnements ou deux modalités d'irradiation. Le rayonnement γ du cobalt 60 est classiquement utilisé comme référence. L'EBR est le rapport des doses de deux rayonnements ou modalités produisant le même effet biologique. Cette grandeur est utilisée pour prédire les effets biologiques des rayonnements et notamment ceux des protocoles de RT. Les effets biologiques étudiés sont souvent des effets relatifs à la mort ou à l'arrêt de la division cellulaire, en lien avec l'endommagement, la réparation de l'ADN et l'instabilité génomique. Par exemple, si sur une population cellulaire donnée, une dose de 1 Gy du rayonnement testé provoque une mortalité cellulaire équivalente à 10 Gy du rayonnement de référence, alors l'EBR du rayonnement testé vaut 10. Le test de clonogénicité est de loin le plus courant dans l'évaluation des EBR. Il permet de calculer les fractions survivantes de lignées cellulaires irradiées *in vitro*. Ce test a permis d'établir des courbes de survie pour les différents rayonnements et les différents types cellulaires. La modélisation de la survie cellulaire a donné naissance successivement aux modèles dits de la relation linéaire sans seuil et linéaire quadratique.

L'un des modèles mathématique résultant des études de survie cellulaire est appelé modèle linéaire quadratique (LQ) (*Équation 1*). Il permet de rendre compte de la sensibilité des tissus (sains ou tumoraux) aux RI.

$$\text{Fraction Survivante } (S) = e^{(-\alpha D - \beta D^2)}$$

Équation 1 : modèle linéaire quadratique.

S: fraction survivante ; D : Dose (Gy) ; coefficient α : reflète la probabilité d'une lésion directement létale ; coefficient β : reflète la probabilité d'une lésion sub-létale (indirectement létale).

Dans le cadre d'une dose fractionnée, l'équation est modifiée (*Équation 2*) Le rapport α/β exprimé en Gy donne une idée assez précise de la sensibilité au fractionnement. La valeur du rapport α/β est inversement proportionnelle à la sensibilité du tissu au fractionnement.

$$\text{Fraction Survivante } (S) = e^{(-\alpha nD - \beta nD^2)}$$

Équation 2 : modèle linéaire quadratique pour les doses fractionnée.
n: nombre de fraction ; D : dose par fraction.

Les tissus à prolifération rapide ont un rapport α/β supérieur à 10 Gy. Ils sont peu sensibles au fractionnement. Cela concerne les tissus sains, comme l'épiderme et les muqueuses, mais aussi les tissus tumoraux. Ces tissus sont les plus sensibles aux effets des RI à cause de leur prolifération rapide. Ils sont ainsi responsables des réponses précoces des tissus. Mais le fractionnement les rend moins sensibles. Cela soutient l'intérêt du fractionnement dans la limitation des effets aigus. A l'inverse, les tissus à prolifération lente comme les tissus d'origine mésenchymateuse (muscles, os...) ont un rapport α/β inférieur à 10 Gy, ils sont donc sensibles à la variation de dose par fraction (voir [Figure 4](#)). A dose équivalente, une irradiation fractionnée a donc davantage d'effets sur ces tissus, qui sont à l'origine de l'apparition des effets tardifs²⁷.

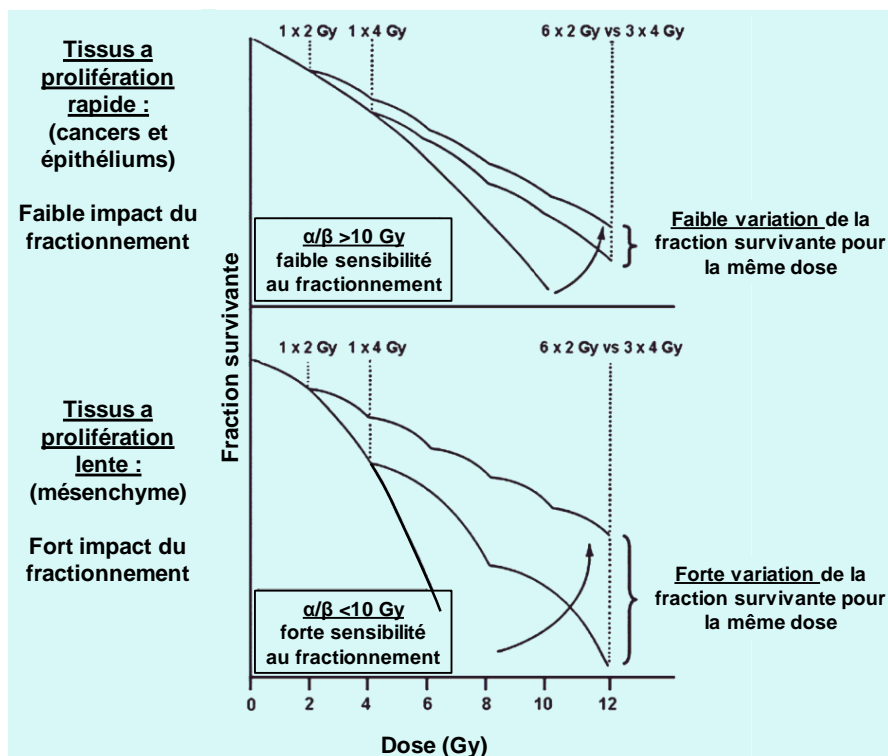


Figure 4 : illustration de l'influence du rapport α/β dans le modèle LQ, cas du fractionnement (d'après Shrieve *et al.*²⁶).

Le modèle linéaire quadratique et l'EBR sont utilisés pour estimer les effets des plans de RT. Mais des éléments suggèrent cependant que le LQ n'est pas un modèle idéal pour les faibles et fortes doses par fraction²⁸. Par exemple, le LQ surestimerait l'effet des fortes doses par fractions (>2,2 Gy) sur la mortalité cellulaire. Les critiques se portent notamment sur les cancers du sein et de la prostate, pour lesquels de récentes études démontrent des rapports α/β inférieurs à 10 Gy. Cela remet en cause l'idée que les tissus tumoraux sont insensibles au fractionnement. La tentation de l'hypofractionnement est donc grande pour les radiothérapeutes, puisqu'elle permet de réduire le nombre de séances, et ainsi d'améliorer le confort du patient et de réduire les coûts. Cependant, les expériences d'hypofractionnement passées, soutenues par la relation linéaire sans seuil utilisée avant le LQ, ont été à l'origine d'effets secondaires particulièrement délétères sur les tissus sains²⁷⁻²⁹.

Comme on le verra dans la suite de ce mémoire (*partie I.B.2.c Outils*), les récents progrès balistiques permettent un bien meilleur détournement de la zone tumorale (GTV) et une plus grande précision dans la délivrance de la dose. Grâce à ces progrès, les OAR sont moins exposés, ce qui permet d'augmenter la dose par fraction. L'hypofractionnement est donc reconsidéré pour les traitements²⁹.

I.B.2.c. Outils

De multiples outils permettent de réaliser des RT externes (qui représentent 90 % des traitements par RT en France). L'objectif est le même : distribuer une dose maximale à la tumeur (dose de contrôle tumoral) tout en délivrant une dose minimale aux tissus sains.

Les RT modernes intègrent toutes une composante multi-faisceaux tridimensionnelle où les RI sont majoritairement produits via des accélérateurs. Les systèmes sont informatisés et robotisés. Ils permettent la délivrance de la dose prescrite avec toujours plus de précision. La méthode la plus utilisée est la RT dite conformationnelle en trois dimensions (3D-CRT). Cette technique permet une adéquation maximale entre le CTV et le PTV. Des techniques d'imagerie médicale (scanner, IRM, TEP) permettent l'acquisition la plus précise possible du GTV (et la définition d'un CTV) et la position des organes environnants. A partir de ces données, le trajet des rayons est simulé et le calcul de la distribution de dose est obtenu. L'imagerie couplée à la simulation 3D permet de délivrer des doses efficaces de RI tout en limitant l'exposition des OAR.

D'autres améliorations techniques permettent d'accroître la précision de la conformation des rayons émis. La RT conformationnelle avec modulation d'intensité (IMRT) utilise des faisceaux d'intensité ou de fluence différentes (non homogènes en doses) afin de mieux détourner le volume tumoral et de minimiser la dose aux OAR. La fluence est ajustée en temps réel grâce à un collimateur multilames. De plus en plus déployée, l'IMRT devrait devenir la RT la plus courante³⁰. La RT guidée par l'image (IGRT) permet de réajuster le faisceau des rayons soit entre deux séances, soit en temps réel. En effet, d'année en année, le détournement tumoral s'affine et donc le volume irradié est de plus en plus faible. Cela augmente la probabilité de manquer la tumeur suite à un mauvais positionnement ou des mouvements du patient, et donc de délivrer une dose aux tissus sains. Des protocoles d'imagerie comme les *cone beam CT scans* permettent une meilleure répétition balistique et sont particulièrement utiles dans le traitement des cancers ORL et de la prostate³¹. La 3D-CRT complétée par l'IMRT et l'IGRT est donc le système de RT le plus abouti disponible en clinique à ce jour. Il existe cependant des variantes adaptées à certains cas particuliers. Le dynamisme de l'innovation technologique, allié à d'importants moyens mis en places (plan Cancer) constituent un terrain fertile au développement de ces techniques de pointe.

- La RT stéréotaxique (SBRT : *Stereotaxic Body Radiotherapy*) est utilisée avec un faible fractionnement, voire en une seule fois (radiochirurgie), pour éradiquer de petites tumeurs bien définies. On utilise de fortes doses, qui peuvent donc facilement endommager les tissus sains environnants. Cependant, le volume étant faible, les effets aux OAR le sont aussi. Le système Cyberknife® est un bon exemple d'outil de SBRT.
- La Tomothérapie® est un système 3D-CRT en IGRT et couplé IMRT. Cette technique de RT est guidée par l'image via un scanner haute définition. L'accélérateur de particules, miniaturisé, se déplace en spirale autour du patient et permet de moduler la dose délivrée. Ce système très précis est utilisé pour les tumeurs de la sphère ORL, où la topographie rend la planification du traitement complexe.
- En plus de la modulation d'intensité (IMRT), les progrès robotiques et informatiques, surtout au niveau de la simulation, permettent le déplacement de l'accélérateur pendant que la dose est délivrée. On parle d'arthérapie (VMAT : *Volumetric Modulated Arc Therapy*). Ce système met à profit la vitesse du bras de l'accélérateur lors de son déplacement pour moduler la dose (dans les autres systèmes, l'accélérateur est fixe lors de l'émission des faisceaux).

De nouvelles techniques émergent encore pour améliorer les traitements par RT. On peut évoquer le changement de débit de dose permettant de délivrer une dose de plusieurs dizaines de Gy en moins d'une seconde (10^2 – 10^9 Gy/s) quand les RT classiques ne délivrent en général que 10^{-3} – 10^{-1} Gy/s. Cette technique de « Flash irradiation », encore à l'étude, permettrait de réduire les effets secondaires des RT et notamment l'apparition de la fibrose³².

Au-delà des changements techniques, ce sont l'utilisation de RI de nature différente comme les hadrons qui suscitent actuellement l'intérêt en RT. L'hadronthérapie utilise des protons (protonthérapie) ou des ions lourds comme les ions carbones accélérés (carbonothérapie). Le haut TEL de ces particules permet un dépôt d'énergie plus ciblé dans la matière, ce qui offre de nouvelles opportunités dans la protection des tissus sains. L'EBR des ions carbones est aussi meilleur que celui des photons utilisés en RT classique. Plusieurs centres de RT disposent de ces technologies et plusieurs sont en construction à travers le monde. Cependant, même si l'hadronthérapie présente des avantages certains, son efficacité par rapport aux RT classiques et ses champs d'application (types de cancers à traiter) restent limités, compte tenu notamment du manque de recul sur la survie des patients et l'apparition des effets secondaires³³.

I.C. Effets secondaires des radiothérapies

Les RT sont donc une formidable opportunité de traitement des cancers. La maîtrise de la balance bénéfique/risque afin de limiter l'atteinte aux OAR reste une problématique majeure des traitements. Malgré plusieurs avancées techniques, notamment sur le plan balistique, l'atteinte aux tissus sains demeure génératrice d'effets secondaires aigus et chroniques. Nous détaillerons les principaux effets

des RI sur les tissus sains et verrons quels mécanismes peuvent entraîner l'apparition de lésion radio-induites aiguës et tardives.

I.C.1. Du concept de cellule cible à celui d'un continuum d'évènements

I.C.1.a. Concept de cellule cible : effets précoces et tardifs

Le concept de cellule cible, basé sur les travaux de Puck & Marcus publiés en 1956³⁴, a dominé la RT jusqu'au milieu des années 1990. Selon ce principe, les cellules cibles sont endommagées de manière irréversible par les RI via des atteintes de leurs mécanismes de réplication, ce qui provoque des dommages fonctionnels. Ce concept s'est avéré très utile car il a permis d'expliquer les réponses aiguës (atteintes du système hématopoïétique et spermogénique, réactions aiguës des épithéliums intestinaux et de l'épiderme). On a ainsi pensé que deux mécanismes étaient à l'origine des effets secondaires des RI : la perte directe de cellules du parenchyme (tissus fonctionnels) et la perte des cellules endothéliales vasculaires (par apoptose). Après une période de latence qui dure plusieurs mois à plusieurs années dite intervalle silencieux, les dommages tardifs se manifestent. Ils sont causés par la mort ou la dysfonction des tissus à prolifération lente avec des effets sur la fonctionnalité des organes. Ce concept a particulièrement contribué à l'émergence du modèle linéaire quadratique, et donc la pratique des protocoles de RT fractionnée. Cependant, le concept de cellule cible est incomplet, car il ne décrit pas correctement tous les effets tissulaires consécutifs à une irradiation. En effet, la mort des cellules n'est pas obligatoirement directement radio-induite, elle peut avoir lieu par effets *bystander* ou abscopaux. Le concept de cellule cible reste utile pour décrire en partie les effets précoces mais il explique mal les effets secondaires tardifs comme la fibrose ou le maintien de phénomènes inflammatoires chroniques. Il a notamment été découvert que l'intervalle silencieux usuellement décrit entre les effets précoces et tardifs était loin d'être silencieux. Très rapidement après irradiation, de très nombreuses cascades de cytokines sont activées et restent maintenues dans le temps. Bien que la mort des cellules cibles puisse avoir un rôle dans le déclenchement des effets secondaires, elle n'est pas la seule explication. Il est aujourd'hui certain que l'expression précoce des cytokines est au cœur d'une réponse biologique orchestrée. Cette réponse est sous le contrôle de multiples types cellulaires (stromal, inflammatoire, endothélial et parenchymateux), qui répondent ou sont sous le contrôle de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance radio-induits³⁵.

I.C.1.b. Un continuum complexe d'évènements

Les effets secondaires des RT sont nombreux et variés. Par le passé, on a souvent distingué les effets précoces des effets tardifs. Cette classification persiste encore aujourd'hui. Cependant, les effets secondaires d'une RT sont le fruit d'un continuum complexe d'évènements mêlant effets

déterministes et stochastiques, conséquences précoces aiguës et tardives chroniques, et mécanismes cellulaires et tissulaires, selon une cinétique et une signalisation complexes. Afin d'améliorer la compréhension des effets radio-induits aux tissus sains et d'y intégrer l'idée d'une continuité, Denham *et al.* ont proposé en 2001 une nouvelle classification en 3 catégories au lieu des 2 précédentes (précoce et tardive). Les auteurs proposent de distinguer les effets cytocides, indirects et fonctionnels. Ces trois types d'effets peuvent survenir indépendamment du temps³⁶. Certains phénomènes radio-induits sont les causes de plusieurs types d'effets cumulés, comme par exemple la fibrose et l'inflammation.

Les effets cytocides correspondent à ceux décrits par le concept de la cellule cible. Ils s'appliquent à la fois aux tissus à réaction précoce et aux tissus à réaction tardive. La disparition des cellules souches (compartiment progéniteur) d'un tissu à prolifération rapide entraîne un défaut de cellules fonctionnelles et différenciées (compartiment différencié). C'est le cas des épithéliums et de la moelle osseuse. Dans le cas des tissus à prolifération plus lente ou capables de relancer un cycle cellulaire, l'effet cytotoxique se manifeste lors de la division cellulaire. Dans les tissus à renouvellement rapide, les séquelles se manifestent cliniquement quelques jours après la première exposition, donc parfois pendant la RT entre les séances. Dans les tissus à renouvellement lent, l'effet cytotoxique est dormant et ne se manifeste que plusieurs mois ou années après l'exposition. Les effets indirects sont les phénomènes réactifs qui surviennent en réponse aux séquelles radio-induites dans d'autres cellules ou tissus. Les meilleurs exemples sont les effets *bystanders*, les cascades de cytokines radio-induites, les effets pro-coagulants et pro-inflammatoires. On connaît souvent ces effets sous le nom de mécanismes consécutifs à une exposition aux RI. Enfin, les effets fonctionnels sont ceux qui se conjuguent mal avec les deux catégories précédentes. Ils correspondent aux effets non létaux qu'ont les RI sur l'expression des gènes et molécules intra- ou extracellulaires.

1.C.2. Effets cytocides

Nous avons déjà décrit les effets directs des RI sur la cellule et détaillé leurs origines moléculaires (voir [pl.A.3.a Effets physico-chimiques et moléculaires](#)). En revanche, nous reviendrons sur l'effet cytocide des RI en nous intéressant à la mort des cellules endothéliales dans la [partie II.B.3.a.i Mort par les céramides page 62](#).

1.C.3. Effets indirects

1.C.3.a. Une cascade de cytokines radio-induites

Rapidement après une exposition aux RI, une cascade de cytokines et de chimiokines est initiée dans les tissus touchés. Elles perpétuent, augmentent et maintiennent la réponse inflammatoire dans le

temps. Elles participent à l'établissement possible d'une inflammation chronique responsable de lésions radio-induites.

Les cytokines sont un groupe fonctionnel de facteurs solubles qui jouent un rôle dans la signalisation cellulaire. On distingue des sous-groupes comme les chimiokines (facteurs chimiotactiques), les facteurs de croissance, les interférons et les interleukines. Ce sont des messagers puissants, qui sont exprimées transitoirement en réponse à un stimulus. Organisées en groupes interconnectés, elles sont capables de diriger des réponses cellulaires intégrées, en formant des réseaux complexes et imbriqués pour se renforcer ou s'opposer.

L'orchestration de ces réponses par les cytokines est permise par l'existence de groupes fonctionnels de cytokines qui évoluent dans le temps et dirigent les différents types de réactions :

- pro-inflammatoire : TNF- α , IL-1 α et β , IL-17, IL-6, IL-8
- vasculaire : VEGF, TNF- α , FGF
- anti-inflammatoire : IL-4, IL-10, TGF- β
- pro-fibrotique : IL-6, TGF- β
- immunitaire : IL-2, IL-4, IL-7
- hématopoïétique : CSF1, GM-CSF, IL-3, EPO

Ces groupes fonctionnels doivent être vus comme des réseaux interconnectés et interdépendants. En coordination avec d'autres systèmes moléculaires et cellulaires, ils orchestrent la réponse cellulaire. Ils agissent aussi pour orchestrer une réponse tissulaire en changeant les équilibres redox³⁷, en modifiant la matrice extracellulaire (MEC), l'adhésion, le cycle et la migration cellulaire³⁸⁻⁴⁰.

On remarque que les cytokines ont un haut degré de redondance fonctionnelle. Ainsi l'élévation d'une cytokine n'est pas forcément liée à une pathologie. En revanche dans certaines situations pathogéniques certaines cytokines dites « *key driver* » orientent la réaction. Par exemple en contexte inflammatoire, le TNF- α et l'IL-1 apparaissent toujours comme des cytokines clés. Les cytokines *key drivers* sont souvent prises pour cibles thérapeutiques car elles dirigent l'action de ces réseaux complexes de molécules.

I.C.3.b. Dualité du rôle des cytokines

Dans la réponse aux RI, les cytokines pro-inflammatoires sont très rapidement mobilisées et sont étroitement liées à la cinétique des ROS et NOS après irradiation. Les molécules radio-induites mettent en place, un circuit de rétrocontrôle à plusieurs niveaux (fonctions tissus / organes / cellules) qui perpétue la réponse radio-induite. La phase pro-inflammatoire persiste jusqu'à ce que les lésions perceptibles par l'organisme soient détectées comme résolues et/ou éliminées. Les cytokines anti-inflammatoires et les agents anti-oxydants agissent alors de concert pour restaurer l'homéostasie. La balance des forces pro- et anti-inflammatoires peut se déplacer de part et d'autre de l'équilibre

homéostatique jusqu'à longtemps après l'exposition, créant des vagues réactionnelles⁴¹. Une perte de contrôle de ces mécanismes conduit à une perte d'homéostasie et parfois à la mort. Il reste aujourd'hui difficile de mettre en évidence cet aspect dynamique.

I.C.3.c. Importance des effets hypoxiques et oxydants

I.C.3.c.i. Effets hypoxiques radio-induits

Après irradiation, un niveau important de ROS et de RNS persiste dans les tissus exposés, pendant des mois, voire des années après exposition⁴². La balance oxydative semble dérégulée et les cellules acquièrent donc un statut pro-oxydatif. Ce phénomène ne peut être expliqué par la seule radiolyse de l'eau. L'hypothèse la plus courante est que la machinerie mitochondriale est dérégulée et produit une quantité importante de ROS, menant ainsi à l'établissement d'un stress oxydant chronique⁴³. L'altération de la balance oxydante de la cellule peut survenir en conséquence ou indépendamment du statut hypoxique du tissu⁴¹. L'irradiation provoque généralement une hypoxie tissulaire qui est la conséquence des dommages vasculaires radio-induits. L'hypoxie tissulaire induit des facteurs comme HIF-1 α capables de modifier le microenvironnement tissulaire pour provoquer un état pro-oxydant et pro-inflammatoire. Dans une blessure normale, ces deux états sont bénéfiques car ils supportent la cicatrisation et l'angiogenèse, notamment par l'induction de facteurs comme le VEGF^{44,45}.

La production de radicaux libres et les changements dans les capacités anti-oxydantes du tissu peuvent aussi avoir une influence sur le recrutement des cellules immunitaires qui pourront à leur tour influencer le passage vers un état pro-oxydant^{42,46}. D'une part, les cellules recrutées vont à leur tour consommer l'oxygène présent, menant à une situation hypoxique exacerbée. Ce recrutement est donc générateur d'un état pro-oxydant dépendant du statut hypoxique du tissu. D'autre part, indépendamment du statut hypoxique des tissus, les leucocytes recrutés participent à l'induction d'un état pro-oxydant par libération de cytokines⁴⁷. La lésion radique est génératrice des cytokines pro-inflammatoires qui ensemble mènent à la génération de ROS et de RNS⁴⁸. Certaines cytokines et facteurs de croissance génèrent des ROS et ont aussi besoin de ROS pour leur activation. Inversement, les facteurs de croissance et les cytokines anti-inflammatoires comme le TGF- β , l'IL-10 et l'IL-4 tendent à inhiber les effets des ROS et RNS et démontrent des propriétés anti-oxydantes. Les réseaux de cytokines et l'état hypoxique générateur de ROS sont donc intimement liés dans les dommages aux tissus sains.

I.C.3.c.ii. Réponses coordonnées des cytokines et des radicaux libres

Les équilibres redox servent de pivots entre les effets pro- et anti-inflammatoires. Cela pourrait expliquer pourquoi les chélateurs de radicaux libres peuvent diminuer l'expression de cytokines pro-inflammatoires.

Même si la génération de ROS par la radiolyse de l'eau est faible en comparaison de ce que peut supporter la cellule, les RI peuvent induire indirectement des ROS par la génération de dommages aux mitochondries et l'activation des NOX (ou d'autres oxydases). La production secondaire de ROS due à des cytokines pro-inflammatoires peut conduire à des conséquences sérieuses : des hauts niveaux de production peuvent causer la mort cellulaire et perpétuer les dommages à l'ADN. Des niveaux bas activent les réseaux de signaux sensibles aux redox, comme ceux dirigés par le NF-κB et les MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*)^{49,50}. Ces voies de signalisation conduisent à la production de chimiokines pro-inflammatoires comme l'IL-8 (CXCL8) et MIP-2 (CXCL2), et de cytokines comme le TNF-α et l'IL-1^{51,52}. De manière intéressante, la signalisation par l'EGFR peut induire à la fois l'inflammation et les dommages à l'ADN par la génération de cytokines pro-inflammatoires⁵³, mais peut aussi participer à la réparation de l'ADN⁵⁴. Finalement, les cytokines peuvent altérer la radiosensibilité intrinsèque en influençant le destin de la cellule à travers la réparation de l'ADN, l'instabilité génomique, la prolifération cellulaire, la différenciation et la mort. Les ROS générés après irradiation ont une demi-vie courte mais des effets complexes en vertu de leurs liens avec les cytokines, la signalisation cellulaire et de nombreuses autres voies de signalisation. Ces ROS sont donc en général contrôlées par les suppresseurs de radicaux libres et des antioxydants. Par exemple, la superoxyde dismutase mitochondriale dépendante du Mn (MnSOD) est induite par NF-κB radio-induit. Elle agit pour supprimer les radicaux libres. Le complexe NRF2-Keap1 est dissocié par les changements de conditions redox. NRF2 libre peut agir via des facteurs de transcriptions AREs (*antioxidant response elements*). Il joue un rôle protecteur important car il limite la sur-activation de NF-κB et la production de cytokines pro-inflammatoires⁴¹.

I.C.3.d. Les cytokines participent avec les ROS à l'initiation et la résolution d'un signal de danger radio-induit.

Les tissus lésés expriment et relarguent des cytokines comme signal de danger. Ils émettent des molécules regroupées sous le nom de *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) similaires aux *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). L'ATP par exemple est relâché rapidement après irradiation, et influence les réponses cellulaires à travers l'activation des récepteurs purinergiques qui activent des flux de calcium⁵⁵. D'autres DAMPs peuvent être émis plus tard, en provenant de la mort des cellules ou d'actions des enzymes sur la MEC. Le type de DAMPs émis dans le temps renseigne sur la réponse obtenue⁵⁶. Les DAMPs se lient à leurs récepteurs PRR (*pattern recognition receptors*) et activent la synthèse de cytokines via des molécules adaptatrices. Les DAMPs peuvent ainsi induire le TNF-α, l'IL-1, les IFN-α/β et l'IL-10. C'est ainsi qu'ils activent les cascades de cytokines autonomes (auto-entretenues). Dans l'intestin irradié, les DAMPs et les PAMPs peuvent agir en cohorte pour transloquer des signaux via les PRR et activer la réponse immunitaire innée.

De nombreuses boucles d'auto-amplification à plusieurs niveaux et parfois rétro-contrôlées existent entre les DAMPS, les ROS et les cytokines. Elles prolongent la réponse aux RI bien après l'exposition. Les conséquences seront les dommages vasculaires, l'accumulation de fluides intestinaux, l'infiltration de cellules inflammatoires, et la création de lésions avec un microenvironnement pro-oxydant. Tous ces phénomènes aboutissent à la création d'une « zone de danger » étendue dans l'espace et maintenue dans le temps. La conséquence de cette zone de danger est la maturation des cellules dendritiques (DCs), qui acquièrent la capacité de présenter des antigènes, ce qui permet à la réponse immunitaire adaptative de se développer. Enfin, d'autres conséquences peuvent être le développement d'effets à distance (*bystanders*)⁵⁷.

I.C.3.e. Effets pro-coagulants et pro-inflammatoires

Le réseau vasculaire joue un rôle central dans l'initiation et la propagation des lésions radio-induites⁵⁷⁻⁵⁹. Nous détaillerons les effets des RI sur le tissu endothélial vasculaire en *partie II.B Rôle de l'endothélium dans la propagation des lésions radio-induites* et en particulier les effets pro-coagulants et pro-inflammatoires.

I.C.3.f. Complexité des effets indirects

Les RI induisent l'expression de nombreuses cytokines comme TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , type-I IFN, GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 et IL-18, VEGF, bFGF et TGF- β . Beaucoup apparaissent de manière immédiate ou précoce. On peut donc les qualifier de radio-induites. Cependant, la régulation des cytokines est complexe, et les stimuli extérieurs ainsi que les réactions de l'hôte sont sources de variabilité. Cela pose la question de ce qu'est vraiment une cytokine radio-induite. Des doses de l'ordre de 7-10 Gy suffisent en général à activer la réponse pro-inflammatoire médiée par NF- κ B⁶⁰, mais des doses plus faibles peuvent s'avérer suffisantes⁶¹. La force du signal et son maintien jouent un rôle important dans les effets provoqués. L'implication et l'impact de chaque cytokine varient en fonction du type cellulaire et du temps. Mais il est évident que les cytokines, les ROS et les DAMPs se renforcent mutuellement dans le temps. On constate logiquement que les cytokines sont exprimées quelques minutes après l'exposition et que leur réexpression peut survenir en vagues un long moment après. Ces vagues de réponses sont observées dans de nombreux tissus et modèles suite à des RI⁶². Cela soutient l'hypothèse selon laquelle de nombreux effets précoces et tardifs des RI peuvent être médiés par des cytokines⁴¹.

I.C.4. Effets fonctionnels : le cas de la réponse immunitaire

La biologie des tissus normaux irradiés est intimement liée à l'inflammation et l'immunité à travers les PRRs et les ROS. Les cytokines inflammatoires sont produites en grande quantité lors de fortes

expositions. De fortes doses promeuvent également la génération de réponses spécifiques à la tumeur⁶⁰.

Les RI peuvent induire des effets secondaires par activation des cellules de l'immunité innée et acquise. Le système immunitaire est conçu pour surveiller constamment les signaux de dangers et agir rapidement. A ce titre, les premiers effecteurs sont les macrophages. La cascade de cytokines et de chimiokines radio-induites guide par la suite le reste du système immunitaire vers une élimination du danger. Pour ce faire, les cytokines anti-inflammatoires et anti-fibrotiques concourent à rétablir l'homéostasie afin d'atteindre un état permettant la cicatrisation^{41,57,60}. Les DAMPs radio-induits transmettent un signal immunogène aux cellules résidentes, circulantes et à la moelle osseuse. D'autre part, l'irradiation provoque l'apparition d'un stress oxydant sévère caractérisé par l'augmentation intracellulaire de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier joue le rôle de messenger secondaire qui régule l'activation des lymphocytes, macrophages et des cellules de la moelle osseuse.^{59,63} L'activation immunitaire peut être un facteur limitant pour la délivrance des RT. Au niveau thoracique, elle peut participer à l'apparition de fibrose et de pneumonies⁶⁴. Au niveau intestinal, elle exacerbe la réaction inflammatoire⁶⁵. Parmi les cellules immunitaires impliquées dans ces réactions, on retrouve les macrophages M1 et M2, les lymphocytes T *helpers* et T régulateurs(Th/Tregs) et NKT, et les cellules dendritiques⁶⁵.

Un facteur décisif de la réponse des tissus est la polarisation des macrophages vers les types M1 ou M2. Le type M1 semble promouvoir une inflammation aiguë et immunogène, alors que le type M2 possède un phénotype immunosuppresseur et est impliqué dans la cicatrisation des tissus. Des facteurs interindividuels, et notamment génétiques, entrent en jeu dans la différenciation des macrophages et conditionnent l'issue de la réponse des tissus. Cette différenciation joue un rôle dans la transition d'un état pro-inflammatoire et pro-oxydant vers un état anti-inflammatoire et antioxydant. Les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , GM-CSF, IFN- γ) et les LPS (lipopolysaccharides) génèrent des macrophages activés de type 1 (M1). Ces derniers sont les médiateurs d'une inflammation aiguë. A l'inverse, les cytokines IL-4, IL-13, IL-10, TGF- β et les complexes immuns promeuvent l'émergence des macrophages de type 2 (M2). Ils participent à l'angiogenèse et à la fibrose. Le type M2 est généralement considéré comme immunosuppresseur. Les macrophages M1, prédominants pendant la phase inflammatoire aiguë, se différencient en M2 pour effectuer l'angiogenèse et la réparation tissulaire. L'issue des complications des RT pourrait dépendre de la capacité des macrophages à effectuer cette transition. Elle pourrait être génétiquement déterminée⁶⁶. Ces 2 types de macrophages agissent en partenariat avec les lymphocytes T : Th1 avec M1 et Th2/Treg avec M2^{41,60}.

Parmi les DAMPs libérés par les cellules irradiées, on trouve les protéines de choc thermique (HSP: *heat shock proteins*) et les HMGB1 (*High mobility group box-1*) capables d'activer les cellules dendritiques (DC). Ces dernières sont capables de stimuler à leur tour les lymphocytes. La maturation des DC leur permet de présenter l'antigène de la zone lésée (saine ou tumorale) aux lymphocytes T naïfs (Th₀) pour induire leur différenciation en lymphocytes T effecteurs⁶⁷. Les Th₀ se différencient en différents types (Th1, Th2, Th17 ou iTregs) selon une stimulation cytokinique bien précise. Trois types de lymphocytes T activés nous intéressent plus particulièrement dans la réponse à l'irradiation : les Th1, Th2 et Treg. Les Th1 sont induits par IL-12 : ils produisent les cytokines IFN- γ , GM-CSF et TNF- α , et coopèrent avec les lymphocytes T CD8+ et les macrophages M1. Les Th2 sont induits par l'IL-4 et produisent IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 et IL-25. Ils coopèrent avec les macrophages M2 et les lymphocytes B. Les Tregs existent sous 2 formes, naturelle (nTreg) ou induite (iTreg). Les iTregs sont induits par le TGF- β et l'IL-2. Ils sécrètent l'IL-10 et le TGF- β , et collaborent avec les macrophages M2 et les Th2. Cette collaboration s'oppose diamétralement à l'action des cellules M1 et Th1. La polarisation des lymphocytes T est due à la balance des cytokines pro- ou anti- inflammatoires, dont le pivot semble être la balance redox⁴¹. L'activation immunitaire radio-induite est résumée dans le cas de l'intestin en

Figure 5.

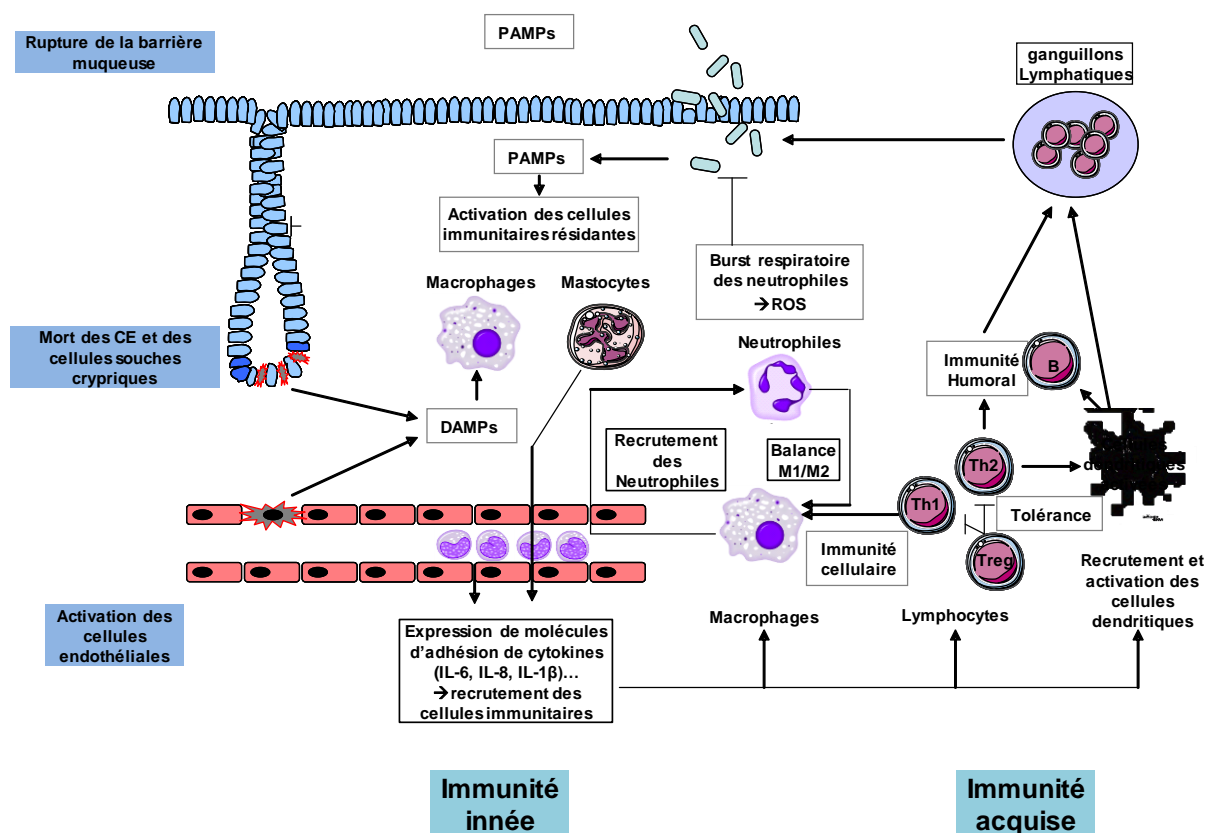


Figure 5 : illustration de l'importance de la réponse immunitaire acquise et innée dans les dommages radio-induits à l'intestin (d'après⁵⁸).

Au niveau intestinal, l'irradiation induit l'apoptose des cellules souches des cryptes, la mort clonogénique des cellules épithéliales, l'apoptose des CE et l'activation des CE survivantes, et enfin la rupture de la barrière muqueuse. Réponse

immunitaire innée : les cellules immunitaires résidentes comme les macrophages et les mastocytes sont activées par les DAMPs issus de la mort des cellules et par les PAMPs issus de la rupture de la barrière muqueuse, les CE activées expriment des molécules d'adhésion et des cytokines favorisant le recrutement des cellules immunitaires dans le tissu lésé ; les macrophages activés augmente le recrutement des neutrophiles qui en retour émet des signaux favorisant le recrutement des monocytes sanguins. **Réponse immunitaire acquise** : les Th1 peuvent activer les cellules immunitaires et favoriser l'immunité cellulaire ; les Th2 en revanche favorisent l'immunité humorale via les lymphocytes B ; dans les tissus intestinaux, la balance est en faveur des Th2 ; les Treg maintiennent la tolérance immunitaire ; les cellules dendritiques résidentes et recrutées sont activées, en pénétrant dans les ganglions lymphatiques ; elles permettent le déclenchement d'une réponse immunitaire spécifique.

I.C.5. La fibrose radio-induite, un exemple d'effets cumulés

I.C.5.a. Une cicatrisation pathologique

La fibrose est sans doute le phénomène le plus connu et le plus étudié parmi les effets tardifs des RT. Au niveau des organes touchés, la fibrose radio-induite se traduit par une accumulation de protéines de la MEC et de collagène. Elle intègre également une composante inflammatoire chronique. Le RFS (*radiation fibrosis syndrome*) peut affecter tous les types tissulaires. Les manifestations cliniques de ces syndromes peuvent prendre des années. La fibrose est responsable de dommages fonctionnels aux organes qui peuvent conduire à d'importantes modifications de la qualité de vie ou à la mort. La fibrose radio-induite est comparable à une cicatrisation incomplète. Dans ce processus, les fibroblastes jouent un rôle important.

La cicatrisation classique est régulée par une balance complexe entre protéines pro- et anti-fibrotiques. Schématiquement, le TGF- β , pro-fibrotique, s'oppose aux effets anti-fibrotiques du TNF- α et de l'interféron- γ (IFN- γ). Cette cicatrisation normale fait intervenir les effecteurs de l'immunité : macrophages producteurs de TNF- α et lymphocytes T sécréteur de l'IFN- γ . L'équilibre entre les forces pro- et anti-fibrosantes dirige un processus cicatriciel en deux temps. Dans un premier temps, les fibroblastes résidents sont différenciés en myofibroblastes, ces derniers vont sécréter de la MEC. Dans un deuxième temps, la MEC et les myofibroblastes sont éliminés au profit du tissu original qui est régénéré lors du processus cicatriciel.

I.C.5.b. Dynamique fibrotique

Les phases précoces de la fibrose radio-induite s'apparentent à une cicatrisation normale. Elles débutent par une augmentation des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6, et par la synthèse de facteurs de croissances. Des chimiokines sont sécrétées et participent au recrutement des cellules inflammatoires dans le volume irradié. On note la présence d'infiltrats inflammatoires avec la présence de macrophages³⁵. La différenciation myofibroblastique est initiée et associée à une production excessive et à un dépôt de protéines de la MEC et de collagène. Parmi les facteurs sécrétés qui dirigent la fibrose, le TGF- β est produit par une grande variété de cellules inflammatoires, mésenchymateuses et épithéliales. Il induit la conversion des fibroblastes et d'autres cellules en myofibroblastes producteurs de MEC et à l'origine du processus fibrotique. En effet, leur

activation chronique due à la dérégulation des facteurs pro/anti fibrotiques et à l'inflammation chronique va générer une production excessive de MEC et transforme la réaction de cicatrisation en fibrose⁶⁹.

I.C.5.c. Rôle des cytokines et des ROS

Le TGF- β joue un rôle particulier dans le processus fibrotique radio-induit. Cette cytokine multifonctionnelle très fortement profibrotique est impliquée dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques⁷⁰. Le TGF- β est excrété sous forme latente combinée au LAP (*latency associated peptide*). Il existe ainsi une grande quantité extracellulaire de TGF- β mobilisable mais non actif⁷¹. Les RI sont un des seuls évènements connus pour activer directement, en moins d'une heure et à faible dose, le TGF- β extracellulaire latent⁶¹. Par liaison à ces récepteurs TGF- β R1 et TGF- β R2, le TGF- β activé active la voie Smad agissant sur les promoteurs de nombreux gènes induisant la fibrose, la transition endothélium-mésenchyme, la prolifération fibroblastique, et la différenciation myofibroblastique³⁵.

Même si le TGF- β est une cytokine clé, il agit de concert avec d'autres molécules impliquées dans le processus fibrotique radio-induit. Le TGF- β régule ainsi EGF, FGF, TNF- α et IL-1, en stimulant ou inhibant leur production dans de nombreux types cellulaires (fibroblastes, cellules endothéliales, muscles lisses). Cela fait interagir des réseaux complexes de cytokines impliquées dans la fibrose radio-induite tels que IL-1, IGF-1 et TNF- α ⁶⁹. D'autre part, l'homéostasie des ROS et RNS influence la fibrose. La SOD, une enzyme anti-oxydante primordiale dans la régulation de l'équilibre redox, joue ainsi un rôle dans la pathologie de la fibrose⁷².

I.C.6. Une cicatrisation complexe

Lors de la RT, la réaction des tissus sains peut être vue comme régie par deux processus évoluant simultanément et interagissant entre eux. Le premier processus s'apparente à une cicatrisation ; le second est un ensemble d'altérations transitoires, permanentes voire intermittentes qui proviennent autant du tissu touché que du reste de l'organisme. Le plan de traitement fractionné utilisé classiquement en RT complexifie la compréhension de la lésion radio-induite. En effet, le tissu est soumis à des doses répétées et à une accumulation de doses pendant sa cicatrisation.

A la différence d'un trauma classique, la blessure radio-induite met en jeu la génération de radicaux libres (voir [I.A.3.a Effets physico-chimiques et moléculaires](#)) et des dommages à l'ADN (voir [I.A.3.b Effets cellulaires](#)). Ces deux composantes participent à une cicatrisation étalée dans le temps. Cet argument ne joue pas en faveur du fractionnement qui multiplie la génération de ROS, et ainsi de dommages à l'ADN et aux macromolécules biologiques. Ces dommages induisent le recrutement et l'activation de cellules circulantes (voir [II.B Rôle de l'endothélium dans la propagation des lésions](#)

radio-induites), stimulées et mobilisées à plusieurs reprises. Le fractionnement mobilise autant qu'il interrompt les processus physiologiques et physiopathologiques⁷³. L'ensemble des mécanismes à l'échelle moléculaire, cellulaire et tissulaire est résumé et replacé dans une chronologie simplifiée en *Figure 6*.

Nous verrons qu'un des premiers effets de la blessure radio-induite se situe au niveau de l'endothélium vasculaire. La mort des cellules endothéliales et l'activation du système de coagulation établissent un phénotype pro-coagulant et pro-inflammatoire. Ce phénotype promeut le recrutement des thrombocytes et érythrocytes générateurs de thrombose. L'expression des cytokines par les tissus et l'endothélium, et de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales, influence l'activation et l'infiltration des leucocytes dans les tissus lésés. Le statut hypoxique, notamment provoqué par l'effondrement des structures vasculaires, peut exacerber et chroniciser ces réactions. Cette chronicité est soutenue par l'établissement de boucles et de vagues de cytokines et l'activation du système immunitaire inné par les générations de DAMP. Le processus cicatriciel défaillant, l'infiltration leucocytaire et le statut pro-oxydant qui persistent dans le temps conduisent à des ulcérations tissulaires, aux processus fibrotiques et, dans certains cas, à la nécrose.

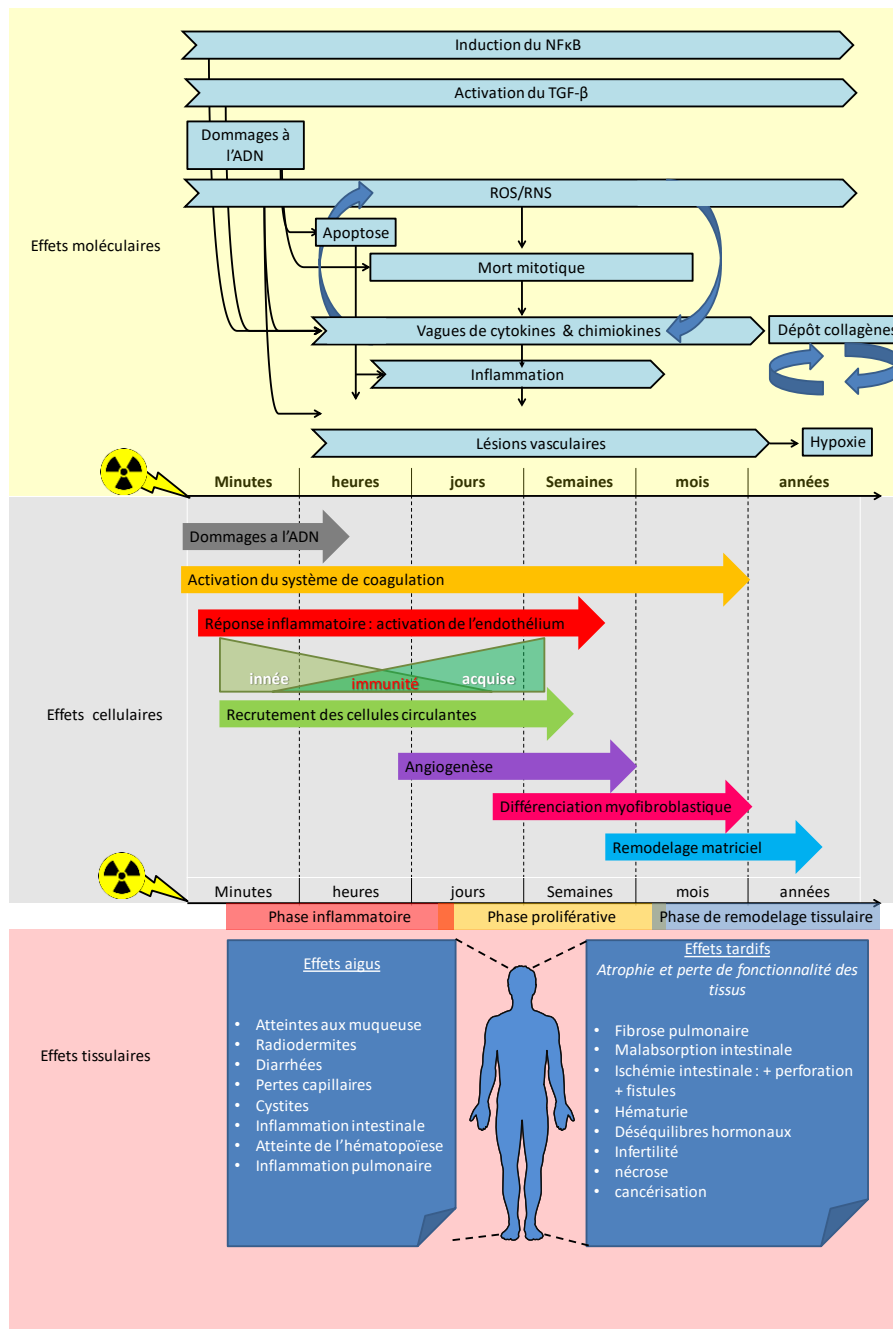


Figure 6 : dynamique des dommages aux OAR (d'après^{35,46}).

Au niveau des OAR, les effets secondaires mettent en jeu des mécanismes complexes dont la genèse et le maintien ne sont pas totalement élucidés. Cependant, le réseau vasculaire et plus particulièrement l'endothélium semble impliqué dans la propagation des lésions radio-induites. Plusieurs travaux, dont certains menés au laboratoire, soutiennent l'intérêt de la protection de ce tissu pour éviter l'apparition des dommages radio-induits. Dans la suite de ce mémoire nous détaillerons le rôle de l'endothélium à l'état physiologique et dans l'inflammation. Puis nous caractériserons les modifications radio-induites de l'endothélium et verrons en quoi elles participent à l'établissement d'un phénotype pathologique.

II. Rôle du compartiment vasculaire dans la propagation des dommages radio-induits

II.A. Physiologie du compartiment endothélial

Dans cette partie, nous rappellerons les fonctions principales du réseau vasculaire. Nous détaillerons les fonctions de l'endothélium vasculaire en condition physiologique et sa participation au maintien de l'homéostasie vasculaire. Lors d'une agression provoquant une lésion, le réseau vasculaire réagit : la coagulation évite la fuite du contenu plasmatique (hémorragie) et l'inflammation élimine l'agression. Dans ces processus, l'endothélium joue un rôle central. La stimulation persistante des mécanismes inflammatoires entraîne une chronicité et est à l'origine des maladies inflammatoires chroniques. L'étude des mécanismes à l'origine de la chronicité de l'inflammation est à rapprocher des mécanismes impliqués dans la chronicité des lésions tissulaires radio-induites. En effets, il existe de nombreuses ressemblances entre les processus inflammatoires chroniques et la lésion radio-induite.

II.A.1. Structure du réseau vasculaire

Les vaisseaux sanguins permettent l'irrigation de l'organisme par l'apport métabolique artériel et l'élimination des produits du catabolisme par le retour veineux. Au centre de ce réseau, le cœur assure une fonction de pompe qui permet la circulation pulsatile du sang. On distingue les artères, qui partent du cœur et vont vers les organes, et les veines qui partent des organes et reviennent au cœur. A l'interface, les capillaires assurent les échanges entre le sang et les organes. La taille des vaisseaux diminue lorsqu'on suit leur cheminement du cœur vers les organes. On différencie les vaisseaux de conductance (gros calibres) des vaisseaux de résistance (petits calibres).

Les veines et artères sont composées de 1 à 3 tuniques selon leur section. L'adventice est la couche la plus externe. Elle est formée par du tissu conjonctif (fibroblastes et collagène) et des fibres élastiques. Elle contient des fibres nerveuses du système autonome sympathique et parasympathique. On retrouve cette tunique uniquement dans les vaisseaux de gros calibre. La média est la couche intermédiaire des vaisseaux. Elle est composée de collagène et d'élastine qui forment une matrice dans laquelle sont enchâssées des cellules musculaires lisses (CML). On retrouve cette tunique dans les vaisseaux de moyen et de petit calibre et ceux de taille supérieure. Sa composition est très variable en fonction de sa localisation dans la circulation. Ainsi, dans les artères, la média est séparée de l'intima d'une part et de l'adventice d'autre part par une couche d'élastine, la « limitante élastique » interne et externe. La média a pour fonction de limiter la composante pulsatile du flux sanguin dans les artères de type élastique et de moduler le diamètre des vaisseaux dans les artérioles de résistance. La tunique interne se nomme l'intima. Elle est composée d'une

couche cellulaire unique, les cellules endothéliales (CE), qui forment un tissu d'origine mésodermique appelé endothélium. Les CE sont pourvues d'une lame basale sur laquelle elles reposent. L'intima est la seule structure vasculaire conservée dans tous les vaisseaux sanguins. Ainsi, les capillaires, qui sont les vaisseaux les plus fins, sont composés uniquement d'intima.

II.A.2. L'endothélium vasculaire et ses fonctions

L'endothélium est un tissu omniprésent dans l'organisme. On estime que chaque cellule de l'organisme est distante d'au plus une centaine de micromètres du capillaire sanguin le plus proche⁷⁴. L'ensemble de l'endothélium est composé de $1 \text{ à } 6 \times 10^{13}$ de cellules chez l'Homme. Sa surface est de l'ordre de 4000 à 7000 m². L'endothélium est un organe aux fonctions très dynamiques qui régule son environnement et montre une réactivité accrue aux stimuli externes. Il assure le maintien de l'hémostase en empêchant l'activation de la coagulation et de la fibrinolyse. Il participe au maintien du tonus (vasomotricité) et régule la perméabilité vasculaire. Enfin, il assure des fonctions clés dans les processus angiogéniques et inflammatoires.

II.A.2.a. Contrôle de la perméabilité vasculaire

L'endothélium constitue une barrière sélective entre les tissus et le sang. Au niveau des capillaires sanguins, la perméabilité vasculaire permet un échange régulé. Le plasma, les nutriments, les gaz et éventuellement, les cellules d'origine sanguine sont acheminées vers les tissus, tandis que les produits du métabolisme tissulaire sont évacués vers le sang. Cette perméabilité vasculaire assure donc le maintien de l'homéostasie tissulaire. Elle s'opère selon deux voies parallèles : la voie paracellulaire et la voie transcellulaire.

Dans la voie paracellulaire, l'échange s'effectue au niveau des jonctions cellulaires. Dans des organes tels que le rein ou le foie, où les échanges avec le sang sont particulièrement privilégiés, des discontinuités entre les CE existent au niveau des capillaires. Cette fenestration autorise le passage de molécules et de protéines de grande taille. En revanche, dans les autres tissus, les CE sont jointives, et l'échange s'effectue au niveau des jonctions cellulaires. L'eau et les macromolécules sont facilement échangées, et dans certains cas, le passage de cellules circulantes est autorisé. L'existence de protéines de jonctions intercellulaires permet la création de différents types de jonctions : jonctions adhérentes, jonctions serrées et gap-jonctions. Le type de lit vasculaire conditionne l'existence d'un ou plusieurs types de jonctions. Dans la plupart des lits vasculaires, la fonction de barrière est assurée par des jonctions adhérentes. La dégradation, la dissociation, la réorganisation ou l'internalisation des protéines de jonction provoque la perte d'intégrité des jonctions débouchant sur une hyperperméabilité vasculaire. C'est en effet par la voie paracellulaire que s'effectue la

majorité de la fuite de plasma en condition pathologique. Le premier défi de l'endothélium consiste donc à limiter la fuite du plasma du sang vers les tissus pour éviter l'œdème périvasculaire.

La voie transcellulaire, permet un transport à travers le corps de la cellule. Elle permet un important trafic de macromolécules grâce à des mécanismes vésiculaires. Les molécules sont endocytées à la surface luminale des CE, acheminées par transcytose à travers la cellule pour être exocytées au niveau de membrane basolatérale. Ce transport vésiculaire peut être complété par d'autres mécanismes spécifiques de certaines molécules qui transitent via d'autres vésicules et des canaux⁷⁵.

II.A.2.b. Maintien de l'hémostase

L'endothélium repose sur une couche de MEC et de collagène. Si sa continuité est rompue, la révélation des couches sous-jacentes participe aux processus thrombotiques et à la coagulation. L'endothélium joue donc un rôle primordial dans le maintien de l'hémostase. Tout d'abord, en masquant la MEC, il empêche la coagulation. D'autre part, en condition physiologique, l'endothélium maintient l'hémostase par le biais de mécanismes anticoagulants, anti-agrégants et thromborésistants⁷⁶.

Les CE fixent et présentent les TFPIs (*Tissue Factor Pathway Inhibitors*), bloquant ainsi l'action pro-coagulante du complexe *factor-VIII-tissue-factor*. Les CE synthétisent également des héparanes sulfates, connues pour participer à l'hémostase en liant l'antithrombine III, capable d'inhiber la cascade de coagulation. L'endothélium assure aussi la synthèse et la présentation de la thrombomoduline, capable de fixer la thrombine. Alors que la thrombine seule induit la coagulation, le complexe thrombine-thrombomoduline active la voie des protéines C et S, capable à son tour d'inactiver les facteurs V et VIII pro-coagulants. Les CE séquestrent dans des granules nommés corps de Weibel-Palade (WPB) le facteur de von Willebrand (vWF) impliqué dans l'adhésion entre MEC et plaquettes. Enfin, l'enzyme *Nitric Oxyde Synthase* endothéliale (eNOS) assure physiologiquement la conversion de l'arginine en NO, qui inhibe l'adhésion plaquettaire.

A l'état physiologique, l'endothélium produit donc des molécules anticoagulantes (antithrombine et héparane sulfates), et lutte contre l'agrégation plaquettaire (production de prostacycline et de NO) et la fibrinolyse (inhibition de l'activation du plasminogène), entretenant ainsi un état thromborésistant⁷⁶.

II.A.2.c. Contrôle du tonus vasculaire

L'endothélium agit sur les cellules musculaires lisses (CML) sous-jacentes en émettant des facteurs vasoactifs capables de provoquer la relaxation ou la contraction des muscles lisses. La modification du tonus réduit ou augmente la section des vaisseaux et influence l'écoulement du sang. La gestion

de la balance vasoconstriction/vasodilatation est exercée localement par la synthèse de facteurs hémodynamiques. Les principaux agents vasoconstricteurs émis par les CE sont l'endothéline-1 (ET-1), les prostaglandines, le thromboxane A2 et l'angiotensine II. A l'inverse, la prostacycline (PGI₂), l'*Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor* (EDHF) et le NO exercent sur les CML une action vasodilatatrice⁷⁷. Les interactions entre les facteurs vasoactifs sont particulièrement dynamiques. La réponse vasculaire est donc le résultat d'interactions complexes entre de nombreuses voies de signalisation vasoactives. La réactivité et l'importance relative de chaque voie sont fonctions du type de lit vasculaire et des altérations dues aux processus physiopathologiques⁷⁸.

II.A.2.d. Acteur central de l'angiogenèse

L'angiogenèse est le processus permettant la production de néo-vaisseaux. Indispensable durant l'embryogenèse, elle est aussi présente en condition physiologique et pathologique. Les CE occupent un rôle de premier plan dans ce processus. On distingue 2 types d'angiogenèse : l'angiogenèse de germination et l'angiogenèse intussusceptive. Ces deux types d'angiogenèse peuvent se produire dans n'importe quel tissu.

L'angiogenèse de germination est caractérisée par des bourgeonnements de CE qui étendent l'arbre vasculaire à partir d'un vaisseau existant. Ce processus est sous le contrôle de facteurs pro-angiogéniques, principalement le VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Factor type A*) mais aussi la voie de signalisation Delta-Notch. Il permet l'extension du réseau existant à des zones qui en sont dépourvues. Les facteurs pro-angiogéniques sont émis par la plupart des cellules (mésenchymateuses et circulantes) en condition hypoxique. Ces facteurs initient l'angiogenèse par la dégradation des membranes basales des capillaires, suivie d'une prolifération endothéliale, accompagnée par une migration dirigée des CE conduisant à la formation de tubes endothéliaux. Les tubes fusionnent entre eux pour former des vaisseaux. Une fois perfusés et oxygénés par le passage du sang, les péricytes bordant les néo-vaisseaux sont stabilisés. L'angiogenèse intussusceptive consiste en la création de nouveaux vaisseaux par la scission d'un vaisseau existant en deux vaisseaux fils. Ce phénomène met aussi en jeu le VEGF-A, qui participe à la réorganisation de jonctions cellulaires et de membranes basales. Les péricytes et fibroblastes sous-jacents participent aussi à ce mécanisme⁷⁴.

II.A.2.e. Mécanismes inflammatoires

L'endothélium est, avec les leucocytes, l'un de principaux acteurs de la réaction inflammatoire. Sur les sites d'inflammation, les CE microvasculaires participent au déclenchement de l'inflammation et à sa régulation. Les médiateurs de l'inflammation agissent autant sur les CE que sur les leucocytes. Dans la suite de ce chapitre, nous verrons comment les CE sont activées, lors d'un stimulus

inflammatoire (infection, allergie) et comment leurs propriétés sont modifiées au cours de la transition de l'inflammation aiguë vers l'inflammation chronique⁷⁹.

II.A.3. Rôle de l'endothélium dans l'inflammation

II.A.3.a. Cascade d'adhésion

L'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire est une des caractéristiques majeures de l'inflammation. Ce processus de recrutement est connu depuis longtemps : il met en jeu des glycoprotéines qui permettent l'adhésion des leucocytes circulants dans le flux sanguin avec les CE bordant les vaisseaux. L'objectif de cette adhésion est le passage des leucocytes de la circulation sanguine vers le site lésé⁸⁰.

L'interaction CE-leucocytes est le fruit d'un grand nombre de facteurs physiques (forces de cisaillement), chimiques (interactions faibles et présence de NO) et surtout biologiques (protéines et glycoprotéines spécifiques, substrats et cytokines). Elle se déroule classiquement en 3 étapes : *rolling*, activation, puis arrêt des leucocytes à la surface des CE. Ces étapes bien caractérisées et documentées ont été récemment intégrées dans une cascade d'évènements plus complète qui permet de mieux comprendre les interactions CE-leucocytes⁸⁰. La cascade d'adhésion leucocytaire se décompose désormais en 7 étapes : capture, *rolling*, activation/*slow rolling*, arrêt, adhésion ferme et *spreading*, reptation intravasculaire et enfin transmigration (voir [Figure 7](#)). Dans cet enchaînement, le succès de chaque étape est asservi à celui qui la précède immédiatement. De plus, la multiplicité des choix moléculaires pour chacune des étapes offre une grande diversité de combinaisons très spécifiques de recrutement leucocytaire. Cela permet d'adapter le recrutement au tissu et au contexte^{80,81}. L'aspect moléculaire et physico-chimique de ces différentes étapes est plus ou moins bien documenté. Nous tâcherons de dresser un tableau global des différents acteurs et de préciser leur rôle dans chacune des étapes. Dans la cascade d'adhésion, un niveau de complexité supplémentaire est apporté par les modifications post-traductionnelles tels la phosphorylation et la glycosylation. Nous nous intéresserons à l'influence de la glycosylation endothéliale en contexte inflammatoire dans la [partie IV Le glycome endothélial en contexte inflammatoire](#)

II.A.3.b. Molécules d'adhésion

Les acteurs majeurs de l'adhésion cellulaire sont les molécules d'adhésion (CAM : *Cell Adhesion Molecules*). Cette appellation regroupe un grand nombre de protéines et de glycoprotéines portées par les leucocytes, les plaquettes et les CE. Elles sont toujours dirigées vers des contre-récepteurs, interagissent entre elles et contrôlent une grande partie de la cascade d'adhésion.

II.A.3.b.i. Capture et rolling : rôle des sélectines

Dans la réponse inflammatoire, les premières CAM à intervenir sont les sélectines. Ce sont des glycoprotéines *lectine-like*, dont la forme est assimilable à des lectines. Elles permettent la capture et les premières étapes du *rolling* des leucocytes⁸². Elles participent à réduire la vitesse des leucocytes de manière suffisante pour conduire aux phénomènes d'adhésion ferme⁸³. On distingue 3 types de sélectines: endothéliale (E-), plaquettaire (P-) et leucocytaire (L-). L'E-sélectine est exprimée uniquement par les CE. La P-sélectine est exprimée par les plaquettes, mais peut aussi l'être par les CE. Enfin la L-sélectine est exprimée par les leucocytes. Les sélectines reconnaissent des glycoprotéines leucocytaires portant un ligand glycosylé de forme sialyl-Lewis X (sLe^x) (voir *partie III.B.3 Importance des motifs glycaniques dans l'immunité*).

La P- et l'E-sélectine sont mobilisées à la surface des CE après un stimulus inflammatoire. Elles reconnaissent leurs ligands leucocytaires PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*), ESL-1 (*E-selectin ligand-1*), présents sur les villosités leucocytaires, et CD44. En condition basale, il existe un pool de P-sélectine pré-synthétisé et stocké dans les WPB. Ce pool est rapidement mobilisé (en 1 h) par fusion de ces organites WPB avec la membrane des CE. Par la suite, les P- et E-sélectines sont exprimées à la surface des CE suite à une néo-synthèse qui atteint son pic d'expression 3 h environ après stimulation. La mobilisation des sélectines endothéliales est dépendante de la section des vaisseaux, de la nature des tissus et du stimulus^{80,84}.

La L-sélectine est exprimée par la majorité des leucocytes Elle est présente à forte densité à l'extrémité de leurs microvillosités. Elle reconnaît les ligands sLe^x présent à l'état physiologique dans les veines des ganglions lymphatiques, et qui peuvent être exprimées par les CE lors de l'inflammation. Ces ligands endothéliaux sont principalement : GlyCAM-1 (*Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1*), MAdCAM-1 (*mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1*), CD34 et l'EMCN (endomucine).

Les sélectines et leurs ligands glycosylés sont les premiers acteurs du recrutement leucocytaire qui se poursuit par le *rolling*.

II.A.3.b.ii. Rolling, arrêt, activation des leucocytes et adhésion ferme : rôle des CAMs Ig like et des intégrines

Suite à la mobilisation des sélectines, les CAM de la famille des immunoglobulines (type *Ig-like*) prennent le relais dans la cascade d'adhésion. Ces CAM sont exprimées uniquement par les CE. Elles entrent en jeu à partir de l'étape d'adhésion. Leur implication se poursuit jusqu'à l'étape finale de transmigration. Les CAM impliquées sont notamment : ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, VCAM-2 et PECAM-1 ; toutes sont des glycoprotéines. L'expression basale d'ICAM-1 et 2 est relativement élevée (100 à

1000 fois plus importante que celle des sélectines) dans la plupart des lits cellulaires (avec toutefois des variabilités inter-organes notables). PECAM-1 a aussi une expression basale élevée. A la différence d'ICAM-1 et VCAM-1, ICAM-2 et PECAM-1 ne sont pas surexprimées en réponse aux cascades de cytokines. Les cytokines et endotoxines provoquent une transcription augmentée d'ICAM-1 et VCAM-1 de manière temps- et dose-dépendante. Pendant l'activation inflammatoire de phase II (voire [partie II.A.4.a.ii Activation de type II](#)) notamment, les cytokines telles que l'IL-1 et le TNF- α activent des facteurs de transcription tels que NF- κ B et AP-1, qui induisent l'activation endothéliale à travers la surexpression d'ICAM-1 et VCAM-1.

Du côté leucocytaire, ce sont les glycoprotéines de la famille des intégrines qui permettent la poursuite de l'adhésion, l'arrêt et finalement l'adhésion ferme et la transmigration. Les intégrines constituent une famille de 24 hétérodimères (chez l'Homme) qui participent à un large spectre de fonctions cellulaires. L'activité de reconnaissance de leurs ligands est influencée par la conformation du cytosquelette, les forces mécaniques et la redistribution des pools intracellulaires⁸⁵. A de rares exceptions près, tous les leucocytes circulants maintiennent leurs intégrines sous forme inactives. La capture et les premières phases du *rolling* permettent de déclencher une cascade d'activation des intégrines dans le leucocyte roulant. En effet, afin d'établir l'adhésion ferme capable de résister aux contraintes mécaniques du cisaillement, les intégrines, dépendantes du type de leucocyte⁸⁵, augmentent leur capacité de fixation du ligand. Pour cela, elles doivent développer de hautes affinités et avidités vis-à-vis de leurs ligands endothéliaux spécifiques^{80,81}. D'une part, l'activation des intégrines permet l'augmenter leur affinité pour leur ligand via une modification de leur conformation. L'acquisition progressive d'une conformation permettant une forte affinité se traduit par le ralentissement du *rolling* ou *slow rolling*. D'autre part l'activation modifie la valence des intégrines, c'est-à-dire leur densité à la surface des leucocytes⁸⁰.

Les principales intégrines retrouvées sur les leucocytes sont LFA-1 et Mac-1, qui se lie à ICAM-1 ou ICAM-2, et VLA-4 qui se lie à VCAM-1. Elles sont soit stockées dans des granules mobilisables à la surface des leucocytes en quelques minutes (comme LFA-1), ou bien exprimées constitutivement. Leur valence peut donc être rapidement modifiée et induire le *slow rolling*, puis l'arrêt^{80,83,85}. Les intégrines activées sont les actrices de l'adhésion ferme par reconnaissance de leurs contre-récepteurs endothéliaux. Les intégrines participent directement à l'étape d'adhésion mais elles permettent surtout son évolution vers le stade de l'adhésion ferme.

[II.A.3.b.iii.](#) *Le crawling et transmigration*

La migration des leucocytes implique la traversée de la barrière endothéliale et de la membrane basale. Une fois le leucocyte fermement adhérent par interaction entre les intégrines leucocytaires et

les molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1, le *crawling* (reptation) des leucocytes débute. La liaison établie entre ICAM-1 et Mac-1 déclenche l'émission leucocytaire de protrusions membranaires dans le corps de la CE et dans les jonctions cellulaires. L'interaction Mac-1/ICAM-1 s'accompagne d'une activation de la MLCK (*Myosin-Light-Chain Kinase*) qui provoque la contraction endothéliale menant à l'ouverture des jonctions endothéliales. La transmigration peut alors s'opérer selon deux voies : la voie paracellulaire et la voie transcellulaire.

L'ouverture de jonctions endothéliales induite lors du *crawling* facilite le passage des leucocytes par la voie paracellulaire. En contexte inflammatoire, les CE peuvent redistribuer leurs molécules de jonction afin de faciliter le passage des leucocytes. En effet, des molécules de jonctions comme la VE-cadhérine (VE-cad) empêchent le passage des cellules immunitaires et peuvent être écartées pour faciliter la transmigration⁸⁶. Parallèlement, des molécules d'adhésion comme PECAM-1 et JAM-A (*Junctional Adhesion Molecule A*) sont exprimées aux jonctions. Ces protéines participent à la création le long de la jonction d'un gradient adhésif qui guide les leucocytes hors du vaisseau⁸⁷. Un large panel de protéines jonctionnelles peut intégrer ce gradient : PECAM-1, ICAM-1, ICAM-2, JAM-A, JAM-B, JAM-C, ESAM (*Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule*) et CD99. Il semble que la composition de ce gradient puisse permettre une certaine sélectivité dans le recrutement⁸⁸.

La migration transcellulaire est possible dans les sections les plus fines de l'endothélium. Le leucocyte est acheminé à travers un canal formé grâce à la fusion de régions riches en actine et en cavéoline. La translocation des CAMs dans ces régions membranaires conduit à la formation de VVO (*Vesicula Vacuolar Organel*) permettant la création de canaux pour la migration transcellulaire^{80,89}.

L'importance des sélectines, des CAM Ig-like et des intégrines dans la cascade d'adhésion est soutenue par de nombreuses études *in vivo*. Dans ces travaux, l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques capables de bloquer les interactions leucocytes-CE et/ou l'utilisation de modèle KO pour certaines CAM montrent un effet sur la dysfonction endothéliale dans la microcirculation et les dommages tissulaires accompagnant les inflammations aiguës et chroniques^{80,83,90}.

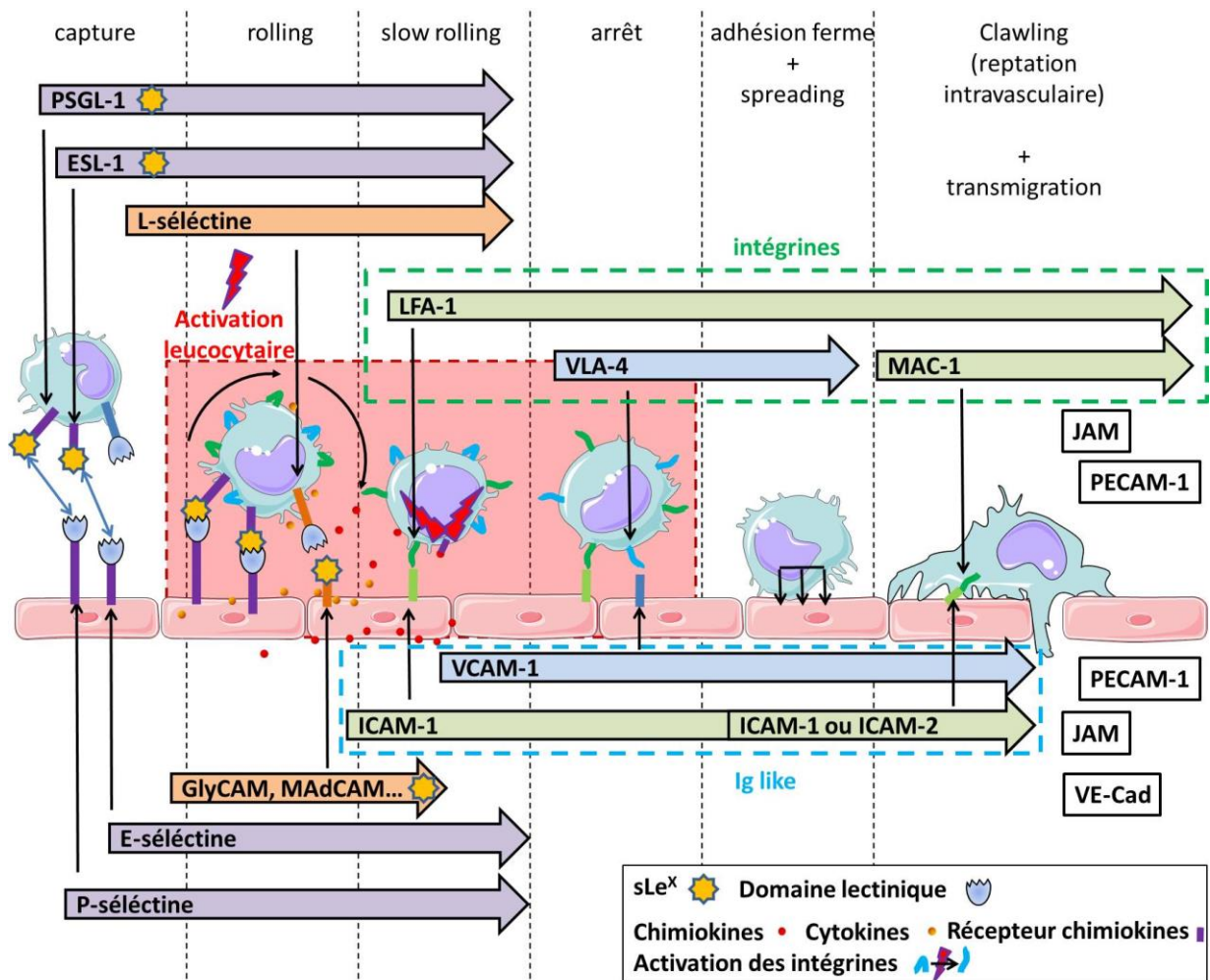


Figure 7 : cascade d'adhésion des leucocytes à la surface des CE (d'après^{80,81,83,85,91}).

Partie supérieur de la figure : molécules exprimées par les leucocytes ; partie inférieure : molécules exprimées par les CE. La cascade d'adhésion se déroule en 7 étapes (ici le crawling et la transmigration ont été regroupés). Elle fait intervenir les sélectines, les CAM Ig like et les intégrines. Une fois la capture réussie, l'activation leucocytaire intervient : entre les étapes de *rolling* et d'arrêt, l'émission de cytokine et de chimiokines participe à l'activation des intégrines, participant au *slow rolling* et à l'arrêt. Lors de la transmigration, les jonctions cellulaires sont relâchées : arrêt des interactions intercellulaire entre CE via Ve-cad ; les ce et les leucocytes établissent des jonctions entre leurs PECAM-1 et JAM respectives.

II.A.3.c. Médiateurs chimiques influençant l'adhésion

En plus des molécules d'adhésion et de l'activation des intégrines suite à la reconnaissance sélectine-ligand, des facteurs chimiques et biologiques modulent l'adhésion. Ils peuvent être émis par les tissus lésés, les CE et les leucocytes.

La dégranulation des mastocytes activés libère de l'histamine, des leucotriènes et le PAF (*Platelet Activating Factor*). L'histamine active les sélectines, ce qui permet la capture des leucocytes et l'initiation du *rolling*. Par la suite, les leucotriènes et le PAF participent à l'activation des intégrines. Ils augmentent par exemple l'avidité et l'expression des intégrines, participant ainsi à la poursuite du *rolling* et à l'adhésion ferme. Les cytokines et chimiokines induisent la transcription des CAMs endothéliales : sélectines, ICAM et VCAM. Les CE activées produisent également des ROS en excès, ce

qui a pour effet l'activation de facteurs de transcription oxydo-sensibles comme NF- κ B ou AP-1. Ces derniers dirigent également les CE vers un phénotype pro-adhésif vis-à-vis des leucocytes⁸³.

A l'inverse, le NO, la PGI₂ et l'adénosine sont des facteurs anti-adhésifs endogènes. La synthèse de NO influence le recrutement des leucocytes. Le NO joue autant sur les CE que sur les leucocytes. La prostacycline et l'adénosine sont très efficaces dans la réduction de l'adhésion et de la transmigration à travers les veinules post-capillaires⁸³.

II.A.3.d. Médiateurs physiques : rôle des forces hémodynamiques

Le flux sanguin est le principal facteur physique influençant le recrutement des cellules circulantes. Le débit varie en fonction de la section des vaisseaux et de leur nature artérielle ou veineuse. Cela influence la nature du flux sanguin qui, en fonction du débit de la section et de la viscosité, est de nature laminaire (déplacement parallèle des particules) ou turbulent (déplacement non parallèle). Le frottement du flux sanguin le long des parois est à l'origine de ces différences d'écoulement, en induisant des forces de cisaillement. Si elles sont faibles, le flux est laminaire ; si elles sont fortes, le flux est turbulent. Les forces de cisaillement sont logiquement plus élevées dans les compartiments artériels que dans les compartiments veineux. Effectivement, le taux de cisaillement en condition basale est jusqu'à deux fois moins élevé dans les veinules post-capillaires que dans les artérioles de section équivalente. On a longtemps envisagé les forces de cisaillement comme un facteur anti-adhésif. Ainsi, les forces d'adhésion leucocytes-CE seraient insuffisantes comparées aux forces de cisaillement élevées dans les compartiments artériels, avec pour conséquence, une adhésion effective uniquement présente en condition de faibles forces de cisaillement, c'est-à-dire dans les compartiments veineux. Ce n'est en réalité pas le cas : les mêmes forces de cisaillement appliquées à des compartiments veineux et artériels montrent une adhésion plus importante dans le cas des compartiments veineux. Les différences de forces hémodynamiques ne permettent pas à elles seules d'expliquer la différence d'adhésion entre les compartiments pré- et post-capillaires. L'adhésion augmentée dans les compartiments veineux s'explique probablement par la nature des lits vasculaires et plus précisément par une concentration plus importante de molécules d'adhésion endothéliales sur les lits veineux⁸³.

Les forces de cisaillement jouent un rôle important dans l'adhésion en condition inflammatoire. Le flux sanguin, laminaire ou turbulent, influence positivement ou négativement selon les étapes de la cascade d'adhésion, la reconnaissance entre leucocytes et endothélium. La capture et le *rolling* sous le contrôle des sélectines requièrent un flux turbulent. Les leucocytes se détachent lorsque le flux diminue en-dessous d'un certain seuil. Ceci s'explique par un phénomène biomécanique, appelé « *catch bound* ». Il s'agit d'un lien moléculaire (ici entre les sélectines et leurs contre-récepteurs) qui

devient plus fort lorsqu'une force de tension est exercée ; à l'inverse, un « *slip bound* » s'affaiblit sous la tension. C'est le caractère *catch bound* des sélectines qui permet la capture des leucocytes en tirant profit des forces de cisaillement^{80,92}. En revanche, une diminution du flux et donc des forces de cisaillement dans les veinules post-capillaires permet un *rolling* et une adhésion ferme augmentés. Cela suggère que les modifications du flux sanguin associées aux phases aiguës et tardives de l'inflammation pourraient exercer une influence significative sur le recrutement des cellules circulantes⁸³.

II.A.4. L'activation endothéliale

L'activation endothéliale est définie comme l'expression endothéliale de molécules d'adhésion, comme VCAM-1, ICAM-1 et E-sélectine. Elle est généralement déclenchée par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α ou l'IL-6⁹³. Cet état implique le recrutement rapide (en quelques heures) de cellules circulantes, et notamment des neutrophiles. L'activation endothéliale peut schématiquement être dissociée en deux réponses. La première réponse, rapide, ne fait appel à l'expression d'aucun gène dans les CE. Elle est appelée activation de type I ou encore stimulation. La deuxième réponse engage l'expression de certains gènes. Elle est appelée activation de type II ou simplement activation. Ces deux types d'activation provoquent des réactions inflammatoires classiques répondant toutes deux aux quatre signes cardinaux de l'inflammation : rougeur, chaleur, tuméfaction et douleur. Qu'il s'agisse de l'activation de type I ou II, les trois mêmes mécanismes soutiennent l'apparition de ces symptômes. L'augmentation du flux sanguin permet l'augmentation de la disponibilité des leucocytes. L'augmentation de la diffusion des protéines plasmatiques crée une matrice pour permettre l'infiltration des leucocytes. Enfin, à la surface des CE, l'augmentation de l'adhésion des leucocytes facilite leur capture et leur extravasation⁷⁹.

II.A.4.a.i. Activation de type I

L'activation de type I est typiquement déclenchée par l'activation de récepteurs de type GPCR (récepteur couplés à une protéine G) comme par exemple le récepteur de l'histamine H1. Elle se traduit principalement par une augmentation de la concentration en Ca²⁺ indirectement génératrice de prostacycline et de NO et induisant la relaxation des CML. D'autre part, l'activation des GPCR permet l'activation des MLC (chaines légères de myosines) et induit la contraction des filaments d'actine liés aux jonctions serrées et adhérentes. La perméabilité de l'endothélium est ainsi augmentée, ce qui provoque la fuite des protéines plasmatiques. Celles-ci forment une matrice transitoire permettant la capture, l'infiltration et la survie des neutrophiles. L'excès de Ca²⁺ a également un rôle majeur dans le recrutement des leucocytes. A travers l'activation des MLC, les CE initient l'exocytose des WPB, permettant ainsi la révélation de la P-sélectine à la surface cellulaire. Parallèlement, le PAF, un coproduit de la synthèse de l'acide arachidonique, est synthétisé et

exprimé à la face externe des CE. La présence conjointe du PAF et de la P-sélectine a pour effet la capture des neutrophiles, suivie par l'activation des intégrines⁷⁹.

II.A.4.a.ii. Activation de type II

L'activation de type II est elle aussi déclenchée via des récepteurs GPCR comme ceux de la famille des CCR et CXCR pour les chimiokines et le récepteur DP pour les prostaglandines⁹⁴. Elle est dépendante de l'activation de type I, notamment à cause de l'induction du déséquilibre calcique. Elle a lieu après que les récepteurs de type I aient été désensibilisés afin de prévenir toute re-stimulation et provoque une activation endothéliale plus persistante. Les médiateurs de cette réponse sont classiquement le TNF- α et l'IL-1, principalement émis par les leucocytes activés. Ces deux cytokines induisent l'activation de NF- κ B et AP-1. Comme la réponse cellulaire nécessite la transcription et la traduction de nouvelles protéines, l'activation de type II nécessite plus de temps que celle de type I pour être effective. De la même manière toutefois, elle conduit à une augmentation du débit sanguin, une fuite des protéines plasmatiques, et une augmentation du recrutement des leucocytes au site d'inflammation. L'activation de type II est toujours dépendante du Ca²⁺ pour la production de PGI₂ par l'enzyme COX2 avec un meilleur rendement que COX1 (utilisé dans l'activation de type I) ce qui rend la réaction inflammatoire plus importante. Les cytokines IL-1 et TNF- α induisent le remodelage du cytosquelette, permettant le relâchement des jonctions intercellulaires et la fuite des protéines plasmatiques. A la différence de la réaction de type I, la matrice résultant de cette fuite est plus pérenne, car l'exsudation laisse passer des protéines plasmatiques de plus haut poids moléculaire comme le fibrinogène, rapidement converti en fibrine participant ainsi à la formation du clou plaquettaire. Le recrutement des leucocytes est également plus efficace dans l'activation de type II. Il est sous le contrôle des chimiokines comme CXCL8 (IL-8) et de nouvelles molécules d'adhésion comme l'E-sélectine. Les CE peuvent également capturer des chimiokines synthétisées par d'autres cellules et les présenter au moyen de leurs héparanes sulfates⁷⁹.

Une fois l'activation de type II engagée, celle-ci est programmée pour se poursuivre. Malgré le maintien des cytokines pro-inflammatoires, la synthèse de E-sélectine s'arrête spontanément et de manière corrélée avec l'inactivation de AP-1, 6 à 24 h après l'induction de cytokines. Un changement du profil d'expression des cytokines tend vers une dynamique plus lente. Elle va se traduire d'une part par des expressions augmentées d'ICAM-1 et VCAM-1, et d'autre part par une transition d'un recrutement de neutrophiles vers un recrutement de leucocytes mononuclés. Dans les 24 h, les leucocytes activés peuvent agir, notamment au niveau capillaire, pour exacerber la réaction inflammatoire en relarguant des cytokines comme l'IFN- γ et conduire à la mort des CE⁷⁹. La mort et la lésion des CE favorisent la thrombose. Les cellules apoptotiques perdent leurs fonctions anticoagulantes, par exemple par le *shedding* de leur protéoglycanes (voir [partie IV.A.2.a Le](#)

shedding) et développent des fonctions pro-coagulantes. L'exposition du collagène de la membrane basale des CE suite à la desquamation ou la rétractation de ces dernières induit une augmentation de l'adhésion des leucocytes et de l'activation des plaquettes.

Les cytokines peuvent exacerber la dysfonction endothéliale. Le TNF- α peut induire la diminution post-transcriptionnelle de la synthèse d'eNOS et la diminution de la transcription du gène de la thrombomoduline. TNF- α et IL-1 peuvent ensemble induire la synthèse du facteur tissulaire (TF), le principal initiateur de la coagulation. En condition physiologique, le TF est séquestré par les CE, et les rend incapables de déclencher la cascade de coagulation. La formation d'un thrombus, dû à l'agrégation de la fibrine intravasculaire et des plaquettes, est une composante importante de l'inflammation aiguë. Même s'il s'agit d'une bonne barrière pour éviter la propagation d'une infection, la thrombose peut toujours endommager les vaisseaux et induire une hémorragie. Si elle est suivie d'une ischémie, la cicatrisation est de piètre qualité et conduit à des cicatrices plutôt qu'à une inflammation résolue.

Quand l'activation de type I se résout spontanément en raison de la désensibilisation des récepteurs engagés, celle de type II persiste tant que les stimuli sont maintenus. Cela peut être provoqué par l'éradication d'une infection mais aussi par extinction d'une voie de signalisation, comme celle du TNF- α .

II.A.5. Rôle de l'endothélium dans l'établissement d'une inflammation chronique

Si l'inflammation aiguë ne suffit pas à éradiquer le stimulus et si la réponse immunitaire adaptative est activée en réponse à ce stimulus persistant, le processus inflammatoire bascule vers une forme chronique : l'activation de type II s'installe définitivement. L'échec de la réponse inflammatoire à résoudre l'inflammation conduit à la production de facteurs qui augmentent le débit sanguin dans les tissus inflammés, et soutient la viabilité des cellules inflammatoires qui produisent elles-mêmes ces facteurs. On assiste donc à l'établissement d'un cycle auto-entretenu de processus inflammatoires⁷⁹.

II.A.5.a. Les CE mettent en place la réponse immunitaire adaptative

L'endothélium participe à l'inflammation chronique par des interactions avec des effecteurs spécialisés de l'immunité et en agissant comme cellules présentatrices d'antigène (APCs : *antigen presenting cells*). La présentation des antigènes est connue pour être la première étape dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative⁹⁵. En condition inflammatoire chronique, les CE présentent à leur surface les MHC (chaines légères de myosines) type I et II. Les CE activées expriment des co-stimulateurs (4-1BBL, ICOSL, OX40L) impliqués dans la formation, l'activation et la survie des lymphocytes T mémoires. En effet, les CE soumises à un stimulus par l'IFN- γ induisent la production de cytokines par les cellules T mémoire CD4+ et CD8+ et leur prolifération⁹⁶. Les CE

peuvent aussi exprimer des molécules du MHC-I comme CD1d, qui confèrent la capacité de présenter des antigènes aux NK invariants (iNKT)⁹⁵.

En plus de la réponse immunitaire adaptative, deux autres modifications endothéliales participent à l'inflammation chronique : l'angiogénèse et l'organogénèse lymphoïde tertiaire⁷⁹.

II.A.5.b. Rôle de l'angiogénèse et de l'hypoxie dans l'inflammation chronique

La génération de nouveaux vaisseaux est nécessaire à la survie des cellules inflammatoires dans les tissus et permet la conversion en mésenchyme de la matrice provisoire créée pendant l'inflammation aiguë. Elle permet la génération d'un tissu stromal plus durable. De tels néo-tissus inflammatoires peuvent devenir des caractéristiques primordiales dans les maladies inflammatoires chroniques⁷⁹. L'inflammation chronique et l'angiogénèse sont deux processus complémentaires où l'hypoxie est le stimulus commun. Il en résulte une accumulation des macrophages et d'autres cellules immunitaires, ainsi qu'une production accrue de facteurs de croissance. Parallèlement, l'angiogénèse soutient l'inflammation en assurant les besoins métaboliques en oxygène et nutriments des cellules inflammatoires⁹⁷.

Il existe un échange complexe entre les phénomènes inflammatoires chroniques et angiogéniques (*Figure 8*). Les cellules enflammées sécrètent des facteurs de croissance, des protéases et des cytokines qui induisent une dégradation de la MEC, une croissance des CE et une migration des cellules immunitaires suivie de l'invasion des tissus, qui induisent l'angiogénèse. En réponse à cette angiogénèse, les CE augmentent les signaux inflammatoires chroniques, en fournissant des cytokines, en augmentant les apports d'O₂ et de nutriments et en activant le chimiotactisme inflammatoire. Cette boucle augmente à la fois l'inflammation chronique et l'angiogénèse⁹⁷.

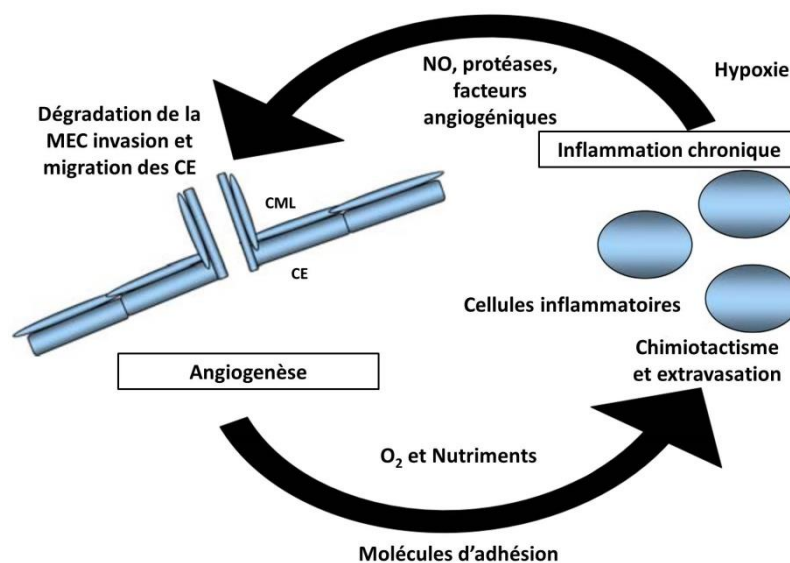


Figure 8 : liens entre inflammation chronique et angiogénèse (d'après Costa *et al.*⁹⁷).

Les médiateurs inflammatoires produits par les cellules immunitaires ciblent les fibroblastes et les CE afin d'induire le relargage des facteurs angiogéniques⁹⁸. Les CE activées peuvent elles-mêmes relâcher des facteurs angiogéniques comme VEGF, Ang, bFGF, HGF, PDGF, TGF- β et TNF- α . Ces facteurs exercent des effets mitogéniques et migratoires sur les CE. L'hypoxie, caractéristique de l'inflammation chronique, induit l'expression des HIFs (*hypoxia-inducible factors*) qui déclenchent la production de multiples facteurs angiogéniques comme VEGF et Ang-2. Enfin, l'activation par les médiateurs pro-inflammatoires du facteur de transcription NF- κ B est primordiale car celui-ci joue des rôles importants à la fois dans l'inflammation et l'angiogenèse.

II.A.5.c. Formation d'organes lymphoïdes tertiaires

Dans des cas extrêmes, les tissus enflammés peuvent acquérir les caractéristiques d'un organe lymphoïde tertiaire. L'endothélium passe de l'aspect « *flat veinules* » à celui de « *tall endothelial cells* », comparable à celui que l'on retrouve dans les ganglions lymphatiques. Parallèlement, la sulfatation des ligands de la L-sélectine est déclenchée. Cette sulfatation permet le recrutement de lymphocytes T naïfs et mémoires et de lymphocytes B. Les lymphocytes recrutés se regroupent en deux groupes distincts associés à leurs cellules complémentaires : LB avec des cellules dendritiques folliculaires et LT avec les cellules dendritiques myéloïdes. Cette conversion en une forme de tissu lymphoïde organisé peut faciliter la dispersion des épitopes et enclencher des maladies auto-immunes⁷⁹.

II.A.6. Dysfonction endothéliale

La chronicisation de l'inflammation et l'altération de la physiologie endothéliale sont retrouvées dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques (MIC) et systémiques (diabète, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, maladies rénales, maladies auto-immunes). En effet, dans ces affections, de nombreux facteurs comme la présence de cytokines circulantes, de LDL (*Low Density Lipoprotein*) oxydés et d'auto-anticorps induisent directement ou indirectement un phénotype inflammatoire chronique. Cet état est caractérisé par l'activation endothéliale, la relaxation vasculaire, l'augmentation de l'adhésion leucocytaire, l'augmentation de la perméabilité endothéliale, et l'établissement d'un état pro-thrombotique. Les MIC sont associés à une augmentation des maladies cardiovasculaires et à l'apparition puis le développement rapide de symptômes athérosclérotiques. Même si le lien n'est pas encore formellement établi, il existe de nombreux éléments pour relier inflammation et athérosclérose⁹⁹.

Les patients atteints de MIC manifestent rapidement après le début de la maladie des signes de dysfonction endothéliale (DE). La DE est le signe clinique manifeste d'une atteinte aux tissus vasculaires et d'une perte des fonctions physiologiques de l'endothélium vasculaire. Classiquement la

DE est associée à une diminution de la biodisponibilité du NO, mais est aussi caractérisée par l'émission de médiateurs pro-inflammatoires et vasoconstricteurs synthétisés par l'endothélium^{93,100}. La DE constitue un paramètre clinique d'intérêt dans le développement des symptômes athérosclérotiques, et donc dans la prévention des maladies cardiovasculaires. Dans les MIC, cette perte des fonctions endothéliales est associée à l'apparition rapide des symptômes athérosclérotiques et l'augmentation du risque cardiovasculaire.

Nous verrons dans la partie suivante que l'endothélium soumis à de fortes doses d'irradiation présente un phénotype pro-inflammatoire qui partage dans son évolution de nombreux points communs avec les phénomènes inflammatoires aigus puis chroniques.

II.B. Rôle de l'endothélium dans la propagation des lésions radio-induites

Nous avons détaillé les fonctions normales de l'endothélium, et expliqué les bases de l'activation endothéliale. Nous avons vu quels mécanismes conduisent la transition d'une activation de l'endothélium vers une inflammation chronique. Enfin, nous avons donné les caractéristiques de la dysfonction endothéliale. Dans cette partie, nous établirons des ponts entre les phénomènes inflammatoires et les effets des RI sur l'endothélium. Nous verrons dans quelle mesure les processus radio-induits sont similaires aux processus inflammatoires et thrombotiques.

II.B.1. Dommages vasculaires radio-induits

Les RI provoquent des lésions vasculaires qui jouent un rôle dans la propagation des lésions aiguës et tardives. Les modifications de l'endothélium sont observées très rapidement après irradiation et participent à l'induction et à la progression des lésions tissulaires. La lésion endothéliale débouche par la suite sur des lésions vasculaires plus tardives comme la fibrose (voir [partie I.C.5 La fibrose radio-induite, un exemple d'effets cumulés](#)) et la réduction luminale. Ces altérations contribuent à la génération de zones hypoxiques amplifiant et complexifiant la cicatrisation pathologique radio-induite (voir [partie I.C.6 Une cicatrisation complexe](#)). La sensibilité des vaisseaux est fonction de leur taille. Ainsi, les petits vaisseaux (microvasculature) sont souvent considérés comme plus radiosensibles. Dans ces vaisseaux, l'irradiation provoque des ruptures et des dilatations capillaires. Les RI induisent une hypertrophie et le détachement des CE de leur lame basale débouchant sur une thrombose¹⁰¹ et l'effondrement des structures vasculaires. Les connaissances sont moins formelles sur les vaisseaux de gros calibre. En effet, il est difficile de distinguer les lésions athérosclérotiques présentes chez les sujets sains des lésions vasculaires radio-induites. Cependant, les ressemblances existantes entre les deux processus pathologiques suggèrent que l'initiation et la progression de lésions vasculaires pourraient être causées par des processus similaires^{102,103}.

II.B.2. Rôle des dommages vasculaires dans l'évolution des lésions tissulaires radio-induites

Les réponses aiguë et chronique de la microvasculature participent à l'initiation, la progression et la maintenance des dommages tissulaires¹⁰⁴. Une exposition à une forte dose de RI (10 Gy) provoque une réaction endothéliale aiguë qui se caractérise par une vague rapide d'apoptose endothéliale^{46,105,106}. Les cellules survivantes participent au développement d'un phénotype vasculaire dysfonctionnel. Dans la phase précoce, elle est marquée par une sécrétion excessive de cytokines pro-inflammatoires, un recrutement accru des cellules circulantes (plaquettes et lymphocytes), l'activation du système de coagulation, et l'augmentation de la perméabilité vasculaire¹⁰⁷. Dans la phase tardive, un effondrement des vaisseaux est observé, associé à une réduction de l'épaisseur de la membrane basale et à la persistance d'un phénotype endothélial pro-coagulant, pro-inflammatoire et potentiellement sénescents¹⁰⁸. Sous l'effet des atteintes vasculaires, les tissus sains environnants deviennent hypoxiques et pro-inflammatoires. Les cellules normales sont alors susceptibles d'être endommagées par des phénomènes d'ischémie, de nécrose et de fibrose¹⁰⁶.

Quel que soit le tissu, une forte corrélation a pu être établie entre épaissement vasculaire et gravité des lésions radio-induites¹⁰⁹. Dans cette étude menée à l'IRSN, il est suggéré que la sévérité des atteintes vasculaires pourrait constituer un facteur déterminant dans la réponse tissulaire radio-induite¹⁰⁹. En effet, plusieurs expériences que nous détaillerons par la suite (*partie II.B.3.f Phénotype pro-inflammatoire*) démontrent la chronicité des lésions vasculaires radio-induites. Le phénotype pro-coagulant est par exemple maintenu dans le temps chez l'Homme comme chez l'animal, suggérant son influence dans la persistance des dommages radio-induits^{110,111}. *In vitro*, le phénotype pro-inflammatoire, attesté par la capacité des CE à induire l'adhésion de neutrophiles, a pu être observé jusqu'à 10 jours après exposition¹¹². L'apparition des processus fibrotiques fait suite à la persistance de la dysfonction endothéliale radio-induite. Il semble que les processus hypoxiques notamment médiés par la disparition des CE puissent participer aux phénomènes fibrotiques¹⁰¹.

II.B.3. Effets de l'irradiation sur l'endothélium vasculaire

II.B.3.a.i. Mort par les céramides

L'endothélium est depuis longtemps connu comme un organe particulièrement radiosensible. *In vivo*, des doses de 10 Gy au Système Nerveux Central¹¹³ et à l'intestin¹⁵ et de 20 Gy au poumon^{114,115} sont capables de provoquer une radio-toxicité qui semble trouver son origine dans l'apoptose des CE. A la différence des autres types cellulaires, où l'on considère en général que la vague de mort précoce

consécutives à l'irradiation est due aux dommages à l'ADN, il semble que dans le cas des CE, la mort cellulaire soit d'abord due à une génération importante et fatale de céramides.

La voie ASMase-céramide est impliquée dans l'apoptose endothéliale radio-induite¹¹⁶. L'enzyme *acid sphingomyelinase* (ASMase) réduit les sphingomyélines membranaires en céramides¹¹⁷. Ces biomolécules actives agissent comme seconds messagers. Elles sont composées d'acides gras de longueurs variables liés au groupe amine de la sphingosine. Deux mécanismes indépendants menant à l'apoptose endothéliale radio-induite sont orchestrés par les céramides. L'augmentation rapide de sa concentration provoque une réorganisation latérale de la membrane lipidique. Grâce à leurs propriétés particulières, les céramides créent de petits domaines membranaires riches en cholestérol capables de coalescer pour former des radeaux lipidiques¹¹⁸. La réorganisation spatiale de la membrane conduit au rassemblement de ces radeaux en domaines enrichis en céramides. Ils induisent des voies pro-apoptotiques, par exemple via les récepteurs CD95 et CD40. Le masquage des céramides par des anticorps empêchant leur formation a montré de bons résultats dans la protection des CE vis-à-vis de l'apoptose radio-induite¹¹⁹.

Le deuxième mode d'action des céramides passe par une interaction directe avec les protéines cytoplasmiques. Les céramides produites par l'ASMase migrent lentement de la face externe de la membrane lipidique vers la face interne. Les protéines cytoplasmiques pourront reconnaître et interagir directement avec les céramides conduisant à l'apoptose par de nombreuses voies moléculaires¹⁰⁶.

Un des effets immédiats de l'irradiation est la translocation de l'ASMase lysosomale à la face extracellulaire des CE et son activation. L'action des RI sur cette translocation est encore mal documentée. Les RI pourraient agir par la formation de ROS, par la voie des caspases ou encore via des phosphorylations. Cette activation de l'ASMase membranaire induit une première vague de céramides qui survient quelques secondes après irradiation. Cette génération de céramides est indépendante des dommages directs à l'ADN. Une deuxième vague de production de céramides a lieu environ 4 h après irradiation. Elle est déclenchée par l'activation post-traductionnelle de la céramide synthétase endothéliale qui provoque une nouvelle synthèse de céramides. C'est lors de cette deuxième vague de production que le processus de mort endothéliale par les céramides atteint son pic¹²⁰. L'utilisation de souris déficientes pour la protéine ATM a permis de démontrer que la céramide synthase est régulée par ATM après irradiation¹²¹.

II.B.3.a.ii. Rôle contesté de la mort des CE

L'importance de l'apoptose endothéliale radio-induite dans la réaction des tissus sains après irradiation est controversée. En 2001, une étude menée par Paris *et al.* a démontré, sur un modèle

de souris irradiée à 15 Gy TBI, que l'apoptose endothéliale est le point de départ du syndrome gastro-intestinal (SGI)¹⁵. Ces travaux démontrent que chez les souris déficientes en ASMase, l'apoptose endothéliale est limitée après irradiation. Chez ces souris, une meilleure survie des cellules souches épithéliales à la base des cryptes des microvillosités intestinales est observée. Cette diminution de la mort endothéliale et ses conséquences sur l'intégrité de l'épithélium intestinal semblent contribuer à protéger les souris du SGI. D'autres travaux ont également montré l'importance de la mort radio-induite des CE en contexte tumoral^{122,123}. Cependant, une partie de la communauté scientifique conteste le rôle présumé de la mort endothéliale radio-induite comme évènement déclencheur du SGI et des lésions des tissus sains. En effet, en utilisant une technique de boron-thérapie, l'équipe de Schuller *et al.* a irradié spécifiquement et à forte dose l'endothélium chez la souris. Malgré une dose délivrée plus forte que dans l'étude de Paris *et al.*, aucun effet sur la survie clonogénique des cellules souches intestinales n'a pu être mis en évidence^{124,125}. Leurs études suggèrent que l'apoptose endothéliale n'a pas d'influence sur l'apparition du SGI. Ces résultats ont à leur tour été contestés en mettant en cause les techniques de détection des cellules apoptotiques (méthode TUNEL) et la dose délivrée au tissu^{126,127}. La controverse existe encore à ce jour, sans que de nouvelles publications n'y mettent fin¹²⁸⁻¹³⁰. S'il reste ardu de déterminer dans quelle mesure l'endothélium irradié est l'initiateur ou non des dommages tissulaires radio-induits, en revanche il semble bien que l'apoptose endothéliale radio-induite participe aux effets délétères tissulaires¹⁰⁷.

II.B.3.b. Augmentation de la perméabilité endothéliale

La perméabilité endothéliale est connue depuis longtemps comme un des effets précoces des RI sur les CE. En effet, les RI altèrent les membranes plasmiques, principalement par peroxydation et fragmentation des lipides. La peroxydation des lipides apparaît dans les premières heures suivant l'irradiation. C'est un processus de dégradation lipidique qui affecte principalement les acides gras polyinsaturés et mène à une fragmentation des membranes. Cela provoque une perte de fluidité associée à une augmentation de la perméabilité. Ces phénomènes induisent la perte de fonction de barrière membranaire indispensable à l'intégrité cellulaire¹³¹.

L'augmentation de la perméabilité cellulaire peut être expliquée par l'activation radio-induite de RhoA. Cette petite protéine G (GTPase), est rapidement activée après irradiation. Elle participe à la réorganisation de l'actine du cytosquelette, marquée par la formation de fibres de stress et une augmentation de la perméabilité endothéliale^{106,132}. RhoA agit avec ROCK (*Rho-associated kinase*) pour activer la voie RhoA/ROCK qui régule de nombreuses fonctions endothéliales comme la perméabilité, la migration, l'adhésion, mais est aussi impliquée dans la survie cellulaire et l'apoptose¹³². Cependant, la fonction de la voie RhoA/ROCK dans l'endothélium vasculaire est encore mal décrite.

II.B.3.c. Dysfonctionnement du tonus vasculaire

Suite à une irradiation, plusieurs études sur l'Homme et l'animal démontrent une diminution de l'expression de eNOS¹³³. *In vitro*, sur modèle HUVEC, une augmentation de l'activité d'eNOS sans augmentation de son expression a été démontrée. Cette activation est attribuée à deux voies de régulation, dépendante de protéines kinases ou bien des ROS radio-induites¹³⁴. Les cytokines, le NF- κ B et les ROS radio-induits sont connus pour induire la synthèse d'iNOS⁴¹. Plusieurs études ont d'ailleurs montré l'augmentation de cette enzyme au niveau endothélial. Cela pourrait contrebalancer l'effet vasoconstricteur radio-induit par la diminution de la synthèse de NO par eNOS. En effet, iNOS est connue pour produire plus longtemps et de manière plus importantes du NO comparé aux formes constitutives eNOS et nNOS. La perte de la relaxation vasculaire NOS-dépendante associée à une expression diminuée de eNOS a été suggérée comme mécanisme explicatif de la dysfonction vasculaire radio-induite. L'utilisation d'inhibiteurs de NOS est suggéré pour rétablir l'équilibre tonique suite à une exposition¹³⁵.

L'activité des NOS a été largement étudiée mais avec des résultats contradictoires. Il semble que malgré la dualité de la réponse cellulaire, la manipulation de la signalisation du NO en association avec les RT offre des opportunités pour augmenter le contrôle tumoral et diminuer les dommages radio-induits aux tissus sains¹³⁶.

II.B.3.d. Secréctions des facteurs solubles

On a déjà évoqué l'importance du rôle des cytokines dans l'initiation et la propagation des lésions radio-induites aux tissus sains et ce, à travers le recrutement des cellules circulantes.

La sécrétion endothéliale de cytokines et chimiokines a été démontrée *in vitro* dès les premières heures suivant l'irradiation. Dans des CE de la lignée EAhy926, la surexpression des cytokines pro-inflammatoires (CCL2, IL-8, IL-1 β , CSF1), et de FAS (membre de la famille du récepteur du TNF- α) a été démontrée après exposition à une dose de 10 Gy¹³⁷. Chez des HUVECs irradiées à des dose de 2 à 10 Gy, une augmentation de la sécrétion dose-dépendante des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 a été démontrée^{138,139}. De la même manière, une autre étude plus récente, menée sur une lignée de CE microvasculaires dermales, a mis en évidence une surexpression dose-dépendante d'IL-6. L'étude démontre aussi l'expression augmentée du FGF¹⁴⁰. Les CE irradiées sécrètent également des chimiokines impliquées dans l'angiogenèse. Ce phénomène est illustré par une étude menée sur des HUVECs irradiées à 5 ou 20 Gy. Une augmentation de l'expression des chimiokines CXCL1-3 et CXCL 5-8 a été constatée quelle que soit la dose. Cependant, l'étude met en évidence l'influence de la dose sur le statut angiogénique des CE. En effet, une dose de 5 Gy favorise l'expression des chimiokines et récepteurs angiogéniques (CXCR4) et diminue l'apoptose. A l'inverse, une dose de 20 Gy a un effet

pro-apoptotique et augmente l'expression de chimiokines angiostatiques : CXCL4, CXCL9, CXCL10 et CXCL11. En conséquence, la migration cellulaire est significativement augmentée à 5 Gy contrairement aux cellules exposées à 20 Gy. Une culture de peau de souris *ex vivo* a confirmé la surexpression de CXCL4, CXCL9, CXCL10 pour une dose de 20 Gy alors que les échantillons traités par 5 Gy ne montrent pas de différence significative¹⁴¹. Au regard des études *in vitro*, il semble donc que les RI puissent influencer les processus angiogéniques avec une spécificité d'action dépendante de la dose.

In vivo, plusieurs études montrent que le tissu vasculaire irradié sécrète des facteurs pro-inflammatoires. Dans les artères prélevées chez des patients irradiés, Halle *et al.* ont démontré la surexpression de 13 gènes. Parmi eux, quatre codent pour des cytokines (CCL8, CCL3, CXCL2, IL-6) et deux sont induits par le TNF- α (PTX3 et TNFAIP3). Tous les gènes différenciellement exprimés après irradiation sont liés à la voie NF- κ B. La dérégulation de cette voie semble maintenue dans le temps, car l'étude intègre des patients irradiés depuis 4 à 500 semaines. L'activation de NF- κ B a été confirmée par marquage dans les tissus irradiés¹⁴². A l'IRSN, des travaux sur le rat irradié à 10 Gy en TBI ont démontré une augmentation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF- α et IL-6 et une diminution de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 dans le muscle intestinal. Ce phénotype reste en partie maintenu dans le temps jusqu'à 3 jours. Là encore, la voie NF- κ B semble jouer un rôle central¹⁴³. De la même manière, une irradiation colorectale à une dose de 27 Gy chez la souris induit la surexpression de CXCL2, CXCL-1, IL-1 β et TNF- α 3 h après irradiation. Cette surexpression est maintenue jusqu'à 2 semaines¹⁴⁴. Ces études ne sont pas effectuées directement sur l'endothélium *in vivo*. Cependant, l'élévation de ces cytokines pro-inflammatoires dans un tissu où l'endothélium joue un rôle central interroge.

Les CE produisent donc *in vivo* et *in vitro* des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance qui sont des médiateurs de l'inflammation et de l'angiogenèse. Ces molécules induisent le recrutement des cellules circulantes. Par exemple, IL-8, CXCL1 et CXCL2 exercent des propriétés chimiotactiques sur les neutrophiles. Les cellules circulantes, et notamment les leucocytes, émettent aussi des molécules capables d'exacerber la réaction radio-induite. Les mastocytes émettent ainsi des molécules comme la chymase, la tryptase et l'histamine. A l'IRSN, l'utilisation de souris déficientes en mastocytes a montré des effets positifs (précoces et tardifs) sur l'ulcération radio-induite de la muqueuse intestinale¹⁴⁴. Le rôle des macrophages et de ses médiateurs a également été établi sur les CE *in vitro*. Ainsi, l'utilisation de milieu conditionné par des mastocytes induit chez les HUVECs une expression d'IL-6, IL-8, CXCL2 et E-selectine¹³⁹.

II.B.3.e. Phénotype pro-coagulant

II.B.3.e.i. *Perte de thromborésistance : activation du système de coagulation*

L'activation du système de coagulation est un des premiers effets de l'irradiation sur l'endothélium. La mort des CE, identifiée comme une blessure, provoque l'activation du système de coagulation. On note une augmentation de la fibrinogénèse, combinée à une baisse de la fibrinolyse. Le TF¹⁴⁵ et le vWF¹⁴⁶ sont surexprimés. La prostacycline¹⁴⁷ et la thrombomoduline¹⁴⁸ sont sous-exprimées. La thrombine joue un rôle déterminant dans l'initiation des lésions radio-induites car elle induit l'activation de la fibrinogénèse. Il a aussi été montré qu'elle stimule la prolifération des fibroblastes en phase aigüe dans un modèle d'irradiation pulmonaire chez le rat¹⁴⁹. La thrombine peut en plus de son rôle pro-coagulant, stimuler la synthèse de la MEC, la différenciation myofibroblastique et la synthèse de CTGF. D'autre part, la diminution radio-induite de l'expression de la thrombomoduline a été démontrée chez l'Humain et dans des modèles animaux^{150,151}. Cette diminution participe à la perte des fonctions anticoagulantes des CE et est durable chez les patients traités par RT. Elle se poursuit après l'arrêt du traitement et est associée aux phases de fibrose¹⁵¹. Cette sous-expression s'explique par plusieurs mécanismes radio-induits. D'abord, les RI altèrent la capacité de la thrombomoduline à activer la protéine C¹⁵². Ensuite, l'altérité de sa fonction est exacerbée par la présence de myéloperoxidase (MPO). Cette molécule peut être émise par les neutrophiles et les macrophages, et elle est impliquée dans l'irruption de ROS consécutive à l'exposition¹⁵². Enfin, l'activation des cascades cytokiniques consécutive à l'exposition aux RI permet une surexpression d'IL-1, de TNF- α et de TGF- β 1. Toutes ces cytokines sont capables d'inhiber la transcription de la thrombomoduline¹⁰⁷.

II.B.3.e.ii. *Phénotype anti-fibrinolytique*

Le processus fibrinolytique exercé par les CE à l'état physiologique permet d'éviter la formation d'un thrombus. Les activateurs du plasminogène u-PA et t-PA catalysent la conversion du plasminogène en plasmine qui catalyse la dégradation de la fibrine¹⁵³. A l'IRSN, plusieurs travaux se sont intéressés aux effets des RI sur la fibrinolyse. Notamment, le rôle de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) a été étudié. Plusieurs travaux prouvent ainsi que l'expression de PAI-1 est augmentée après irradiation, *in vitro* et *in vivo*. Cette surexpression inhibe l'action fibrinolytique de u-PA et t-PA, perturbant ainsi le processus fibrinolytique. L'utilisation de souris KO pour PAI-1 spécifiquement dans l'endothélium a permis de mettre en évidence son rôle dans l'initiation et la propagation des lésions radio-induites. La suppression endothéliale de PAI-1 réduit les dommages radio-induits dans un modèle d'atteinte intestinale et augmente la survie des souris exposées¹⁵⁴. Ces travaux soutiennent l'existence d'un phénotype endothélial anti-fibrinolytique et pro-coagulant¹⁵⁴⁻¹⁵⁷.

II.B.3.e.iii. Recrutement plaquettaire

Plusieurs travaux *in vitro* et *in vivo* démontrent l'existence d'un recrutement plaquettaire et l'établissement de thrombus. L'apoptose des CE révèle la matrice extracellulaire et favorise la thrombose. Les CE survivantes présentent une perte de thromborésistance et une diminution de leur capacité fibrinolytique. Tous ces phénomènes concourent à l'établissement d'un phénotype pro-coagulant. En effet, *in vitro*, sur un modèle HUVEC, la libération du vWF a été observée après une irradiation à 20 Gy avec pour conséquence une adhésion plaquettaire augmentée¹⁵⁸. *In vivo*, l'augmentation de l'adhésion plaquettaire a été confirmée en microscopie intravitale chez la souris irradiée à 10 Gy en TBI, 6 et 24 h après exposition. Dans cette étude, il semble que l'adhésion plaquettaire soit uniquement due à une activation endothéliale¹⁵⁹. En effet, une étude *in vitro* sur des HMVEC-L (cellules endothéliales microvasculaires de poumon) irradiées à 10 Gy montre l'importance de l'expression de PECAM-1 dans l'adhésion plaquettaire¹⁶⁰. *In vivo*, PECAM-1 joue un rôle clé dans la formation de l'agrégat plaquettaire à la surface des CE irradiées¹⁵⁹. L'utilisation d'anticorps anti-PECAM-1 suffit à inhiber la thrombose sur les CE¹⁰⁷.

II.B.3.f. Phénotype pro-inflammatoire

Les RI provoquent l'activation de l'endothélium vasculaire, les molécules d'adhésion sont surexprimées et entraînent l'augmentation du recrutement des cellules circulantes¹⁶¹.

II.B.3.fi. Surexpression des molécules d'adhésion et développement de l'infiltrat inflammatoire

La plupart des études se sont concentrées sur les CAM impliquées dans l'adhésion et la transmigration (ICAM-1, VCAM-1 et PECAM-1), les intégrines (LFA-1, Mac-1 et VLA-4) et les sélectines (E- et P-sélectine). Cependant, les RI induisent également des modifications d'autres intégrines, ainsi que des cadhérines et de CD44.

La modification radio-induite de l'expression des CAM a été démontrée dans de nombreux modèles cellulaires endothéliaux (HUVEC, HMVEC-L, HMVEC-D), leucocytaires, vasculaires et tumoraux. Il existe des différences inhérentes à la dose, aux lignées utilisées et aux tissus d'origine. Dans le modèle HUVEC, les RI provoquent une surexpression d'ICAM-1 et de P-sélectine. Alors que pour les vaisseaux pulmonaires, ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 et la P-sélectine sont surexprimés. D'une manière globale, l'irradiation augmente l'expression des sélectines, intégrines et des CAM *Ig-like*^{162,163}.

In vivo, des études utilisant des modèles d'irradiation intestinale et thoracique ont montré que la cinétique d'expression des CAMs se caractérisait par une surexpression rapide d'ICAM-1 dans les 24 premières heures après exposition. L'utilisation de souris ICAM-1^{-/-} a permis de démontrer le rôle primordial joué par cette molécule dans l'infiltration des cellules inflammatoires en réponse à

l'irradiation^{164,165}. La surexpression de VCAM-1 survient plus tardivement, une à deux semaines après irradiation. Des souris KO pour ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine et L-sélectine ont permis l'étude *in vivo* de l'impact de ces molécules dans le développement des lésions pulmonaires radio-induites. L'absence d'E-sélectine est corrélée avec une diminution de la fibrose et une meilleure survie comparé aux groupes contrôles¹⁶⁶. Les auteurs notent également que la fibrose pulmonaire radio-induite est associée à une augmentation d'ICAM-1 et de VCAM-1 chez les souris contrôle et est diminuée chez les individus KO. Les individus KO pour ICAM-1 présentent moins d'insuffisance respiratoire et une absence d'infiltrats inflammatoires après une irradiation thoracique^{167,168}. De manière similaire, une diminution des infiltrats inflammatoires est obtenue via l'administration d'anticorps monoclonaux anti-ICAM-1 dans les lignées sauvages. Cela démontre l'efficacité des méthodes prenant pour cibles les CAMs dans la protection des tissus sains¹⁶⁹.

Il a également été mis en évidence que les molécules d'adhésion jouent un rôle dans les complications radio-induites au niveau intestinal. Une irradiation intestinale provoque une augmentation de l'expression d'E-sélectine chez la souris. Elle se traduit 2 h post-irradiation par une augmentation du *rolling*¹⁷⁰. Chez le rat et la souris, une surexpression d'ICAM-1 est observée un jour post-exposition^{171,172}. Cette expression est maintenue jusqu'à 7 jours après stimulation chez le rat¹⁷². Le débit de dose joue un rôle important dans l'intensité de la réponse inflammatoire. Dans les modèles d'irradiation abdominale à dose égale chez le rat, le recrutement des leucocytes est augmenté à fort débit (3 Gy/min) par rapport à des débits plus faibles (0,9 Gy/min)¹⁷³. La P-sélectine est induite à faible et fort débit de dose. Cependant, les forts débits augmentent significativement l'expression de P-sélectine. L'élévation de l'expression d'ICAM-1 est observée à fort débit de dose. Seul le blocage d'ICAM-1 par un anticorps monoclonal, engendre une diminution de l'adhésion radio-induite^{173,174}. Finalement, plusieurs études, notamment menées par Mollà et Panés, suggèrent que la modulation des dommages intestinaux et pulmonaires radio-induits pourraient passer par la modulation d'ICAM-1 dans les phases précoces et de VCAM-1 dans les phases chroniques^{164,168,170,171}.

II.B.3.f.ii. Mécanismes moléculaires et expression des CAM

Des mécanismes directs et indirects permettent en partie d'expliquer l'augmentation de l'expression de la plupart des molécules d'adhésion. En premier lieu, les RI provoquent la production de ROS et de ROI (*Reactive Oxygen Intermediate*)¹⁷⁵. Ces molécules déclenchent un stress oxydatif qui permet l'activation de nombreux signaux cellulaires comme le NF-κB¹⁷⁶. De plus, l'utilisation d'antioxydants a montré des résultats sur la diminution de l'activation de NF-κB et en conséquence sur l'activation de la transcription d'ICAM-1^{162,177-179}. Dans une revue publiée en 2007, Mollà & Panés évoquent une de leurs expériences où l'activation de NF-κB a été mesurée chez le rat recevant une dose de 10 Gy en zone abdominale. NF-κB devient détectable au bout de 30 min et son activation atteint son

maximum 1 heure après irradiation¹⁸⁰, c'est-à-dire, avant l'expression d'ICAM-1. Or, plusieurs études ont démontré que NF-κB était capable d'induire ICAM-1 *in vitro*^{181,182}. Les auteurs suggèrent donc que l'induction radio-induite d'ICAM-1 pourrait être provoquée par NF-κB¹⁸³. D'autres facteurs de transcription comme AP-1 ont été étudiés chez la CE en contexte hypoxique et inflammatoire : ce dernier semble influencer l'expression d'ICAM-1 indépendamment de NF-κB¹⁸⁴. D'autre part, les RI sont aussi capables d'induire la libération rapide de vWF et de P-sélectine en provoquant la fusion des WPB avec la membrane¹⁸⁵. L'activation des intégrines et l'activation de jeux de cytokines participent à l'action pro-adhésive des RI. L'expression d'ICAM-1 en réponse aux RI a été étudiée dans plusieurs modèles cellulaires. Il semble que son induction puisse être provoquée de manière cytokine-dépendante (IL-1 et TNF-α), ou indépendamment des cytokines^{161,186}.

La modulation de l'expression des molécules d'adhésion à la surface des CE et des cellules circulantes a une influence décisive sur l'interaction cellule-cellule et cellules-MEC. Cela joue un rôle primordial dans la propagation des lésions radio-induites dans les tissus sains¹⁶². Dans la pathogenèse de la toxicité radio-induite aux tissus sains, l'inflammation et l'infiltration leucocytaire sont des événements déterminants. De très nombreuses molécules impliquées dans le *rolling*, l'adhésion et la transmigration des leucocytes à travers l'endothélium participent au continuum d'évènements menant à l'inflammation et la fibrose radio-induite. On peut ainsi citer ICAM-1, VCAM-1, les intégrines β_1 et β_2 et PECAM-1^{73,163,166,185,187-189}. La dose, le débit de dose et le fractionnement peuvent influencer le recrutement leucocytaire, à travers l'expression de ces molécules d'adhésion. Par exemple dans un modèle d'irradiation du cerveau chez la souris, une dose fractionnée de 40 Gy induit une expression d'ICAM-1 d'un facteur 3,5 quand une dose de 20 Gy non fractionnée l'augmente 14 fois¹⁹⁰.

II.B.3.f.iii. Recrutement des cellules inflammatoires

L'expression par les CE et les tissus sous-jacents de cytokines pro-inflammatoires, l'augmentation de la perméabilité endothéliale par le relâchement des jonctions cellulaires, ainsi que l'expression des molécules d'adhésion concourent à donner à l'endothélium irradié un état activé. Le recrutement des cellules circulantes qui en résulte provoque l'apparition d'infiltrats inflammatoires dans les tissus lésés. Chez le rat, une irradiation abdominale de 20 Gy permet, 6 h plus tard, l'observation d'un infiltrat inflammatoire dans les tissus¹⁹¹. Toujours chez le rat, suite à une irradiation colorectale à une dose de 22,5 Gy, les neutrophiles sont identifiés dans les tissus jusqu'à 6 jours après traitement¹⁷². Chez la souris, des infiltrats de mastocytes ont pu être observés jusqu'à 14 semaines¹⁴⁴. Dans le cas des irradiations thoraciques chez la souris, des infiltrats leucocytaires ont pu être observés jusqu'à 5 semaines^{167,168}. L'irradiation du rein à 14 Gy chez la souris permet l'observation de macrophages infiltrant jusqu'à 30 semaines¹⁹². Enfin, chez les patients traités par RT, des infiltrats leucocytaires

ont pu être observés : ils se composent principalement de neutrophiles, macrophages et lymphocytes T^{187,193,194}.

II.B.4. La dysfonction endothéliale radio-induite, une notion ambiguë ?

La notion de dysfonction endothéliale radio-induite (DERI) est souvent évoquée pour caractériser l'endothélium irradié. Cependant, cette appellation peut prêter à confusion. Certains l'utilisent pour parler de dysfonctionnement du tonus vasculaire, d'autres, comme nous ici, pour évoquer la perte des fonctions physiologiques de l'endothélium dans son ensemble. Les deux notions sont bien sûr liées, mais la précision est importante.

Au sens de la dysfonction du tonus vasculaire, la DERI correspond au symptôme cliniquement identifiable que l'on retrouve également lors du développement de l'athérosclérose. Dans ce cas, la DERI est reliée à une modification de la production de NO. Elle prend tout son sens lors de l'étude des vaisseaux de moyen et de gros calibre. Les gros vaisseaux sont particulièrement exposés lors des RT en zone thoracique (cancers du poumon et du sein) ou en zone ORL (cancers de la tête et du cou). Comme dans le cas des maladies inflammatoires chroniques, la DERI a été reliée à une augmentation du risque de maladie cardio-vasculaire^{107,195}. Parallèlement, on observe dans les artères de gros calibre des lésions de types athérosclérotiques. Cependant, il est difficile de faire la part entre les lésions radio-induites et les lésions liées à l'âge^{103,196}. Dans les modèles prédisposés au développement de ce symptôme (souris ApoE -/-), l'irradiation provoque une accélération dans le développement de l'athérosclérose^{102,197}. A ce jour, le lien entre dysfonction du tonus vasculaire radio-induit, accélération du développement des lésions athérosclérotiques et augmentation du risque cardio-vasculaire n'est pas formellement établi. Malgré tout, ces éléments soulignent l'intérêt de l'étude du réseau vasculaire dans la prévention des dommages radio-induits. Finalement, la DERI peut aussi prendre le sens de perte globale des fonctions de l'endothélium physiologique.

Les mécanismes décrits dans l'endothélium irradié présentent de nombreux points de ressemblance avec ceux observés dans les MIC, tant au niveau cellulaire que moléculaire. A ce titre, il existe un fort intérêt à s'inspirer de l'étude des maladies inflammatoires pour mieux comprendre les mécanismes à l'origine des dommages radio-induits. Justement, nous avons vu que l'endothélium est l'acteur central de la réponse inflammatoire et de la réponse radio-induite. Le recrutement des cellules immunitaires et leur infiltration vers la lésion radio-induite sont notamment permis par la surexpression endothéliale des molécules d'adhésion. Lors de stimuli inflammatoires des MIC et dans les processus cancéreux, le recrutement des cellules circulantes est influencé par la présence membranaire de structures glycaniques tant sur les leucocytes que sur les CE. La présence de ces sucres pourrait aussi influencer le recrutement radio-induit des cellules circulantes.

III. La glycosylation, composante clé de l'organisation du vivant

III.A. Le glycome

Les glucides sont, avec les acides nucléiques, les protéides et les lipides, un des quatre composants clés du vivant. Ces molécules sont présentes chez tous les organismes, qu'ils soient d'origine procaryote ou eucaryote. Elles sont indispensables au maintien de la vie en intervenant dans toutes les fonctions cellulaires. La glycosylation est à l'origine d'un répertoire riche et varié de structures glycaniques. Ce répertoire, produit par et présent sur les cellules, est désigné sous le terme de glycome. Comme le protéome, le glycome intègre une notion dynamique : en effet, il ne s'agit pas d'un répertoire figé, mais d'un ensemble de structures interdépendantes et systématiquement remodelé¹⁹⁸⁻²⁰¹.

III.A.1. Notions structurales sur l'assemblage des glycanes

Chez les Mammifères, 9 monosaccharides de bases suffisent à générer plus de 7000 structures glycaniques. Ces 9 monomères sont le galactose (Gal), le glucose (Glc), le mannose (Man), le fucose (Fuc), la *N*-acétylgalactosamine (GalNAc), la *N*-acétylglucosamine (GlcNAc), l'acide glucuronique (GlcA), l'acide sialique (SA ou NeuAc) et le xylose (Xyl) (*Figure 9*).

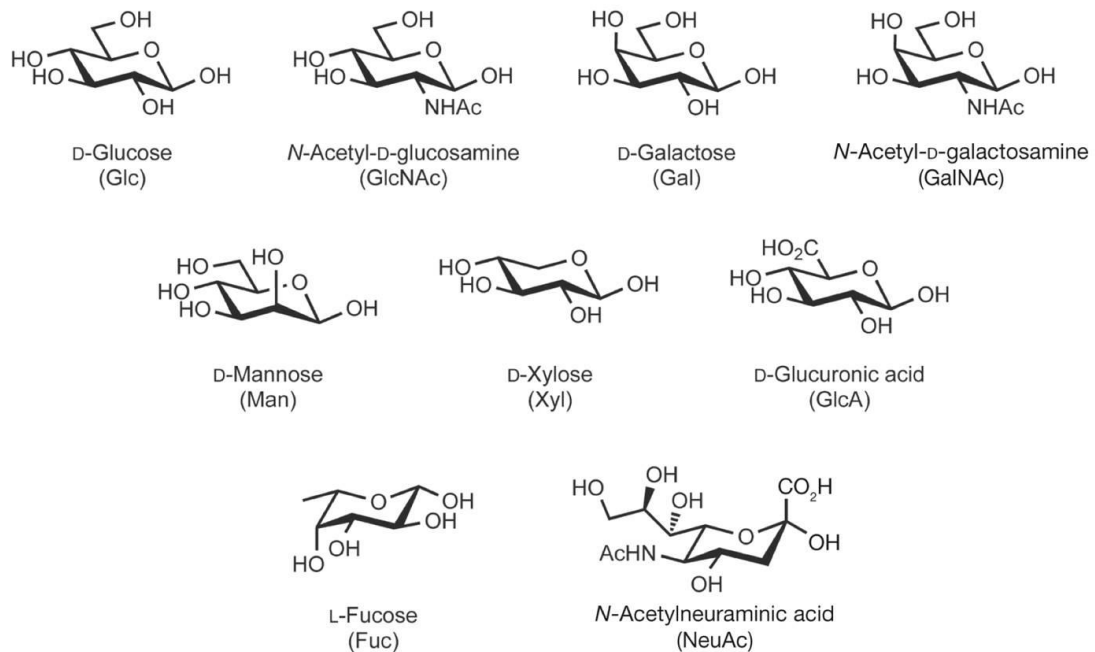


Figure 9 : les 9 principaux monosaccharides retrouvés chez les Mammifères, l'acide *N*-acétyl neuraminique (NeuAc) est le plus commun des acides sialiques²⁰².

La liaison osidique s'effectue entre le groupement hémiacétalique réducteur du monosaccharide accepteur et l'un des hydroxyles libres présents sur un autre ose (liaison holoside) ou sur un aglycone (liaison hétéroside) En fonction de l'anométrie α ou β du monosaccharide accepteur, on obtient une liaison α ou β (*Figure 10* et *Tableau 4*)

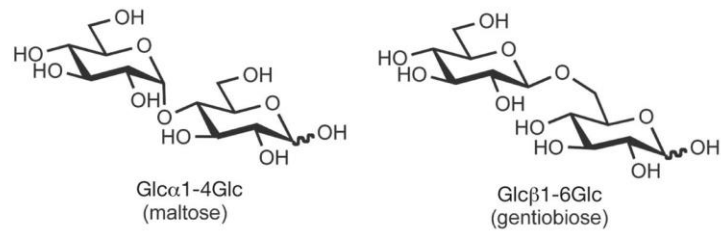


Figure 10 : exemple de deux isomères différant par leur liaison osidique α ou β (d'après Bertozzi *et al.* 202).

Tableau 4 : les 9 principaux oligosaccharides utilisés dans les processus de glycosylation et les liaisons qu'ils peuvent établir (d'après Ohtsubo *et al.* 199).

DONORS	PROTEIN AND LIPID ACCEPTORS									SACCHARIDE ACCEPTORS								
	Ser/Thr (O-glycans, O-GlcNAc, glycosaminoglycans)	Asn (N-glycans)	hLys (Collagen-like domains)	Trp (RNase 2, IL-12, properdin)	Tyr (Glycogenin)	Cer (Glycolipids)	PI (GPI anchors)	Fucose	Galactose	N-Acetylglucosamine	Glucose	N-Acetylglucosamine	Glucuronic acid	Mannose	Sialic acid	Xylose		
GDP- \triangle	α 1	-	-	-	-	-	-	-	α 1-2	-	-	α 1-3 α 1-4 α 1-6	-	-	-	-		
UDP- \circ	-	-	β 1	-	-	β 1	-	-	α 1-3 α 1-4 β 1-3	β 1-3	β 1-4	β 1-3 β 1-4	-	-	-	β 1-4		
UDP- \square	α 1	-	-	-	-	-	-	-	α 1-3 β 1-3 β 1-4	α 1-3 α 1-6	-	β 1-4	β 1-4	-	-	-		
UDP- \bullet	β 1	β 1	-	-	α 1	β 1	-	β 1-3	α 1-2	-	α 1-2 α 1-3	-	-	α 1-3	-	-		
UDP- \blacksquare	β 1	*	-	-	-	-	α 1	β 1-3	β 1-3 β 1-6	β 1-6	-	α 1-6 β 1-4	α 1-4 β 1-4	β 1-2	-	-		
UDP- \blacklozenge	-	-	-	-	-	-	-	-	β 1-3 β 1-4	β 1-3	-	β 1-3 β 1-4	-	-	-	-		
GDP- \circ	α 1	-	-	α 1	-	-	-	-	-	-	-	α 1-4 β 1-4	-	α 1-2 α 1-3 α 1-6	-	-		
CMP- \blacklozenge	-	-	-	-	-	-	-	-	α 2-3 α 2-6	α 2-6	-	-	-	-	α 2-8	-		
UDP- \star	β 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	α 1-3	-	-	-	-	α 1-3		

Chez les Mammifères, 1 à 2 % du génome est consacré à l'encodage de près de 700 enzymes qui permettent l'assemblage des 9 monosaccharides^{199,203-205}. Parmi les 700 enzymes de glycosylation connues, on compte 200 glycosyl-transférases. Ces enzymes ajoutent des monosaccharides sur les structures acceptrices. Les monomères ajoutés proviennent de nucléotides-sucres ou de lipides-sucres qui constituent des donneurs activés²⁰⁶. La compétition entre les glycosyl-transférases pour l'addition sur un même site accepteur d'une part, et pour l'utilisation de différents donneurs de monosaccharides d'autre part, influence grandement l'abondance relative des structures du glycome à l'échelle cellulaire ou tissulaire. A l'échelle cellulaire, la synthèse des glycanes dépend de multiples facteurs comme l'abondance relative des différentes enzymes de glycosylation, leur localisation,

l'abondance et le trafic des différents accepteurs, et enfin la disponibilité des différents donneurs activés dans les compartiments appropriés²⁰⁶.

La glycosylation produit donc de nombreux types de glycanes, qui peuvent être attachés aux protéines ou aux lipides pour donner des glycoconjugués. La glycosylation des protéines est de loin le processus le plus étudié. Nous donnerons plus de détails par la suite sur les trois grands types de glycosylation des protéines, à savoir la N-glycosylation, la O-glycosylation et la synthèse des glycosaminoglycanes (GAGs).

III.A.2. Glycoprotéines

Une glycoprotéine est une protéine ayant subi l'ajout d'un ou plusieurs glycanes au cours de son processus de biosynthèse. Cet ajout peut intervenir sur un ou plusieurs acides aminés qui constitueront des sites de glycosylation. En fonction des acides aminés choisis comme site de liaison, de la nature et de la structure des glycanes, on pourra distinguer différents types de glycoprotéines. La glycosylation des protéines est une modification post- ou co-translationnelle ubiquitaire que l'on retrouve chez toutes les formes de vie. Chez l'Humain, environ 80 % des protéines de surface, ainsi que 5 % des lipides, sont glycosylés²⁰⁷. Grâce à la complexité de leurs structures dans les systèmes eucaryotes, les structures glycaniques occupent des rôles physiologiques cruciaux qui vont du repliement et du contrôle qualité des protéines à de nombreux processus de reconnaissance cellulaire²⁰⁶.

La glycosylation des protéines représente un niveau d'information supplémentaire. Le message porté par les glycanes se superpose à celui de la protéine exprimée par les mécanismes de transcription-traduction. La glycosylation joue un rôle primordial dans l'acquisition de la fonction des protéines et influence leurs propriétés tant au niveau cellulaire que moléculaire²⁰³. La synthèse des glycanes permet la création de structures branchées qui apportent une diversité structurale bien plus variée que des structures linéaires comme les chaînes d'acides aminés (polypeptides/protéines) ou les chaînes d'acides nucléiques (ADN et ARN)²⁰³. D'autre part, la complexité des voies de biosynthèse et la compétition existant entre les enzymes de glycosylation, tant pour l'exploitation des molécules donneuses de monosaccharides que pour la création ou l'allongement d'une chaîne de glycanes, conditionnent la structure glycanique produite^{205,208}.

En définitive, la synthèse des glycoprotéines est soumise à de nombreux facteurs. Il est donc courant d'obtenir un ensemble varié de structures branchées avec un niveau de complexité plus ou moins élaboré ou abouti. Ce phénomène est désigné comme la « micro-hétérogénéité » des glycoprotéines. Cela signifie que, pour un site de glycosylation donné et dans des conditions données, on observera toujours un spectre plus ou moins large de variations dans les structures glycaniques synthétisées.

Ces variations sont encore plus importantes lorsqu'on change de type cellulaire et/ou de site de glycosylation. Ainsi, une protéine existe toujours sous plusieurs glycoformes (bien qu'elle soit codée par le même gène). D'un point de vue mécanistique, la micro-hétérogénéité s'explique par la rapidité avec laquelle les multiples réactions de glycosylation et de déglycosylation partielles et plus ou moins séquentielles interviennent au sein du réticulum endoplasmique (RE) et de l'appareil de Golgi (Golgi). Elle pourrait également s'expliquer par une subtile variabilité intercellulaire, tissulaire, voire individuelle, dans le processus de glycosylation. Quelle qu'en soit l'origine, ce phénomène rend la caractérisation des glycoprotéines particulièrement ardue. D'un point de vue fonctionnel, l'intérêt de ce phénomène reste obscur²⁰⁹.

III.A.2.a. N-glycosylation

La N-glycosylation des protéines lie le glycane au polypeptide au niveau d'un atome d'azote porté par une asparagine. Au moins 5 types de liaisons N-glycaniques ont été reportés. Dans la majorité des cas, il s'agit d'une liaison N-β-glycosylamine entre l'hémiacétate d'une GlcNAc et la fonction amine du résidu Asn, formant un GlcNAc(β1-)Asn N-glycane, que l'on désignera par la suite N-glycane. Dans cette liaison, le premier monosaccharide de la chaîne glycanique est nécessairement une GlcNAc et le site peptidique de glycosylation répond au motif « Asn-X-Ser/Thr », ou X représente n'importe quel acide aminé à l'exception de la proline. Dans des cas plus rares, les motifs « Asn-X-Cys » ou « Asn-Gly-Gly-Thr » peuvent permettre d'établir la liaison N-glycanique^{210,211}.

III.A.2.a.i. Synthèse

Tous les N-glycanes partagent une structure pentasaccharidique branchée commune : le noyau Man α1-6(Manα1-3)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-Asn-X-Ser/Thr. Ce noyau possède deux « bras » Manα1-3 et Manα1-6. Les N-glycanes sont classés en 3 types : hautement mannosylés (ou oligomannosidiques), hybrides et complexes.

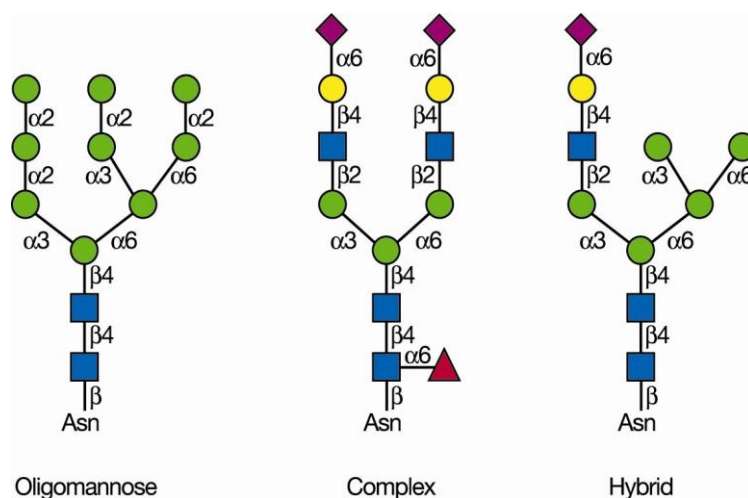


Figure 11 : les 3 grands types de N-glycanes (d'après Stanley *et al* ²¹¹).

Chez les hautement mannosylés, seuls des mannoses complètent le noyau pentasaccharidique. Chez les hybrides, le bras $\text{Man}\alpha 1-6$ conserve ces résidus Man. Le bras $\text{Man}\alpha 1-3$ accueille alors une ou deux « antennes », initiées par l'ajout d'une GlcNAc par une N-acétylglucosaminyltransférase (GlcNAcT). Enfin, les N-glycanes complexes possèdent une ou plusieurs antennes sur chacun de leurs bras.

La synthèse des N-glycanes débute à la face cytoplasmique du RE. La première étape consiste en la synthèse d'une structure glycanique liée au dolicholphosphate (Dol-P), un lipide de la membrane du RE : la **Figure 12** résume l'ensemble des étapes de la synthèse du précurseur des N-glycanes.

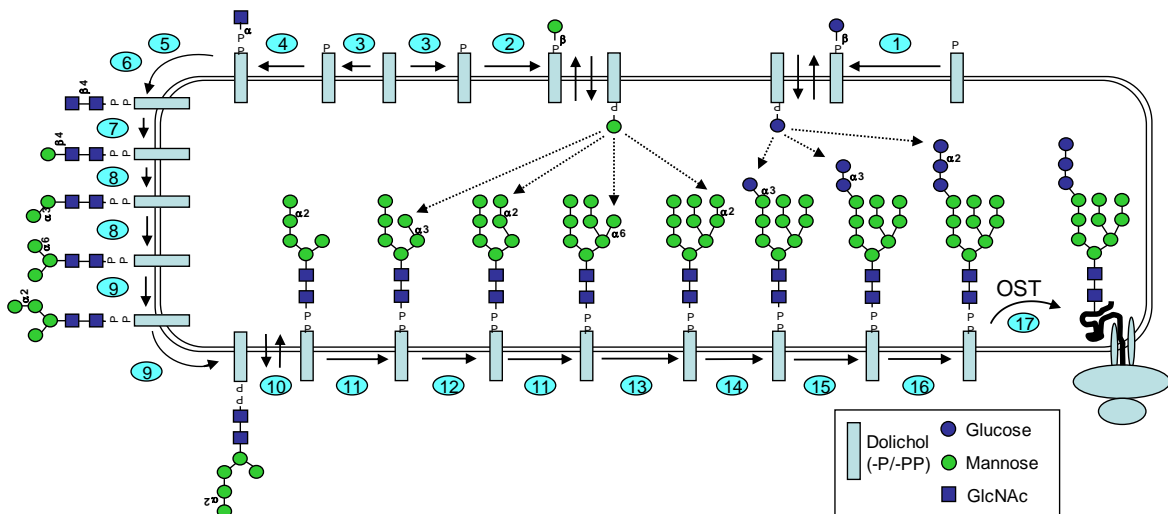


Figure 12 : synthèse dans le RE du précurseur de la N-glycosylation (d'après Nairn *et al.* 208).

Une première structure Dol-P-P-GlcNAc₂Man₅ est séquentiellement assemblée sur le Dol-P à la surface externe du RE. Sa synthèse fait intervenir UDP-GlcNAc et GDP-Man comme donneurs, et les glycosyltransférases membranaires de la famille des ALG. Puis la structure est transloquée à la face luminale du RE lors d'une étape appelée « Flip » faisant intervenir l'enzyme flipase. La synthèse du précurseur des N-glycanes se poursuit en utilisant les mêmes donneurs et des enzymes de la même famille pour aboutir à la formation d'une structure à 14 monosaccharides : le dolichol-P-P-GlcNAc₂Man₉Glc₃. Cette structure est transférée sur l'asparagine (Asn-X-Ser/Thr) d'un polypeptide en cours de synthèse grâce au concours des oligosaccharyltransférases (OST). Les OST sont des protéines transmembranaires formant chez les Mammifères des complexes avec les protéines Stt3p responsables du clivage de la liaison de haute énergie entre le phosphate du dolichol et la GlcNAc du glycanes, puis du transfert du glycanes sur la protéine naissante. (Les enzymes correspondant aux différentes étapes numérotées sont listées en ANNEXE IV.A.)

La glycosylation des protéines est souvent considérée comme une modification post-traductionnelle, au même titre que la méthylation ou la phosphorylation. Dans le cas de la N-glycosylation, il est plus exact de parler de modification co-traductionnelle puisque la liaison N-glycanique est établie en cours de synthèse protéique.

Suite à la liaison du précurseur des N-glycanes (Glc₃Man₉GlcNAc₂Asn) sur le résidu Asn, les N-glycanes subissent des étapes de « trimming » dans le RE et dans l'appareil de Golgi. Le trimming des N-glycanes consiste en l'élimination séquentielle de résidus Glc et Man à l'extrémité du précurseur. En premier lieu, les α -glucosidases I et II suppriment les 3 résidus Glc à l'extrémité du bras $\text{Man}\alpha 3$ dans le RE (le résidu $\alpha 1-2$ Glc par l' α -glucosidase I puis les deux résidus $\alpha 1-3$ Glc par l' α -glucosidase II). La

structure obtenue $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ est de type hautement mannosylé. Dans un deuxième temps, les structures oligomannosidiques sont remaniées par *trimming* de leurs extrémités mannose. Entre le RE et le cis-Golgi, les mannosidases I suppriment les résidus Man passant ainsi de la structure $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ à la structure $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$. Dans le RE, l' α -mannosidase-I élimine le mannose en α 1–2 de la branche centrale. Dans le Golgi, le *trimming* des résidus α 1–2Man se poursuit et aboutit, suite à l'action des α 1–2 mannosidases IA, IB, et IC, au $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (voir **Figure 13**). Il existe également dans le RE une α -mannosidase I-like, nommé EDEM-1 (*ER degradation-enhancing α -mannosidase I-like protein*). Elle intervient dans la reconnaissance des protéines mal repliées et permet leur adressage aux systèmes de dégradation du RE.

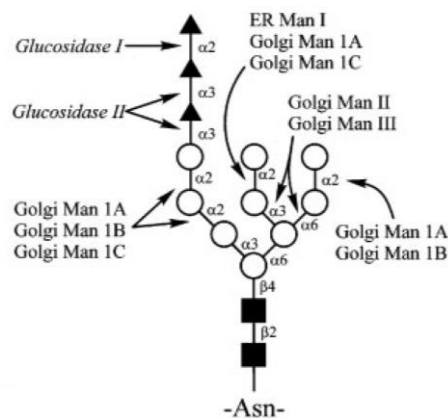


Figure 13 : *trimming* des mannoses et des glucoses sur le N-glycane (d'après Vallejo et al²¹²).

La biosynthèse des structures hybrides et complexes est initiée dans le Golgi médian grâce aux enzymes de glycosylation de la classe des N-acétylglucosaminyltransférases. Ces enzymes ajoutent des résidus GlcNAc à l'extrémité des bras des N-glycanes oligomannosidiques. Ce résidu GlcNAc est le point de départ des antennes présentes dans les N-glycanes hybrides et complexes. La création de la première antenne est catalysée par l'enzyme GlcNAcT-I, qui ajoute une GlcNAc sur le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ au niveau du C-2 du mannose en α 1–3. Le N-glycane hybride le plus simple est ainsi créé. Une fois cette première antenne synthétisée, la plupart des N-glycanes subissent un deuxième *trimming* dû aux α -mannosidases de type II. Ce groupe d'enzymes élimine les mannoses terminaux en α 1-3 et α 1-6 de la branche α 1-6. Elles permettent le passage de la forme $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ à la forme $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$. L'apposition de la première antenne est un prérequis obligatoire avant l'action des mannosidases II. Les structures hybrides sont toutes celles sur lesquelles les mannosidases II n'ont pas ou pas entièrement éliminé les mannoses de la branche $\text{Man}\alpha$ 1-6. Cependant, la première antenne peut être allongée par l'ajout de Gal ou de Neu5Ac. Un fucose peut être ajouté en α 1-6 de la GlcNAc à la base du noyau N-glycanique. Une antenne peut être ajoutée sur le mannose central (lié en β 1-6 du mannose du noyau) grâce à la GlcNAcT-III. La présence de ce résidu GlcNAc dit

« bisecting » inhibe l'action des α -mannosidases de type II. La GlcNAcT-III peut agir sur les structures complexes, mais si elle agit avant la fin du *trimming*, elle maintient les structures sous forme hybride.

Le stade complexe est atteint dès lors que les mannosidases II ont entièrement éliminé les mannoses de la branche Man α 1-6 et qu'un résidu GlcNAc a été ajouté en β 1-2. On obtient alors une structure complexe bi-antennée de forme GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ qui constitue la forme complexe la plus simple. Cette structure peut être antennée par des ajouts de GlcNAc sur les mannoses terminaux par les GlcNAc transférases (GlcNAcT-IV, GlcNAcT-V, et GlcNAcT-VI). La cellule eucaryote peut ainsi générer jusqu'à 7 antennes sur un seul N-glycane complexe. Une fois encore, l'ajout d'un résidu GlcNAc dit « bisecting » (lié en β 1-6 du mannose du noyau) par la GlcNAcT-III inhibe l'ajout d'autres antennes sur les branches Man α 1-3 et Man α 1-6. La **Figure 14** présente l'ensemble des réactions qui conduisent à la formation des N-glycanes hybrides et complexes.

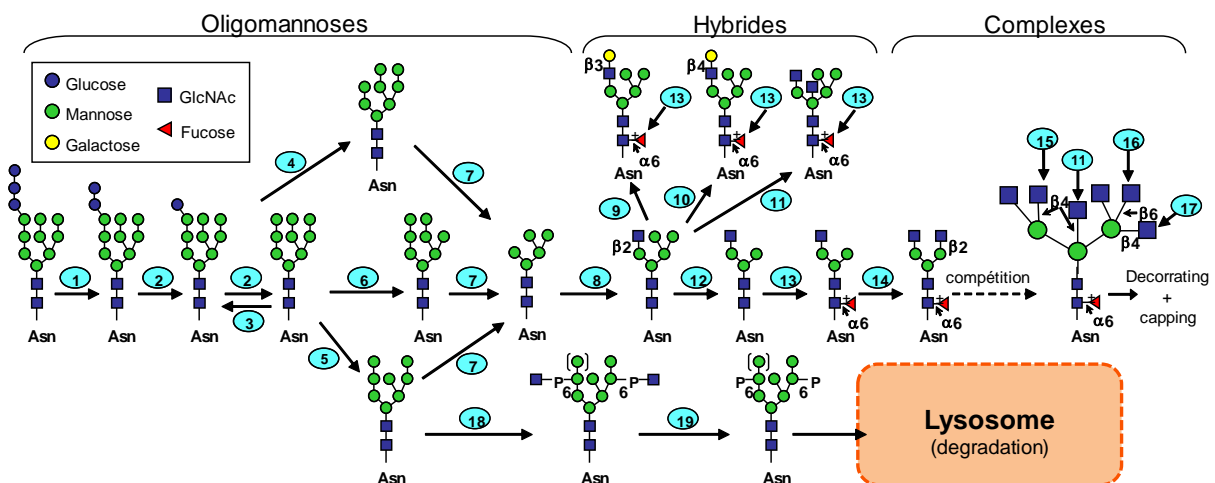


Figure 14 : synthèse des N-glycanes (d'après Nairn *et al.* ²⁰⁸).

NB : les enzymes correspondant aux différentes étapes numérotées sont listées en ANNEXE IV.B.

Les antennes des N-glycanes hybrides et complexes peuvent être allongées par ajout de galactose, de poly-N-acétyl-lactosamine, d'acide sialique et de fucose. Ces élongations constituent la maturation des N-glycanes. On peut résumer la maturation en 3 grandes étapes : l'addition de sucres sur le noyau hybride ou complexe, l'élongation des antennes par l'ajout de structures répétées, et enfin le « capping » aussi appelé « decorating ». Ces processus ont lieu dans le trans-Golgi et font intervenir des enzymes communes à la synthèse des O-glycanes et des glycolipides (on détaillera ces mécanismes dans la [partie III.A.2.c Structures communes aux différentes glycoprotéines et glycolipides: le capping et decorating](#)).

III.A.2.b. O-glycosylation

La O-glycosylation est une liaison peptide-sucre via un atome d'oxygène (O). Une liaison de nature acétalique est établie entre la fonction alcool (-OH) d'un acide aminé hydroxylé et l'hémi-acétate d'un monosaccharide. Deux acides aminés sont donc susceptibles d'accueillir une liaison O-glycaniques : la sérine et la thréonine. Chez les Mammifères, on dénombre 7 types de O-glycosylation qui diffèrent par la nature du premier monosaccharide lié au polypeptide. A la différence des N-glycanes, il n'existe pas nécessairement de séquence peptidique consensus définissant un site de O-glycosylation. Nous détaillerons la synthèse de deux types de O-glycanes : les mucines dont le premier sucre est un résidu GalNAc, et les glycosaminoglycanes (GAGs) dont le premier sucre est un xylose (voir [Figure 15](#)). Les cinq autres types ne seront pas décrits dans ce manuscrit.

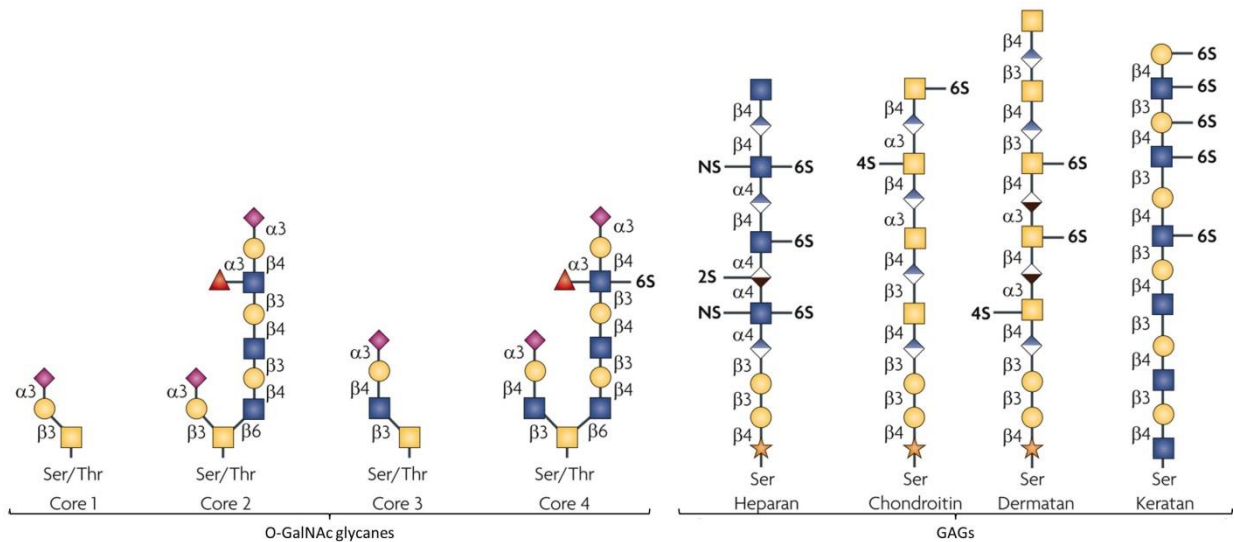


Figure 15 : Principales structures de O-glycanes (d'après Marth *et al.*²⁰⁰).

III.A.2.b.i. La O-glycosylation de type mucines (Glycanes O-GalNAc)

Le premier sucre des O-glycanes de type mucine est une N-Acetyl galactosamine liée en α à l'alcool de la sérine ou de la thréonine. Les O-glycanes de types GalNAc-α-Ser/Thr sont les plus répandus. A ce titre, ils sont souvent désignés comme les « O-Glycanes ». Les mucines sont des glycoprotéines fortement O-GalNAc glycosylées. Il arrive donc que pour désigner les O-GalNAc glycanes, on parle de O-glycosylation de type mucine ou plus simplement encore de mucines. Dans la suite de ce mémoire, le terme O-glycane désignera les glycanes de type GalNAc-α-Ser/Thr²¹³.

III.A.2.b.ii. Synthèse des O-glycanes

Contrairement à la N-glycosylation, la O-glycosylation est exclusivement post-traductionnelle. Seules des glycosyltransférases participent à la formation des O-glycanes. Il n'existe pas de précurseur lipidique et pas d'étape de *trimming*.

La première étape de synthèse des mucines est le transfert d'un résidu GalNAc depuis un donneur UDP-GalNAc vers la sérine ou la thréonine d'un polypeptide. Cette réaction est catalysée par une enzyme de la classe des polypeptide-N-acétyl-galactosaminyltransferase (ppGalNACT). On dénombre au moins 21 ppGalNACTs. Il existe un grand degré d'homogénéité pour leurs gènes entre les espèces vertébrées et notamment entre les espèces humaine et murines.

La structure obtenue à l'issue de l'action des ppGalNACTs est de forme GalNAc α -Ser/Thr (aussi appelée antigène Tn). L'addition du ou des sucres suivants via l'action des différentes glycosyltransférases au niveau du médian et du trans-Golgi permet la création des 8 structures essentielles (voir encadrés **Figure 16**). Ces noyaux sont nommés core 1 à core 8. Les cores 1 à 4 sont les plus communs, alors que les cores 5 à 8 sont moins fréquemment synthétisés²¹⁴. L'existence de l'antigène Tn à l'issue du processus de glycosylation est peu commun dans les mucines normales, mais cet antigène est souvent retrouvé dans les mucines dérivées de tissus cancéreux.

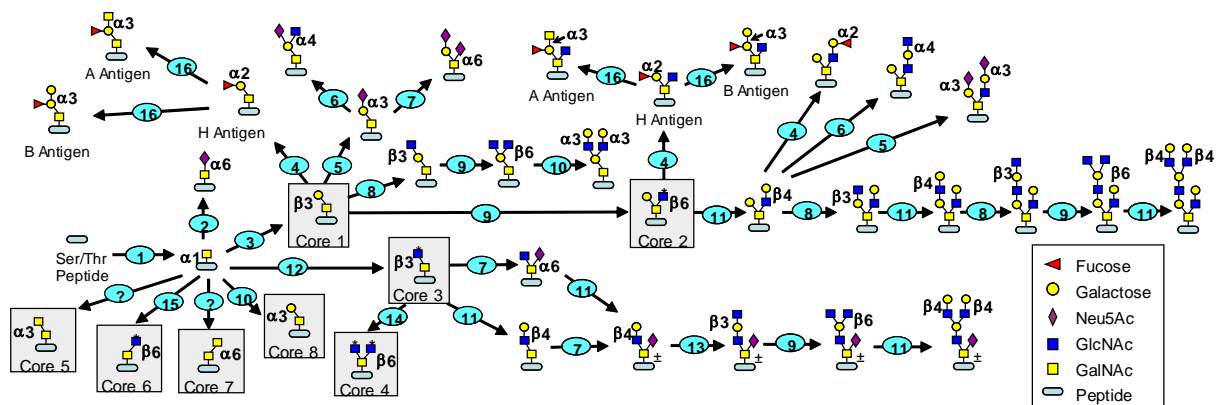


Figure 16 : synthèse et maturation des O-glycanes (d'après Nairn *et al.*²⁰⁸).

Les 8 cores sont obtenus soit directement à partir de l'élongation de l'antigène Tn (cas des cores 1,3, 5-8), soit par élongation d'un autre core (cas des core 2 et 4). Le core 1 est formé par addition d'un résidu Gal lié en β 1-3 sur l'antigène Tn par action de la core 1(β 1-3)-Gal-T. Cette glycosylation ne peut avoir lieu qu'en présence de Cosmc, une protéine chaperonne spécifique qui permet l'acheminement de la core 1(β 1-3)-Gal-T du RE vers le Golgi. L'absence de synthèse de core 1 peut ainsi être due à l'absence de Cosmc ou à un défaut d'activité de la core 1(β 1-3)-Gal-T. Le core 2 est obtenu par ajout d'un résidu GlcNAc en β 1-6 de la GalNAc du core 1, grâce l'action de la core 2 β 1-6 GlcNAc-transférase (C2GnT). On peut donc les décrire comme des core 1 branchés. (Les enzymes correspondant aux différentes étapes numérotées sont listées en ANNEXE 0.)

III.A.2.c. Structures communes aux différentes glycoprotéines et glycolipides: le *capping* et *decorating*

Nous avons vu comment était initiée la synthèse des N- et O-glycoprotéines. Certaines de ses structures sont susceptibles de subir une maturation supplémentaire à l'extrémité de leurs branches portant une GlcNAc. Elles peuvent ainsi subir une élongation, puis des étapes de « *capping* » ou « *decorating* », ces processus étant commun aux N-glycanes, O-glycanes et à certains glycolipides (voir **Figure 17**). Chez les N-glycanes, cette maturation intervient sur les antennes ; pour les O-glycanes elle s'effectue sur les cores 2, 3, 4 et 6. La maturation des O-glycanes de type core 1,

s'effectue sur la branche Gal et n'est pas commune aux autres structures. La **Figure 17** synthétise l'ensemble des étapes de *capping* et de *decorating*.

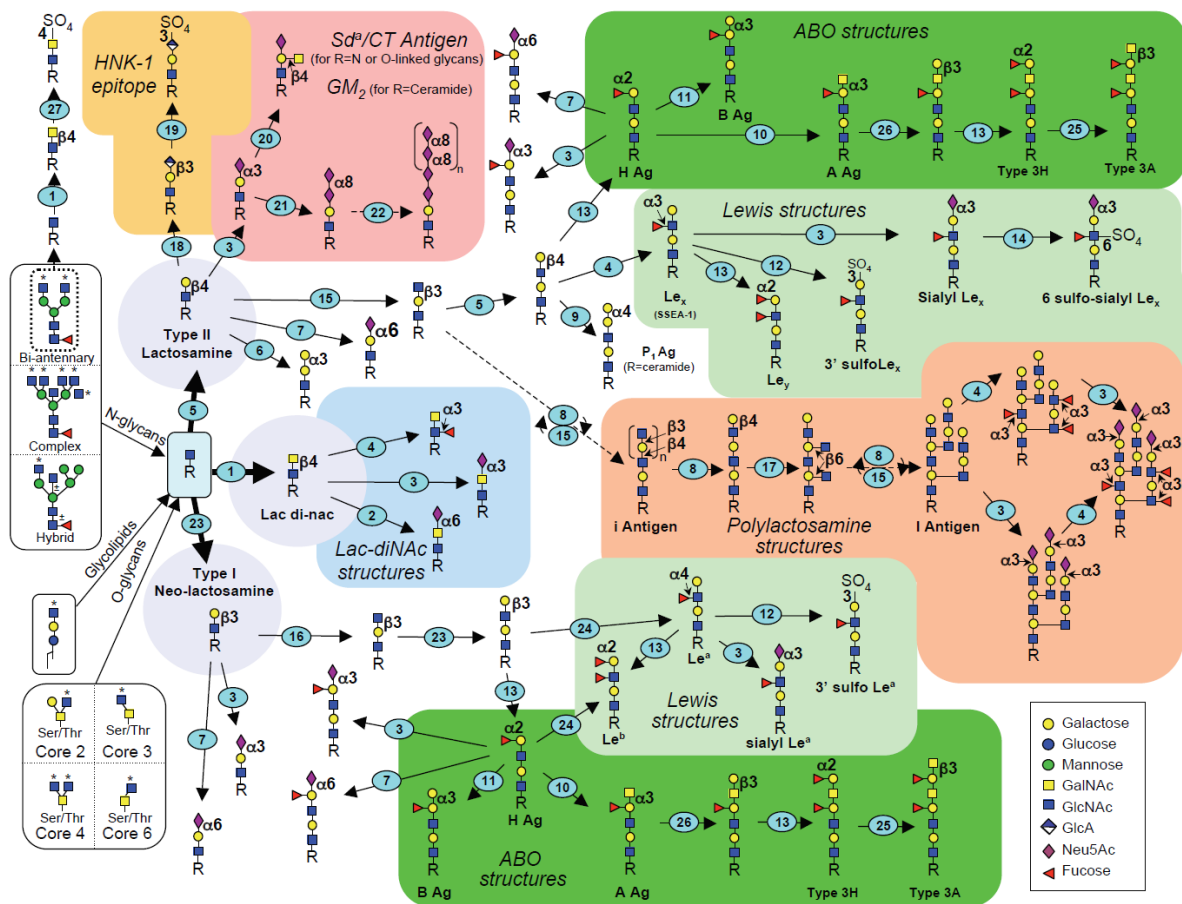


Figure 17 : le decorating et le capping, processus communs au N- et aux O- glycans (d'après Nairn *et al.* ²⁰⁸). L'ajout du premier monosaccharide sur la GlcNAc et son anomérie orientent la maturation vers 3 grandes voies : l'ajout d'un Gal en β 1-4 oriente la synthèse vers la voie des lactosamines (ou type II), l'ajout d'un Gal en β 1-3 vers celle des néo-lactosamines (ou type I) et celle d'une GalNAc en β 1-4 vers la voie des Lac-di-NAc (GalNAc β 1-4GlcNAc). Les voies lactosamines et néo-lactosamines permettent l'élongation des chaînes grâce à l'ajout de structures répétées d'unités N-acétyllactosamines (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)_n. L'ajout de GlcNAc en β 1-6 des résidus Gal permet d'obtenir des structures poly-N-acétyllactosaminiques branchées. Toutes ces structures pourront être complétées par des fucoses : on parle alors de « *decorating* ». Enfin, l'étape de « *capping* » consiste en l'ajout d'acides sialiques ou de groupements sulfates (SO₄) à l'extrémité des chaînes maturées, et signe l'arrêt de l'extension des chaînes et de la maturation ²¹⁵. (Les enzymes correspondant aux différentes étapes numérotées sont listées en ANNEXE IV.D.)

L'ajout des résidus sialyls et sulfates terminaux, ainsi que celui des fucoses (avec des variations d'anoméries de liaisons), est déterminante dans la création d'épitopes dont l'expression est physiologique ou physiopathologique. Deux grands groupes fonctionnels d'épitopes, formés par des combinaisons saccharidiques issues du *decorating* et du *capping*, sont particulièrement étudiés : il s'agit des épitopes des groupes sanguins (A, B, O et H) et des épitopes Lewis (nous reviendrons en *partie III.B.3* sur les épitopes de Lewis). Le *capping* par l'acide sialique ou la sulfatation confèrent aux glycans des propriétés mise à profit dans les phénomènes de reconnaissance cellulaire, notamment dans les interactions entre leucocytes et CE. S'il est possible de dégager des tendances quant aux

fonctionnalités de certains motifs ou l'ajout de certains glycanes, il reste encore aujourd'hui difficile de prédire le rôle fonctionnel de chaque oligosaccharide²⁰⁵.

III.A.3. Protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des glycoprotéines portant un ou plusieurs glycosaminoglycanes (GAGs).

III.A.3.a. Les glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont des polysaccharides chargés, linéaires, composés majoritairement d'un grand nombre de répétitions de séquences disaccharidiques, ce qui en fait des glycanes de haut poids moléculaire. Leur unité dimérique répétée est nécessairement composée d'une osamine¹ (GlcNAc N-substituée ou GalNAc), et d'un acide uronique (GlcA or IdoA) ou un Gal. Les GAGs sont classés en fonction de leur séquence disaccharidique répétée et de l'isomérisation de ces disaccharides. Il existe ainsi 5 types de GAGs, dont quatre peuvent être sulfatés : les chondroïtine-sulfates (CS), les dermatane-sulfates (DS), les héparane-sulfates (HS) (dont l'héparine) et les kératane-sulfates (KS). Le hyaluronane, aussi appelé acide hyaluronique (HA), est un GAG non sulfaté.

Les CS, DS et HS sont liés aux protéines par une liaison O-xylose, ce qui en fait des O-xylosyl glycoprotéines. La liaison O-glycosidique est établie entre le xylose (premier sucre du motif GlcA- β 1,3-Gal- β 1,3-Gal- β 1,4Xyl- β) et une séquence peptidique consensus (Asp/Glu-Asp/Glu-Asp/Glu-Asp/Glu-Gly-Ser-Gly-Asp/Glu-(Asp/Glu/Gly)- Asp/Glu). Les KS sont liées aux protéines par une liaison N-glycosidique, O-GalNAc glycosidique ou O-Man glycosidique. Enfin, l'acide hyaluronique est le seul glycopolymère de type GAG libre : il n'est lié ni à un lipide ni à une protéine. L'héparine peut aussi être trouvée sous forme libre^{206,216,217}.

III.A.3.a.i. Structures et synthèse

Les CS et HS sont ajoutés sur un noyau protéique. La synthèse de ces longues chaînes glycaniques et linéaires a lieu dans l'appareil de Golgi. La formation de l'amorce tétrasaccharidique (GlcA- β 1-3-Gal- β 1-3-Gal- β 1-4-Xyl- β 1) débute cette réaction : elle est commune aux CS/DS, HS. Le xylose est d'abord transféré par les xylosyl-transférases I ou II (XylT1 et XylT2) sur la fonction hydroxyle d'une sérine. Puis deux galactoses sont ajoutés (en β 1-4 et β 1-3) via l'action des Gal-transférases-I (B4GalT7) et II (B3GalT6). Enfin, le résidu GlcA est ajouté par la glucuronosyl-transférase I (B3GAT3) complétant ainsi la séquence²¹⁸. Des modifications de cette amorce peuvent intervenir pendant ou après sa synthèse. L'allongement du tétrasaccharide de base par l'ajout d'un 5^{ème} sucre constitue une bifurcation dans la chaîne de synthèse. Deux types de réactions peuvent survenir : si une β 1-4GalNAc est ajoutée, la synthèse des CS/DS est initiée. A l'inverse, si une α 1-4GlcNAc est ajoutée, la synthèse des HS est amorcée (voir [Figure 18](#)). Les enzymes responsables de l'ajout du premier sucre sur le noyau tétra-

¹ Sucre aminé

saccharidique jouent un rôle de point de contrôle dans la chaîne de biosynthèse. De leur action dépend le type de GAG assemblé. Les sites d'attachement des HS contiennent généralement des clusters d'acides aminés acides contenant entre 7 et 9 résidus sérines. Plusieurs protéoglycanes contiennent des sites d'attachement composés de séquences Ser-Gly répétées et contiguës, qui acceptent préférentiellement les GAGs de type HS plutôt que CS/DS.

III.A.3.a.ii. La synthèse des HS et de l'héparine

L'ajout de la GlcNAC sur l'amorce tétrasaccharidique fait intervenir EXTL3. Cette enzyme fait partie de la famille des exostosines-*like* (EXTL), qui ont une activité GlcNAC-transférase. Il en existe 3 membres (EXTL1-3). EXTL3 reconnaît la séquence d'acides aminés immédiatement adjacente au site de liaison sur la protéine acceptrice. Il est généralement admis que l'ajout de la première GlcNAC sur le noyau tétrasaccharide est le fait d'EXTL3. Cependant, la délétion d'EXTL1 et 2 semble influencer la production des chaînes HS.

Après addition du premier résidu GlcNAC sur le noyau tétrasaccharidique, la polymérisation de la chaîne est effectuée dans l'appareil de Golgi par addition successive de résidus GlcA et GlcNAC. Un complexe formé par les enzymes EXT1 et EXT2 assemble le squelette polysaccharidique [GlcA(β 1-4)GlcNAC(α 1-4)]_n. La longueur de la chaîne construite est variable et dépend du type cellulaire : 40 à 160 dimères peuvent ainsi être assemblés. La chaîne HS peut ensuite subir de nombreux types de modifications. On distingue en général 5 étapes successives dans la maturation des HS :

- La N-déacétylation de résidus GlcNAC le plus souvent suivie d'une N-sulfatation effectuée par les N-déacétylases/N-sulfotransférases (NDST).
- La C5 épimérisation des GlcA par la HS épimérase qui forme des acides iduroniques.
- La 2-O-sulfatation d'une partie des résidus IdoA et dans une moindre mesure de résidus GlcA, par l'action de la 2-O-sulfotransférase (HS2ST ou 2-OST).
- La sulfatation en C6 des glucosamines (GlcN) par les 6-O-sulfotransférases (HS6ST ou 6-OST).
- La sulfatation occasionnelle en C3 des GlcN par les 3-O-sulfotransférases (HS3ST ou 3-OST).

L'héparine est une forme de HS. Elle est fortement sulfatée et contient une proportion importante d'IdoA. Elle est produite exclusivement par les mastocytes. Sa forme pharmaceutique est un puissant anticoagulant qui agit par liaison et activation de l'antithrombine²¹⁹.

III.A.3.a.iii. La synthèse des CS et DS

La synthèse des CS/DS est initiée par le transfert d'une GalNAC sur le tétrasaccharide de liaison. Cette première étape est catalysée par la GalNAcT-I. Puis la polymérisation du squelette polysaccharidique est effectuée par l'action des enzymes de la famille des chondroïtanes synthétases. Les enzymes de cette famille forment un complexe de composition variable (1 à 6 enzymes) possédant les activités

CS-GlcUAT-II ($\beta 1-3$ GlcA-transférase) et GalNAcT-II ($\beta 1-4$ GalNAc-transférase) nécessaires à la synthèse du polymère $[\text{GlcA}(\beta 1-3)\text{-GalNAc}(\beta 1-4)]_n$ ^{216,220}.

A la manière des HS, les CS et DS, une fois leurs chaînes à motifs répétés formées, subissent une maturation. Dans le cas des DS, il existe deux épimérasas : DSEL (*Dermatan Sulfate Epimerase Like*) et DSE (*Dermatan Sulfate Epimerase*) capables d'épimériser l'acide gluconique (GlcA) en acide iduronique (IdoA). Par la suite, les CS et DS peuvent être sulfatés sur leurs résidus GalNAc par des 4-O-sulfotransférases ou des 6-O-sulfotransférases. Des 2-O-sulfotransférases spécifiques sont capables de sulfater l'acide hexuronique GlcA ou IdoA. Dans le cas des CS /DS, l'ordre établi dans le processus de maturation est encore mal connu^{216,221}. La **Figure 18** résume l'ensemble des voies de biosynthèses des CS, DS et HS.

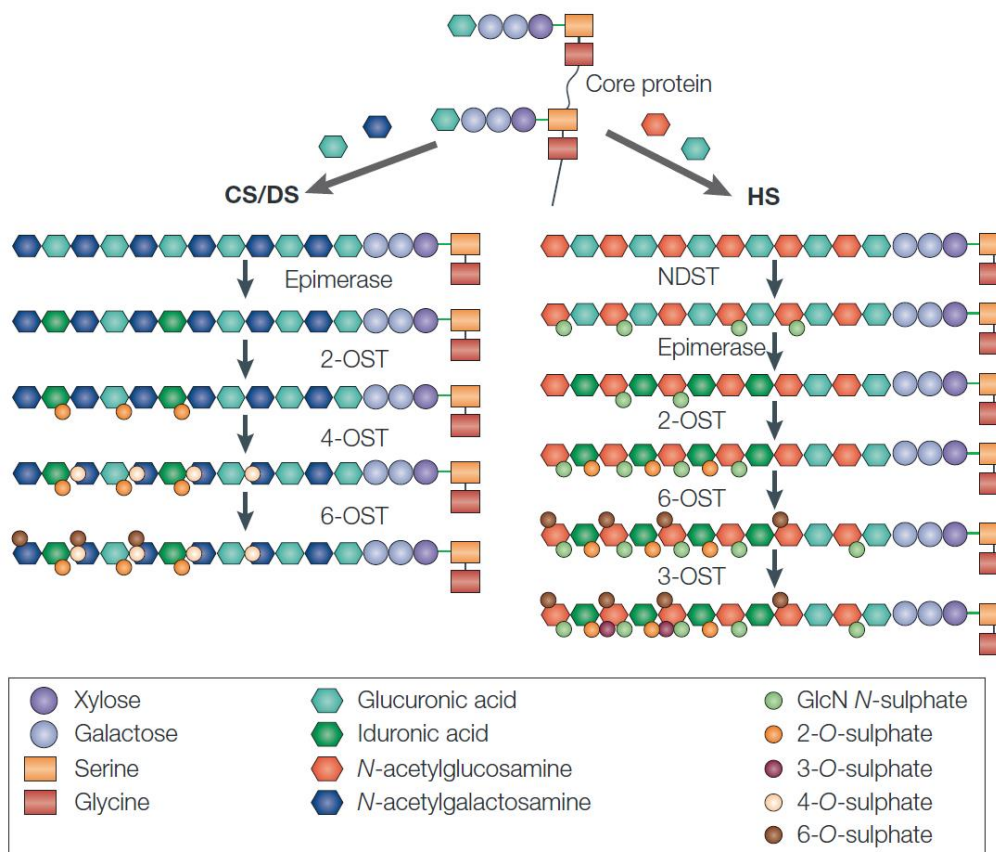


Figure 18 : chaînes de synthèse des HS et CS (d'après Häcker *et al.*²²²).

III.A.4. Autres structures glycosylées

III.A.4.a. Glycolipides

La glycosylation des lipides aboutit à la formation de glycolipides dont la forme la plus répandue est celle des glycosphingolipides. Il s'agit de molécules aliphatiques, dont la partie hydrophobe est composée d'un céramide, et la partie hydrophile d'une chaîne glycanique. Les glycosphingolipides sont ancrés dans la bicouche lipidique par leur partie céramide. Quant à leur extrémité glycanique,

elle est exposée au milieu extracellulaire. Il existe plus de 400 espèces de glycosphingolipides qui diffèrent en fonction de leur partie céramide et de leur chaîne glycanique. La biosynthèse des glycosphingolipides se fait « classiquement » par ajout successif des monomères grâce à l'action d'un jeu de glycosyltransférases. Le premier résidu ajouté est soit un Gal (donnant un galactosylcéramide), soit un Glc (donnant un glucosylcéramide). La biosynthèse débute dans le RE, mais la majeure partie de la synthèse se poursuit dans l'appareil de Golgi. Les galactosylcéramides ont une diversité structurale assez limitée. Les glucosylcéramides ont, en revanche, une diversité structurale bien plus élaborée avec des extensions plus importantes et des branchements plus complexes.^{204,223}

III.A.4.b. GPI-anchored protein

Les glycosylphosphatidylinositols (GPI) sont des glycolipides permettant l'ancrage des protéines aux membranes cellulaires. Les GPI sont liés à l'extrémité C-terminale de la protéine et permettent d'établir une liaison covalente avec la membrane. Les protéines sont dites « *Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins* » (GPIAP). Elles sont exposées à la face externe des cellules. A ce jour, on compte plus d'une centaine de GPIAP chez les Eucaryotes. Chez les Mammifères, elles sont impliquées dans des phénomènes d'hydrolyse, peuvent jouer le rôle de récepteurs ou de molécules d'adhésion et entrent dans la composition de la MEC²⁰⁴.

III.B. Régulation de la synthèse, fonctions et structures associées

La machinerie de glycosylation permet la génération de structures variées dont les fonctions sont multiples. Ce processus s'opère entre le RE et l'appareil de Golgi, puis les molécules glycosylées (glycolipides ou glycopeptides) sont distribuées aux membranes via le trafic cellulaire. La synthèse des molécules et leur adressage sont des processus finement régulés et encore peu documentés à ce jour.

III.B.1. Régulation de la synthèse

Le processus de glycosylation met en jeu des voies de synthèse complexes et interconnectées. Chaque étape de synthèse aboutit à la formation d'une structure, servant de substrat pour une ou plusieurs enzymes de la chaîne de synthèse. Le réseau de synthèse est donc divergeant quand un substrat est la cible de plusieurs enzymes, et convergeant quand plusieurs substrats aboutissent à la même structure (voir [Figure 19](#)). De plus, certaines enzymes ou groupes d'enzymes participent à une ou plusieurs étapes de synthèse, dans des voies parfois différentes. Il existe ainsi une compétition constante entre les enzymes pour l'utilisation des substrats donneurs et accepteurs. L'ensemble de ces processus participent à la régulation de la synthèse glycanique et concourent à l'existence de la micro-hétérogénéité²²⁴. Les variations des structures du répertoire glycanique exprimé à la surface des cellules participent à la fonctionnalité des protéines et peuvent constituer de bons biomarqueurs. Certains cancers sont par exemple diagnostiqués grâce au dosage de l'antigène T, constitué de O-glycanes tronqués¹⁹⁹.

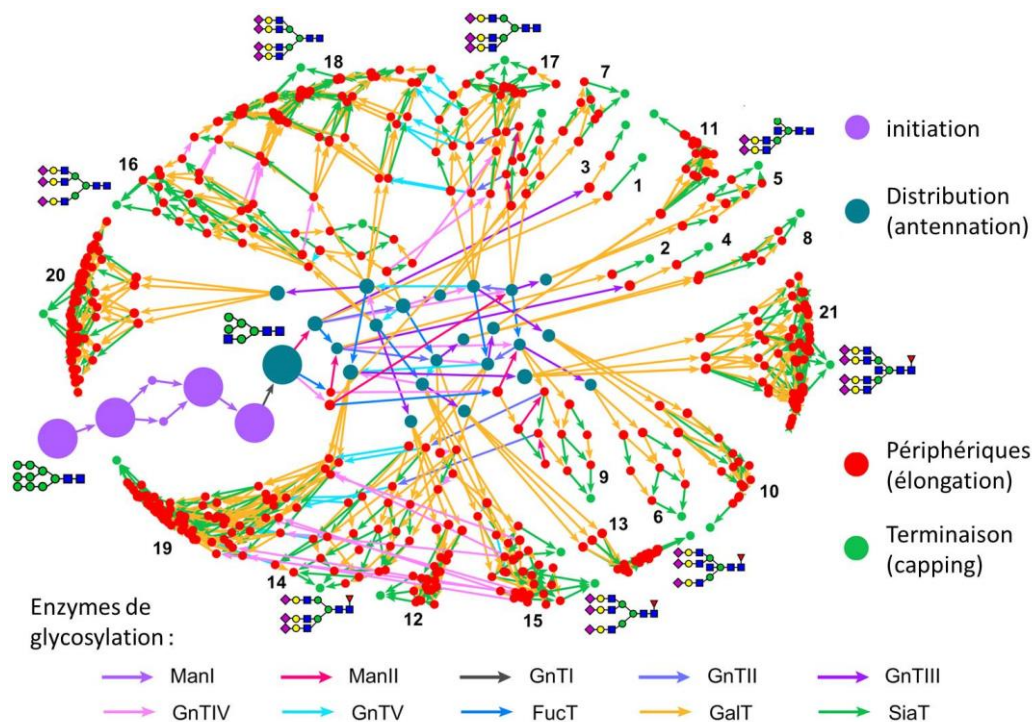


Figure 19 : Représentation de la voie de synthèse des N-glycanes (d'après Kim *et al.* ²²⁴).

Les glycanes sont représentés par des disques et les réactions enzymatiques par des flèches. La couleur des cercles reflète leur position dans la chaîne de synthèse. Dans ce modèle, les auteurs ont distingué : les glycanes à l'origine de la chaîne de synthèse dite d'initiation ; les glycanes de distribution, qui correspondent à l'antennation, permettant l'orientation de la chaîne de synthèse vers les différentes structures terminales ; les glycanes périphériques issus de l'élongation des branches ; les glycanes terminaux, qui sont capés par les acides sialiques et la sulfatation. La taille des cercles est proportionnelle à l'impact de l'absence du glycanes sur la chaîne de synthèse.

Malgré le grand niveau de complexité des chaînes de biosynthèse des glycanes, l'ensemble des études s'accordent sur le fait que le premier niveau de régulation est transcriptionnel. Ainsi des techniques de transcriptomique (PCR quantitative ou puces à ADN) sont couramment mises en œuvre sur les gènes codant pour les enzymes de glycosylation dans les travaux s'intéressant à la régulation de la glycosylation. Ces études transcriptomiques révèlent en partie l'activité de la machinerie de glycosylation^{199,205,208,224,225}. Le couplage de données structurales obtenues par spectrométrie de masse, par utilisation de lectines et par analyse de données transcriptomiques permet ainsi dans la plupart des cas d'établir une corrélation entre la variation de l'expression d'un gène et celle d'une structure glycanique. D'autre part, les miRNA ont récemment été identifiés comme d'importants régulateurs de la synthèse des glycanes. Certains transcrits présentant de hauts potentiels d'interactions ARNm-miRNA ont permis de définir des gènes clés dans la régulation²²⁶. La régulation de la synthèse des enzymes fait donc aussi intervenir des mécanismes post-transcriptionnels, mais aussi post-traductionnels. Cela n'a en général pas d'impact sur l'activité enzymatique, car la plupart des enzymes de glycosylation sont constitutivement actives. Cependant, certaines enzymes ne sont actives qu'en présence d'une glycosylation correcte de leurs sites accepteurs^{199,227}.

La localisation (RE, compartiment golgiens ou cytoplasme) des enzymes, des transporteurs et des accepteurs, joue également un rôle dans la régulation de la synthèse. En effet, la modification de leur localisation peut moduler les interactions donneur-accepteur. L'altération du trafic des glycosyltransférases, peut déboucher sur des modifications du glycome comme celles observées dans les maladies congénitales de glycosylation (CDG : *Congenital Disorder of Glycosylation*). Le trafic Golgien joue un rôle essentiel dans la régulation de la glycosylation, mais il reste à ce jour mal connu. La phosphorylation des glycosyltransférases et des glycosydases peut aussi influencer leur trafic et leur accès aux substrats. La compétition accrue entre les enzymes de glycosylation pour la catalyse d'un même substrat joue également un rôle. En effet, dans une compétition pour le même substrat, la concentration ou l'activité prédominante d'une enzyme peut orienter la voie de synthèse. Des phénomènes protéolytiques peuvent conduire au clivage de l'ancrage Golgien de certaines enzymes de glycosylation. Ce phénomène observé en contexte inflammatoire participe à modifier la balance enzymatique Golgienne. Enfin, il semble que l'endocytose de certaines structures glycosylées en vue de leur dégradation lysosomale puisse constituer un signal pour la synthèse de nouveaux glycanes¹⁹⁹.

Les glycoprotéines peuvent présenter une ou plusieurs séquences consensus acceptrices pour la N- ou la O-glycosylation. Du fait de la régulation de la machinerie de glycosylation, chaque site de glycosylation pourra être glycosylé différemment, aboutissant à la création de plusieurs glycoformes d'une même protéine. Plusieurs études ont démontré que les profils de glycosylation varient de manière significative entre les tissus, et plus encore lors du développement embryonnaire^{205,208}.

III.B.1.a.i. Précisions sur la synthèse des N-glycanes

La régulation des N-glycanes débute avec leur synthèse dans le RE²²⁸. Elle a été particulièrement étudiée dans le cadre des CDG. Ces maladies congénitales affectent très majoritairement les enzymes responsables de la N-glycosylation. La diminution de leurs expressions modifie la maturation et l'adressage des protéines. Cela conduit à des phénotypes pathologiques. Les CDG ont été étudiés avec attention et ont permis de comprendre les paramètres impliqués dans la régulation de la glycosylation. Grâce à l'étude des CDG, on constate encore une fois que la transcription des gènes codants pour les enzymes, les chaperonnes et les transporteurs impliqués dans la N-glycosylation des protéines est une composante clé de la régulation de la synthèse des N-glycanes. Plus récemment l'étude des CDG a révélé que les défauts de glycosylation entraînent également des blocages du trafic des protéines.

Au-delà de la régulation transcriptionnelle, il est suggéré que la disponibilité en substrat des enzymes Golgiennes pourrait être affectée par la séquence protéique ou la conformation des glycoprotéines participant ainsi à la diversité de glycosylation²¹¹. Des études prédictives sur les

réseaux de synthèse N-glycanique pointent également l'importance du temps de maturation Golgien. Plus le temps passé dans le Golgi augmente, plus le nombre de branches synthétisées et la maturation sont aboutis²²⁹. En condition basale, la plupart des N-glycoprotéines existeraient sous leur forme pleinement glycosylée, alors que les formes hypoglycosylées (hautement mannosylées ou hybrides) représenteraient une faible proportion des glycoprotéines exprimées^{230,231}. Enfin, les mécanismes pathologiques chroniques peuvent affecter les voies de dégradation et de synthèse des N-glycanes et réguler certaines branches de la chaîne de synthèse²³².

III.B.1.a.ii. Précisions sur la synthèse des O-glycanes

Au-delà de la régulation transcriptionnelle commune aux N- et aux O-glycanes, les structures des O-glycanes sont en grande partie régulées par les glycosyltransférases à travers leurs fonctions catalytiques. Les glycosyltransférases orientent la chaîne de synthèse en fonction d'une part des substrats catalysables et d'autre part des produits (motifs) synthétisables. Ainsi, l'ajout de structures terminales comme l'acide sialique peut interrompre la synthèse par inhibition de la reconnaissance enzyme/substrat (voir *Figure 20*).

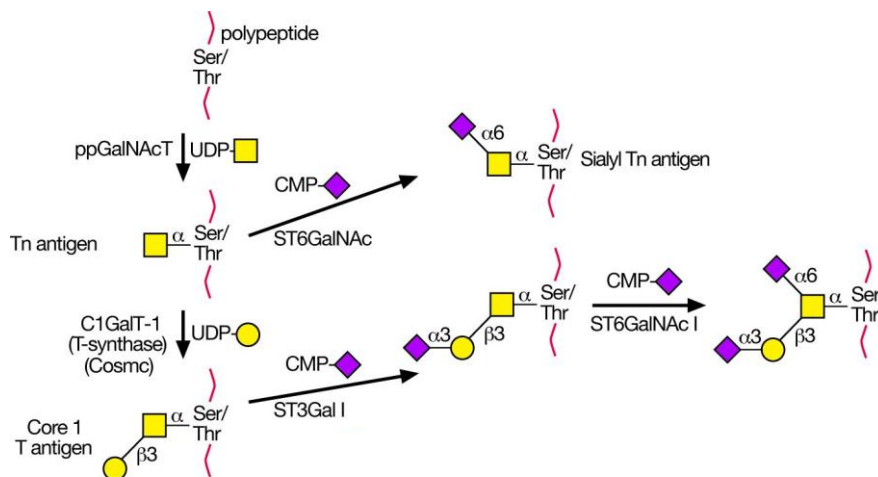


Figure 20 : Exemple d'inhibition (d'après Brockhausen *et al.* ²¹³).

Suite à l'ajout du premier GalNAc sur le résidu Ser/Thr (création de l'antigène Tn), une sialylation en α-6 peut avoir lieu grâce à l'action de la ST6GalNAc : l'antigène Tn-sialylé est ainsi synthétisé. Cet ajout bloque l'action des autres glycosyltransférases. Si l'antigène Tn avait d'abord été transformé en core 1, la sialylation sur le premier GalNAc aurait aussi pu avoir lieu.

La O-glycosylation a essentiellement lieu dans le Golgi. Cependant, la localisation des glycosyltransférases joue un rôle important car elle régule l'accessibilité du substrat à transformer. De récents travaux montrent que la translocation des GalNAc-transférases du Golgi vers le RE pourrait expliquer la forte expression de l'antigène Tn dans les tissus cancéreux^{233,234}. Enfin, la O-glycosylation peut être dépendante de la co-expression d'autres protéines : ainsi la core 1 GalT-1 nécessite la chaperonne Cosmc pour transformer son substrat²¹³.

De nombreux stimuli physiologiques ou physiopathologiques sont capables de réguler ou déréguler la machinerie de glycosylation²³⁵⁻²³⁸. Nous reviendrons en partie IV *Le glycome endothélial en contexte inflammatoire*, sur les phénomènes, notamment inflammatoires, et leurs actions sur le profil de glycosylation des CE.

III.B.2. Structure et fonction

III.B.2.a. Structure

La régulation de la synthèse des glycanes aboutit à plusieurs niveaux de structure, participant à la micro-hétérogénéité des glycoconjugués. Le premier niveau est l'occupation ou non d'un site accepteur. La composition en monosaccharides permet la formation d'épitopes variés, du fait de la régulation de la synthèse, et constitue un deuxième niveau. Enfin, le troisième et dernier niveau est acquis par l'ajout de structures comme les acides sialiques ou des groupements sulfates (voir *Figure 21*). Cette complexité structurale participe activement aux fonctions occupées par les glycanes²³⁹.

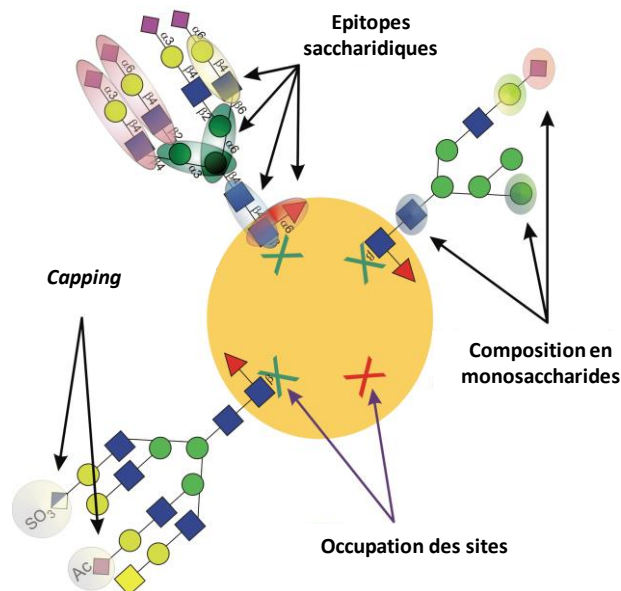


Figure 21 : illustration des différents niveaux de modifications participant à la micro-hétérogénéité glycanique (d'après Defaus *et al.*²³⁹).

III.B.2.b. Fonctions

Les glycanes associés aux protéines et aux lipides participent à de nombreuses fonctions cellulaires. A la surface des cellules, ils sont en interaction avec l'environnement extracellulaire et servent ainsi de ligand pour l'adhésion de cellules ou la fixation de macromolécules ou de pathogènes. Par exemple, les glycanes associés aux récepteurs membranaires peuvent moduler directement les fonctions de ces derniers et la signalisation cellulaire. Ils peuvent également influencer l'endocytose de glycoprotéines et leur demi-vie par interaction avec des lectines multivalentes (ex : galectines)²⁴⁰. Les structures glycaniques contrôlent également la sécrétion des glycoprotéines après leur synthèse. En effet, elles participent au repliement des protéines, fournissent des ligands pour les lectines

chaperonnes, contribuent à la surveillance du contrôle qualité au sein du RE et enfin, influencent le transit et l'adressage des protéines à travers les voies de sécrétion²⁴¹. De manière plus générale, les glycanes jouent un rôle dans la régulation de mécanismes intracellulaires, l'action des hormones, la surveillance immunitaire, les réactions inflammatoires et auto-immunes et les métastases²⁰⁶.

La fonction la plus évidente est sans doute le rôle joué par la N-glycosylation dans le repliement correct des glycoprotéines. La présence de motifs glycaniques influence la fonctionnalité et l'adressage des protéines. De très nombreuses interactions cellulaires sont régulées par la reconnaissance et la liaison à des motifs glycaniques spécifiques. Les processus d'adhésion cellulaire sont particulièrement mis à profit dans les mécanismes immunitaires (nous détaillerons comment par la suite). Les glycanes sont également impliqués dans la clairance, l'activation de récepteurs et l'endocytose. L'étude de la physiopathologie des CDG a permis la mise en évidence de nombre de ces processus¹⁹⁹.

Les fonctions des glycanes sont majoritairement liées à l'existence de *Glycan-Binding Proteins* (GBPs), Les GBP sont présentes chez toutes les formes de vie. Elles reconnaissent spécifiquement certaines formes glycaniques et sont capables de déclencher des processus physiologiques ou physiopathologiques²⁴². Trois grands types de GBP sont classiquement décrits : les anticorps capables de reconnaître les glycanes, les *Glycosaminoglycan-Binding Proteins* (GAG-BP), et les lectines.

Les fonctions des protéoglycanes sont diverses. Ils participent à la formation et à l'organisation des matrices extracellulaire, du glycocalyx (voir [partie III.C.3 Le glycocalyx](#)), et des membranes basales. Ils participent à la fois au stockage vésiculaire et à la régulation des protéases sécrétées. C'est notamment le cas dans le processus de coagulation et de cicatrisation. Par leurs GAGs, les protéoglycanes permettent la liaison à de nombreuses molécules (voir [Tableau 5](#)). Ils retiennent dans les matrices des protéines de type GAG-BP et notamment des protéases, cytokines et facteurs de croissance. En conditions physiologique et pathologique, le remodelage matriciel conduit à la libération et à l'activation de ces facteurs liés au GAGs, participant alors au remodelage matriciel. Enfin, les protéoglycanes exercent des rôles de récepteurs et de corécepteurs. Par exemple, ils coopèrent avec les intégrines membranaires et les autres molécules d'adhésion pour promouvoir les interactions intercellulaires et la migration. Dans toutes ces interactions, la composition des GAGs et leur maturation jouent des rôles déterminants mais encore peu documentés²¹⁶.

Tableau 5 : principales molécules liées au protéoglycane classées par processus (d'après Esko *et al*²¹⁶).

processus impliqué	interaction cellules matrice	Coagulation/fibrinolyse	Lipolyse	Inflammation	Facteurs de croissance et morphogènes
exemple de molécules liées aux protéoglycane	laminine, fibronectine, vitronectine, thrombospondine, tenascine, collagènes, protéines amyloïdes	antithrombine, cofacteur II de l'héparine, inhibiteur de la voie du TF, thrombine, inhibiteur de la protéine C, tPA PAI-1	lipoprotein lipase, hepatic lipase, apoE, apoB apoA-V	cytokines (IL-2, IL-7 IL-8), chimokines (ex : MIP-1 β , SDF-1, etc.), TNF- α , L- et P-sélectines, superoxide dismutase (SOD)	FGFs et FGFR, VEGF, TGF- β

Les lectines sont des protéines capables de reconnaître des motifs ou des groupes de motifs glycaniques avec une grande sélectivité. Elles sont depuis longtemps utilisées en glycobiochimie pour identifier les glycanes^{243,244}. Chez les Mammifères, on distingue 4 grands types de lectines : C-lectines, S-lectines (dont les galectines), P-lectines, et I-lectines (dont les Siglecs). Toutes contiennent un ou plusieurs "carbohydrate-recognition domains" (CRD), qui permettent l'interaction avec les motifs glycaniques²⁰³. De nombreuses familles de protéines possèdent un domaine lectinique qui permet la reconnaissance de certains types glycaniques. Les processus d'adhésion cellulaire sont le fruit de l'association des motifs glycaniques avec les GBPs. Par exemple, les sélectines portent à leurs extrémités un motif de type C-lectine capable de reconnaître des ligands glycaniques. Elles reconnaissent notamment les motifs sLe^x portés par les neutrophiles, monocytes, éosinophiles, lymphocytes T et NK^{245,246}.

Il est ambitieux d'espérer dresser la liste des fonctions exercées par les motifs glycaniques tant elles sont diverses. D'autre part, il est difficile de lier de façon systématique structures et fonctions. En effet, il n'est pas rare que le même motif exerce plusieurs fonctions. Cependant, on note tout de même l'importance de certains motifs notamment dans les processus pathologiques

III.B.3. Importance des motifs glycaniques dans l'immunité

Les motifs glycaniques peuvent jouer un rôle dans les processus de reconnaissance cellulaire. Leur rôle a particulièrement été étudié dans le contexte de l'immunité innée et acquise. Certains motifs ont ainsi été identifiés comme des épitopes présentés ou reconnus par les cellules immunitaires ou tissulaires. Ces structures sont souvent synthétisées suite à l'étape de *capping* : elles sont donc portées par les N- et O- glycanes et parfois même par les glycolipides.

Les antigènes Lewis sont un type de motifs notamment impliqués dans la reconnaissance intercellulaire. Certains variants sont reconnus par les sélectines. La structure mère est nommée

Lewis X (Le^x). Elle peut subir des ajouts de fucose, acide sialique et sulfate, donnant naissance aux différents variant des épitopes de Lewis (voir [Figure 22](#)). Ces motifs sont portés par les N-glycanes sur les antennes et par les O-glycanes core 1 et 2.

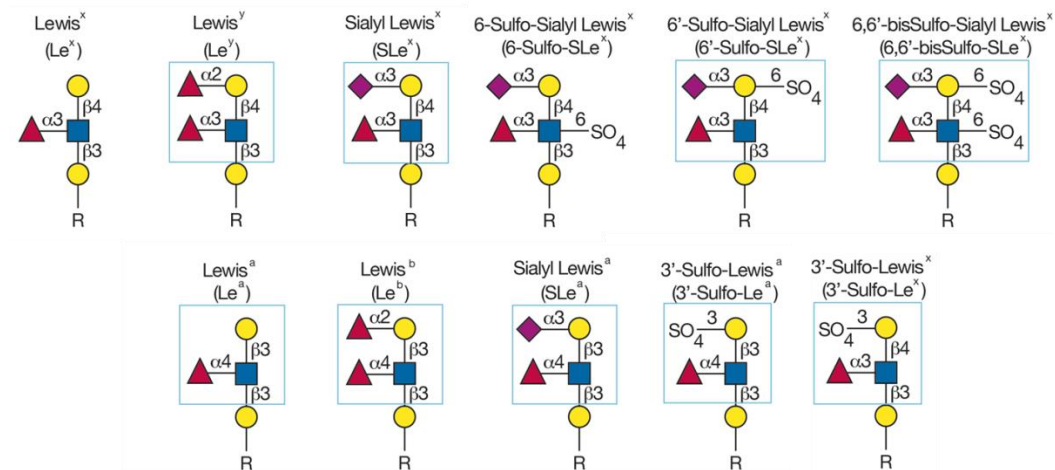


Figure 22 : les différentes formes des épitopes de Lewis, la forme mère Lewis X est représenté en haut à gauche (d'après Stanley *et al.*²¹⁵).

Ces motifs sont physiologiquement exprimés par les différents types leucocytaires. Ils sont fortement impliqués dans les fonctions immunitaires des leucocytes et peuvent être induits par les stimuli inflammatoires. L'expression de ces glycanes est indispensable au recrutement leucocytaire. Les CE expriment elles aussi ce type de motif. Les antigènes Lewis ont aussi été caractérisés en contexte pathologique et notamment dans le cancer, où ils jouent un rôle dans l'extravasation et la migration des métastases²⁴⁷. Nous verrons en détail le rôle joué par ces motifs dans l'adhésion cellulaire en contexte inflammatoire en [partie IV.B Influence sur le recrutement des cellules circulantes](#).

III.C. Le glycome endothélial

Le glycome est un ensemble de structures saccharidiques dont la régulation de la synthèse est complexe. Les motifs glycaniques conditionnent et modifient la fonctionnalité des protéines. Ils participent ainsi à l'établissement des fonctions cellulaires et sont notamment impliqués dans les processus d'adhésion et de communication. L'endothélium vasculaire est le siège de nombreuses interactions avec les cellules circulantes. Or, ces interactions sont en partie gouvernées par le glycome. Nous dresserons dans cette partie un tableau du glycome endothélial et verrons comment, il participe aux fonctions endothéliales en condition physiologique.

III.C.1. Une glycosylation différentielle des lits vasculaires

Plusieurs études chez différentes espèces se sont intéressées à la caractérisation de la glycosylation des lits vasculaires. La plupart d'entre elles ont utilisé des lectines d'origine végétale. Une observation des différents lits vasculaires du *Myxine glutinosa* a été effectuée en microscopie

électronique avec un jeu de 9 lectines. D'un point de vue évolutif, ce vertébré marin est proche de l'ancêtre commun des Vertébrés. Cette étude attire l'attention sur l'hétérogénéité phénotypique des lits vasculaires notamment du point de vue glycanique²⁴⁸. Cette hétérogénéité pourrait être conservée au cours des processus évolutifs. Chez le rat, des marquages endothéliaux ont également démontré une hétérogénéité. La lectine GS-1, connue jusqu'à lors pour marquer l'ensemble des lits vasculaires, a démontré une hétérogénéité de marquage²⁴⁹. Dans des études menées chez des embryons de poulet, la LCA et la Con A marquant les N-glycanes de type oligomannosidique, et la WGA marquant les GlcNAc, ont été utilisées pour marquer les endothéliums au cours du développement embryonnaire. Si les 3 lectines permettent de marquer l'endothélium dans les premiers stades, seul le marquage LCA est maintenu dans les stades plus tardifs. Cette étude montre encore une fois des différences de glycosylation entre les différents endothéliums²⁵⁰. Dans l'ensemble, ces résultats montrent que la glycosylation des lits vasculaires constitue une signature spécifique à chaque endothélium. Le glycome ajoute une différence phénotypique supplémentaire entre les différents endothéliums²⁵¹.

III.C.2. Caractérisation du glycome de l'endothélium en condition basale

III.C.2.a. Vasculogénèse

Les CE vasculaires, comme beaucoup d'autres types cellulaires, expriment à leur surface des glycoprotéines N- et O-glycosylées. Elles expriment fortement les motifs O-glycaniques qui participent à l'angiogénèse, à la différenciation entre réseaux lymphatiques et vasculaires, et au maintien de l'intégrité vasculaire. Cependant, le rôle des O-glycanes dans l'établissement de ces fonctions reste aujourd'hui mal compris. La perte des O-glycanes et notamment des cores 1 et 2 chez la souris se traduit au stade embryonnaire par des hémorragies cérébrales. La perte des O-glycanes perturbe les interactions intercellulaires entre les CE et entre les CE et avec les cellules de soutien. Les O-glycanes sont donc indispensables au maintien de l'intégrité vasculaire^{252,253}. Dans le système lymphatique, le rôle des O-glycanes est déterminant. La O-glycosylation de la podoplanine est indispensable à la séparation en vaisseaux vasculaires ou lymphatiques²⁵³. Elle est aussi nécessaire au maintien de l'intégrité des ganglions lymphatiques²⁵⁴. La synthèse des HS participe aussi à la vasculogénèse, en contribuant au glyco-environnement endothélial²⁵⁵.

III.C.2.b. Endothélium physiologique

Les études sur la glycosylation de l'endothélium vasculaire en condition basale sont peu nombreuses. D'une part, la glycosylation des CE est peu étudiée, (alors que celle des leucocytes l'est beaucoup plus). D'autre part, la plupart des études se concentrent sur des processus pathologiques et apportent peu d'information sur la glycosylation basale de l'endothélium.

Dans une étude menée en 2006, le profil transcriptomique des gènes de glycosylation en condition basale et inflammatoire chez des EC humaines (HUVECs et FMVEC) a été établi. Les motifs glycaniques membranaires ont été quantifiés par marquages avec des lectines et ont montré une concordance avec l'expression des gènes. Au terme de cette étude, les auteurs confirment que le profil de glycosylation diffère en fonction de l'origine des différents lits vasculaires chez l'Humain. En effet, l'expression des gènes de glycosylation et les marquages lectiniques diffèrent entre les deux lignées. La corrélation entre les motifs membranaires observés par marquage lectinique et les gènes de glycosylation exprimés permet aux auteurs d'affirmer que les études transcriptomiques ciblées sur les gènes de glycosylation constituent une signature de la machinerie de glycosylation. Nous verrons dans la *partie IV* comment le stimulus inflammatoire module l'expression de la machinerie de glycosylation.

En 2010, une étude plus approfondie s'est intéressée à l'expression de 432 gènes de glycosylation sur un modèle de CE microvasculaire (HBMEC-60). En condition basale c'est l'expression des gènes de glycosylation codant pour les glycosyltransférases qui est la plus élevée. C'est particulièrement vrai pour les gènes codants dans la synthèse des N-glycanes, qui sont connus pour leur expression ubiquitaire. On remarque notamment une forte expression de DDOST, DAD1 et RPN1, 3 gènes codants pour des acteurs du complexe OST, indispensable à la synthèse des N-glycanes. Le gène DMP3 a lui aussi une expression basale élevée. Ce gène code pour une sous-unité stabilisatrice du complexe dolichol-phosphate mannosyltransférase, indispensable à la création des glycoprotéines à ancre GPI. La synthèse basale des GAGs est elle aussi élevée, comme le reflètent les gènes XYLT2 et β 4GALT7 dans la synthèse des CS et EXT1 dans celle des HS. Les gènes codant pour le transport des sucres et leur synthèse présentent aussi une expression élevée. Les gènes codants pour le catabolisme des glycanes représentent le deuxième groupe fonctionnel le plus exprimé en condition basale. Enfin, le groupe des protéines liant des glycanes comme PECAM-1, ICAM-2 et les galectines est le moins exprimé en condition basale. Le profil établi dans cette étude montre de nombreuses ressemblances avec l'étude de 2006 précédemment évoquée, notamment sur l'expression des N-glycanes.

III.C.3. Le glycocalyx

Le glycocalyx endothélial est un réseau de protéoglycanes et de glycoprotéines lié à la membrane des CE (*Figure 23*). Il recouvre la surface luminale des CE et constitue une sorte de gel jouant le rôle de barrière entre les CE et le sang. Il intègre dans ses mailles des molécules solubles d'origine plasmatique et endothéliale. Cette structure apparaît depuis quelque temps comme un acteur majeur de la physiologie et la physiopathologie vasculaire. Il est notamment impliqué dans les phénomènes de mécanotransduction, homéostasie, signalisation et interaction entre les cellules

sanguines et la paroi vasculaire. Son rôle dans des affections comme le diabète, l'ischémie-reperfusion et l'athérosclérose est également étudié. L'ensemble de la littérature s'accorde sur le rôle vasculoprotecteur du glycocalyx. Cependant, sa caractérisation et sa visualisation sont rendues difficiles du fait de la fragilité de cette structure²⁵⁶. Ainsi, les études s'accordent difficilement sur son épaisseur. On sait cependant qu'elle dépend du type (artériel ou veineux) et de la section des vaisseaux. Son épaisseur augmente proportionnellement avec la section du vaisseau²⁵⁷. Chez la souris, il est ainsi d'une épaisseur de 2-3 μm dans les artères de faible section²⁵⁸, et d'environ 4,5 μm dans les artères carotides²⁵⁹. Dans les veinules, son épaisseur est d'environ 0,4 μm ²⁶⁰. On sait également que cette structure est bien moins développée *in vitro* qu'*in vivo*. Chez les HUVECs par exemple, son épaisseur dans la lumière du vaisseau est d'environ 0,52 μm *in vivo*, quand elle est seulement de 0,02 à 0,03 μm *in vitro*²⁶¹.

III.C.3.a. Structure et composition

Le glycocalyx est connecté à la membrane des CE via de nombreuses molécules liées à la membrane endothéliale. Elles sont sa base structurale, souvent décrites comme sa colonne vertébrale ou sa charpente²⁵⁷. Les protéoglycanes représentent la principale colonne vertébrale du glycocalyx. Dans les tissus vasculaires, les protéoglycanes portant comme GAGs des HS représentent entre 50 et 90 % des protéoglycanes²⁵⁶. Mais cette proportion reste variable car l'expression des protéoglycanes par les CE est sensible à de multiples stimuli. La deuxième classe de GAGs les plus représentés sont les CS et DS. On retient généralement que le rapport entre HS et CS/DS est de 4 pour 1²⁶². La proportion des KS dans les vaisseaux est moins bien documentée mais elle reste minoritaire comparée à celle des HS et CS/DS. Les protéoglycanes entrant dans la composition du glycocalyx sont notamment des syndécans et des glypicans. Du côté cytoplasmique, les syndécans sont liés au cytosquelette et participent à son organisation à travers la tubuline, la dynamine et l' α -actine²⁶³. Seul le glypican-1 est retrouvé à la surfaces des CE²⁶⁴. Il est exclusivement substitués par des HS²⁶⁵ et est localisé dans les radeaux lipidiques de la membrane des CE. Les biglycans sont les protéoglycanes porteurs de CS les plus représentés du glycocalyx²¹⁶. A la différence des autres GAGs, l'HA est libre et non sulfatée. Sa charge négative est apportée par ses groupes carboxyliques, ce qui lui confère des propriétés hydratantes. Au sein du glycocalyx, il tisse des liens avec les protéines transmembranaires comme CD44 (HCAM)²⁵⁷.. Les conditions favorables à la diminution de l'épaisseur du glycocalyx, à la modification de la sulfatation et/ou d'épimérisation de ses GAGs ou encore à la modification de sa polarité sont autant de facteurs qui influencent la perméabilité vasculaire et modifient la liaison des protéines solubles et leur activité²⁵⁷.

Certaines glycoprotéines endothéliales lient le glycocalyx à la membrane. Elles sont elles aussi très sensibles aux stimuli endothéliaux. Les 3 grandes familles de molécules d'adhésion présentes dans le

glycocalyx sont : les intégrines, les sélectines et les CAM de type *Ig-like*. En plus des molécules d'adhésion, le glycocalyx intègre des glycoprotéines impliquées dans la coagulation, la fibrinolyse et l'hémostase. La sialylation des glycoprotéines est un paramètre important : elle influence la charge négative du glycocalyx, à travers l'ionisation de l'acide sialique à pH physiologique²⁶⁶.

Enfin, des molécules solubles sont également intégrées dans les couches les plus lumineuses du glycocalyx. Il s'agit principalement de protéines et de protéoglycanes solubles. Le glycocalyx contient ainsi un grand volume de plasma non circulant, estimé entre 1 et 1,7 litre chez l'Homme²⁶⁷. Les molécules solubles sont apportées par le flux sanguin d'une part, et par l'endothélium d'autre part. A la surface luminale, il est riche en composés solubles d'origine plasmatique. Ces composés sont soit liés entre eux ou bien liés à des protéoglycanes solubles ou des sialoprotéines^{257,268}. L'albumine et l'orosomucoïde, une glycoprotéine acide de la famille des globulines, proviennent toutes deux du flux sanguin. Leur intégration dans le maillage confère au glycocalyx sa polarité négative. Elles constituent des éléments déterminants dans le maintien d'une perméabilité sélective du glycocalyx. Le vWF quant à lui est un bon exemple de facteur soluble d'origine endothéliale, il s'intègre dans le maillage du glycocalyx. La charge négative du glycocalyx influence les interactions avec les constituants du plasma et les cellules circulantes. Elle prévient également la thrombose microvasculaire et maintient les propriétés rhéologiques²⁶⁹. Les composants solubles contribuent grandement aux aspects fonctionnels. Cependant, leurs participations aux aspects structurels sont moins connues, car plus ardues à démontrer.

En condition physiologique normale, la structure du glycocalyx est stable et sa composition relève d'un équilibre dynamique entre la biosynthèse continue de nouveaux glycanes provenant des CE, l'intégration de composés solubles d'origine endothéliale ou plasmatique et les altérations dépendantes du flux sanguin. Cet équilibre est indispensable au maintien de l'intégrité du glycocalyx^{268,270}. Cet échange se traduit par une modification continue de l'épaisseur et de la composition du glycocalyx²⁵⁷.

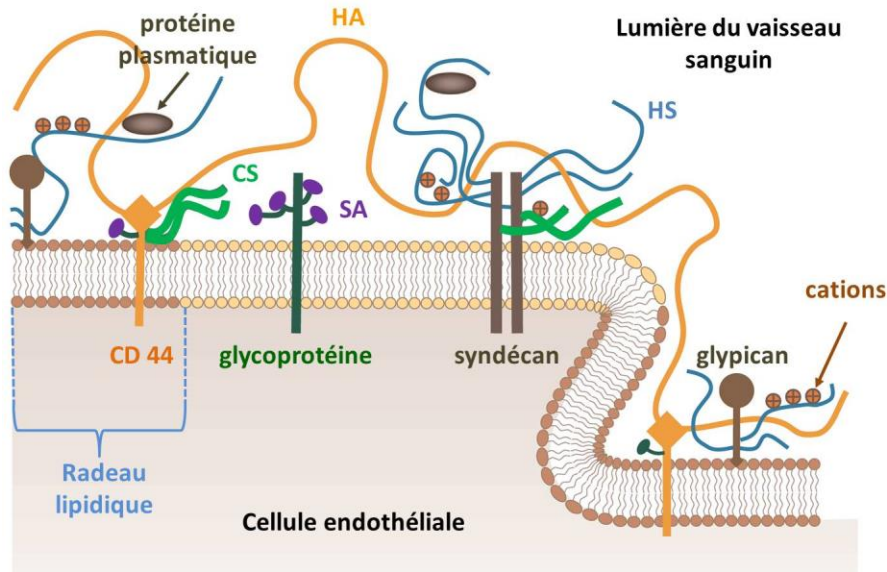


Figure 23 : structure du glycocalyx (d'après Weinbaum *et al.*²⁶⁶).
 SA : acide sialique ; CS : chondroïtine sulfate ; HS : héparane sulfate ; HA : acide hyaluronique.

III.C.3.b. Fonctions

Les fonctions du glycocalyx sont variées. La récente revue de Schött *et al.*²⁶⁸ en dresse la liste suivante:

- Forme une interface entre la paroi vasculaire et le flux sanguin.
- Maintient le gradient colloïde osmotique de la barrière vasculaire.
- Agit comme une barrière envers :
 - l'eau et les composés solubles d'origine vasculaire,
 - l'adhésion des leucocytes.
- Agit comme un tamis pour les protéines plasmatiques,
- Agit comme un site de liaison pour de nombreuses molécules comme (liste non exhaustive) : l'antithrombine III, le *tissue factor pathway inhibitor*, la lipoprotéine lipase, le VEGF, le FGF, la SOD extracellulaire, les molécules d'HA.
- Agit comme un détecteur du stress de cisaillement et un régulateur de la mécanotransduction.

Trois grandes fonctions de l'endothélium retiennent en général l'attention : la modulation de la perméabilité, la mécanotransduction et la réponse inflammatoire.

III.C.3.b.i. Perméabilité & adhésion

En raison de sa charge négative, le glycocalyx joue un rôle dans la régulation de la perméabilité vasculaire et l'équilibre osmotique entre les CE et le sang²⁷¹. En effet, l'encombrement stérique créé par son maillage d'une part, et sa charge d'autre part, permettent un filtrage sélectif des molécules pouvant atteindre et traverser l'endothélium^{257,272,273}. La rupture du glycocalyx peut mener à une perte de la fonction de barrière avec pour conséquence la formation d'un œdème. De plus, la polarité négative du glycocalyx, présente en condition physiologique, évite l'interaction entre CE et érythrocytes. Par contre, la prévention des interactions avec les plaquettes et leucocytes semble

plutôt due au rôle de barrière physique^{257,274}. En effet, l'épaisseur normale du glycocalyx, de l'ordre de 0,5 µm, est bien plus importante que la longueur des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1, E- et P-sélectines. De ce fait, le glycocalyx, en les masquant évite les interactions CE-cellules circulantes²⁷⁰. Pour cette raison, l'interaction des leucocytes avec la membrane des CE est conditionnée au « rabotage » du glycocalyx. La perte d'épaisseur du glycocalyx, caractéristique notamment des phénomènes inflammatoires, est désignée sous le terme de « *shedding* »: elle semble indispensable à l'adhésion des leucocytes sur les CE^{274,275}.

III.C.3.b.ii. Mécanotransduction :

De nombreux travaux ont démontré l'importance du glycocalyx dans la mécano-transduction²⁷⁶. Le glycocalyx transduit les signaux biochimiques et mécaniques externes en signaux biochimiques intracellulaires. Ce phénomène de mécanotransduction explique comment des modifications hémodynamiques induisent des changements conformationnels qui influencent la réponse cellulaire. Une des conséquences de la mécanotransduction est la surexpression d'eNOS qui induit une production plus importante de NO avec des effets relaxant sur le tonus vasculaire^{257,277}. Ce phénomène de mécanotransduction fait intervenir tous les éléments qui composent le glycocalyx²⁷¹.

III.C.3.b.iii. Maintien de l'hémostase et rôle dans l'inflammation

On note aussi l'importance du glycocalyx dans la protection des CE vis-à-vis des dommages engendrés par les nombreux médiateurs du stress oxydant. En condition physiologique, la SOD extracellulaire (eSOD) est liée aux HS. Cette enzyme permet la réduction du stress oxydant par chélation des radicaux libres et le maintien du NO bio disponible, ce qui participe à l'effet vasoprotecteur du glycocalyx^{257,278,279}. Le glycocalyx jouerait également un rôle dans la régulation de la coagulation. En effet, de nombreux acteurs des voies de coagulation comme l'antithrombine III, le cofacteur II de l'héparine, la thrombomoduline et l'inhibiteur de la voie du TF font partie des molécules solubles du glycocalyx. Enfin, le glycocalyx peut lier des cytokines. D'une part, cela influence la synthèse de ses éléments structuraux ; d'autre part, leur fixation empêche le contact avec les récepteurs endothéliaux et module l'inflammation. Dans la *partie IV* consacrée au glycome endothélial en contexte inflammatoire, nous verrons le rôle joué par le glycocalyx dans l'inflammation.

Nous avons défini le glycome et détaillé son implication dans la physiologie endothéliale. Les RI induisent sur l'endothélium un stress important et un état pro-inflammatoire et pro-thrombotique. L'inflammation provoque des modifications glycaniques de l'endothélium vasculaire. Il est donc probable que ce soit aussi le cas des CE irradiées.

IV. Le glycome endothélial en contexte inflammatoire

L'irradiation provoque au niveau endothélial de nombreuses modifications et l'établissement d'un phénotype pro-inflammatoire et pro-thrombotique. Dans les phénomènes inflammatoires, mais aussi cancéreux et angiogéniques, les CE présentent une modification de leur glycome. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés au glycome endothélial radio-induit. En effet, en raison des ressemblances établies entre l'inflammation classique et l'inflammation radio-induite, il existe de bonnes raisons de penser que le glycome des CE pourrait être modifié après irradiation.

IV.A. Modification du glycome en réponse aux stimuli inflammatoires

IV.A.1. Influence des stimuli inflammatoires sur l'expression du glycome endothélial

IV.A.1.a. Connaissances sur la réponse glycanique aux stimuli inflammatoires

Plusieurs études se sont intéressées aux effets des stimuli pro-inflammatoires sur les CE. Elles ont ainsi démontré une modification de l'expression des enzymes de glycosylation en réponse à un stimulus pro-inflammatoire comme le TNF- α . Dès 1994, Hanasaki *et al.* démontrent une augmentation des motifs sialylés en α 2,6, sous le contrôle de l'enzyme α ST6Gal1 après action du TNF- α sur des CE humaines²⁸⁰. En 2005, Garcia-Vallejo *et al.* ont montré une surexpression de B4GALT1 en réponse au TNF- α chez les HUVECs²⁸¹. Et plus récemment, en 2008, Moehler *et al.* ont démontré une augmentation de l'expression de FUT-1 et des motifs Lewis Y en réponse au TNF- α ²⁸². Les changements de glycosylation endothéliale après action du TNF- α , comme la fucosylation, la sialylation, la sulfatation et l'élongation de core-2, sont décrits par les auteurs comme pouvant jouer un rôle dans le recrutement des cellules circulantes²⁸³.

En raison de l'importance des motifs glycaniques dans les réactions immunitaires, plusieurs équipes ont postulé que le glycome endothélial jouait un rôle dans l'adhésion et la migration des leucocytes. La glycosylation des CE microvasculaires a donc été étudiée en condition inflammatoire. Une approche transcriptomique et lectinique *in vitro* sur des CE primaires FMVEC et HUVEC exposées au TNF- α a montré une modulation des gènes et des motifs de glycosylation²¹². Parmi les 74 gènes codants pour des enzymes impliquées dans la glycosylation (dans la suite de ce mémoire, on parlera de gènes de glycosylation), 19 sont modifiés en réponse au TNF- α . Ces modulations transcriptionnelles sont corrélées aux modifications membranaires des motifs marqués par des lectines. La transcriptomique a mis en avant une forte potentialité de synthèse de N-glycanes tri- et tétra-antennés, éventuellement complétée par une fucosylation (α 1,2 et α 1,3) et une sialylation (α 2,6) ou par un motif polylactosamine. Pour les O-glycanes, l'analyse des gènes de glycosylation indique une augmentation possible de la synthèse des cores 1 et 2. Enfin, l'expression des glycolipides des séries globo et lacto pourrait être augmentée. Cette augmentation des glycolipides

avait par ailleurs été constatée chez les HUVECs exposées au TNF- α dans une étude antérieure²⁸⁴. Les marquages lectiniques observés en cytométrie viennent appuyer les résultats de la transcriptomique. La sialylation en α 1-6 marquée par la SNA est augmentée et est en accord avec la surexpression de ST6Gal1. Le marquage Con A est aussi augmenté : les auteurs relient cette augmentation à une surexpression des N-glycanes hautement mannosylés ou hybrides et une diminution des structures complexes. Cependant, ce résultat n'est pas soutenu par l'expression des gènes. Chez les HUVECs, la fucosylation marquée par UEA-1 est également augmentée en réponse au TNF- α . Cette modification glycanique est corrélée à la surexpression des gènes FUT-1 et FUT-4. L'inflammation semble donc être en mesure de moduler la glycosylation et potentiellement d'influer sur le recrutement des leucocytes. Cette étude suggère qu'une myriade de glycosyl-ltransférases agit de concert pour orienter la machinerie de glycosylation vers des motifs précis. Ces derniers pourraient constituer un signal cellulaire vis-à-vis des leucocytes et initier leur recrutement²³⁶.

Le modèle HBMEC-60 décrit précédemment a été soumis à des stimuli pro-inflammatoire (TNF- α) et pro-angiogénique (VEGF)²⁸⁵. Comme dans la précédente étude, la stimulation pro-inflammatoire induit la surexpression de ST6Gal1. C'est aussi le cas lors du signal pro-angiogénique. Le métabolisme du fructose, évalué par le gène FX, et celui des N-glycanes, estimé par B4GalT1, sont augmentés après exposition au TNF- α . Dans cette étude, il apparaît évident que le stimulus pro-inflammatoire provoque des changements plus importants sur l'expression des gènes de glycosylation que dans le cas du stimulus pro-angiogénique. On observe ainsi que les gènes les plus exprimés sont ceux responsables de l'initiation des chaînes et notamment ceux de la N-glycosylation.

Lors de la stimulation au VEGF, les gènes du *trimming* et de la création des antennes sont augmentés. Dans le cas d'une stimulation au TNF- α , les gènes d'élongation sont augmentés. Concernant la sialylation, le TNF- α privilégie la sialylation en α 2,6 et le VEGF celle en α 2,3. Après exposition au VEGF, l'expression des O-glycanes pourrait être augmentée, mais le gène Gcmt1, codant pour la synthèse des cores 2 et 6 et de la structure mère des KS, est diminué. Un stimulus au TNF- α diminue l'expression des gènes codant pour les cores 3. A l'inverse, l'expression des gènes B4galt1 et 5, impliqués dans la synthèse des O-glycanes ainsi que des N-glycanes hybrides et complexes, est augmentée. Pour les CS et HS, les 2 stimuli augmentent l'expression des gènes impliqués dans l'élongation des chaînes. Pour les CS, ils influencent négativement la sulfatation des chaînes mais dans le cas des HS, la N-déacétylation et la N-sulfatation semblent augmenter. Cependant, si le VEGF permet la surexpression de Hs3st1, codant pour une des enzymes responsables de la 3-O-sulfatation des HS, le TNF- α diminue son expression. Dans la stimulation par le TNF- α , l'expression de Sart2, dont le gène code pour une enzyme responsable de l'épimérisation des CS en DS, est augmentée. Pour les KSI, le VEGF semble sans effet. Quant au TNF- α , il influence positivement le gène de la voie KSII

(synthèse sur un core O-glycane) et diminue les Fut8 dont les enzymes sont impliquées dans la voie des KSI (synthèse sur un core N-glycane).

Le TNF- α augmente l'expression de Fut4, qui code pour une fucosyl-transférase indispensable à la synthèse de motifs Le^x. En revanche, St3gal6, codant pour une enzyme impliquée dans la synthèse des motifs sLe^x est diminuée. B3gnt1/2, qui code pour une enzyme cruciale pour la synthèse des structures N- polylectosaminiques est augmentée. La synthèse augmentée de B4galt1 suggère aussi une expression augmentée des antigènes -I (Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)Gal-) et -ii (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal-). Or, une expression importante du motif Le^x porté par le CD15 ou sLe^x porté par le CD15s à la surface des CE est un prérequis indispensable à l'adhésion des leucocytes via la L-sélectine (CD62L)²⁸⁶.

Les principaux gènes modulés chez HBMEC-60, à savoir ST6Gal1, ST3Gal1, B4galt1, Fut4 et E-sélectine, ont été mesurés chez les HUVECs et montrent les mêmes profils après stimulation par le TNF- α . Une étude par lectines et anticorps anti-glycanes permet de confirmer l'expression membranaire des sialyloglycanes que laissent présager les profils d'expression des enzymes de glycosylation. Ainsi les marquages spécifiques de la sialylation en α 2,6 (par SNA, anti-CD22Rg et antiCD75, par ordre de spécificité) révèlent tous trois une augmentation des α 2,6 sialoglycanes après exposition au TNF- α . Un anticorps anti-CD15, marquant les motifs Le^x, montre une apparition de ces motifs en réponse au TNF- α . Le profil d'expression des gènes établi grâce à cette étude montre une grande ressemblance avec celui obtenu par Garcia-Vallejo *et al.* en 2006 sur les HUVECs²¹². Cette étude démontre une influence du TNF- α dans l'expression des gènes clés dans la synthèse des glycanes, et dans une moindre mesure du VEGF. Les auteurs concluent que les 2 stimuli ont plus tendance à modifier le cours de la synthèse qu'à induire une synthèse *de novo*. En effet, l'expression des enzymes d'initiation de la N-glycosylation n'est que peu diminuée. D'autre part, une importante modulation des gènes d'antennation, de fucosylation et de sialylation est constatée, ce qui peut mener à des motifs hybrides ou complexes différents de ceux obtenus en condition basale. La sialylation en α 2,6 observée après TNF- α a déjà été associée à une adhésion augmentée des lymphocytes B, qui reconnaissent le motif grâce à la lectine portée par le CD22²⁸⁰.

Le glycome des HUVECs a également été étudié *in vitro* en réponse à du milieu conditionné par des tumeurs (TCM, *tumor-conditioned medium*)²⁸⁷. Ce modèle d'exposition au TCM est classiquement utilisé pour étudier les interactions tumeur-endothélium. Après exposition, un jeu de lectines a été utilisé en cytométrie de flux pour caractériser le glycome des HUVECs. Une augmentation des marquages DSA (GlcNAc) et SNA (Sia2-6Galb1-4GlcNAc) est constatée, signe d'une augmentation de la sialylation en α 2,6. Une augmentation des N-glycanes hautement mannosylés et hybrides marqués

par Con A est observée, et les motifs sialylés reconnus par WGA ne semblent pas augmentés. Toutes ces modifications glycaniques sont identiques à celles observées chez les HUVECs après TNF- α ^{212,251}. En revanche, contrairement à l'exposition au TNF- α , aucune augmentation du marquage UEA-1 (Fuca1–2Galb1–4Glc(NAc) GlcNAc) n'est observée. Le marquage PHA-L révèle une augmentation du branchement en β -1,6-GlcNAc. Cependant, ce marquage est indépendant de l'expression de l'enzyme GnT-V. Les auteurs suggèrent que l'activité de l'enzyme pourrait être augmentée par le TCM. Cette étude relie la surexpression du motif β -1,6-GlcNAc à une modification du profil de glycosylation de PECAM-1. Cette altération des glycanes de PECAM-1 permettrait une phosphorylation d'une tyrosine portée par le segment intra-cytoplasmique de PECAM-1 avec, pour conséquence l'activation de RhoA, induisant des modifications du cytosquelette et notamment l'apparition de fibres de stress. Les fibres de stress observées après exposition au TCM sont capables d'induire une contraction des HUVECs, permettant le relâchement de jonction serrées. Ce relâchement des jonctions est avancé comme une voie possible permettant l'extravasation des cellules cancéreuses.

IV.A.1.b. Importance de la N-glycosylation dans la réponse aux stimuli inflammatoires

Une série d'études menée par l'équipe de Patel *et al.* s'est intéressée à la glycosylation endothéliale en contexte pro-inflammatoire et au cours de l'inflammation chronique. En 2011, une première étude utilisant un jeu de 7 lectines couplées à des marqueurs fluorescents a permis la caractérisation du glycome d'HUVECs exposées pendant 4 h au TNF- α ²³⁶. Les auteurs constatent une augmentation du marquage Con A (N-glycanes de type oligomannose), LCA (N-glycanes oligomannoses/hybrides), DSL (N-glycanes hybrides/complexes). En revanche, les marquages Jacaline et VVL attribués au O-glycanes, et les lectines SNA et UEA-1 marquant les motifs N-glycanes complexes ne révèlent pas de modification après stimulus.

Le TNF- α semble augmenter l'expression des N-glycanes. Une atténuation des marquages par co-incubation avec la tunicamicine (un inhibiteur de la N-glycosylation) ou par inclusion pendant le marquage d' α -méthylmannoside (un compétiteur des sucres reconnus par la lectine Con A) prouve que la modification de la glycosylation se traduit particulièrement par une augmentation des motifs N-glycanes hybrides et oligomannosidiques. Cette augmentation est localisée au niveau des jonctions cellulaires et des membranes. L'analyse transcriptomique des gènes de N-glycosylation met en évidence une diminution significative de l'expression des gènes Man1a2 et Man1c1 ainsi qu'une augmentation des gènes B4galt1 et St6gal1. L'étude démontre également que le TNF- α induit une diminution de l'activité des mannosidases. Ces résultats sont cohérents avec l'existence de motifs hautement mannosylés et l'absence de motifs complexes. En effet, la N-glycosylation est une

biosynthèse séquentielle (linéaire), et les mannosidases interviennent dans les étapes précoces de la synthèse. La diminution de l'activité et de la synthèse des mannosidases provoque une accumulation des structures hautement mannosylées, et par effet de vases communicants, une diminution des motifs complexes. Cela explique que l'augmentation de l'expression des gènes de la N-glycosylation complexe (B4galt1 et St6gal1) ne soit pas corrélée à une augmentation du marquage lectinique à la SNA. En effet, malgré une plus grande expression, ces enzymes ne sont pas exploitables en raison du ralentissement de la chaîne de synthèse en amont.

Les auteurs prouvent également que l'activation du *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* (PPAR γ) par la roziglitazone permet une diminution des modifications du glycome. Le traitement des HUVEC au TNF- α en présence de roziglitazone permet de rétablir l'activité et l'expression de mannosidases. Une quantification par marquage membranaire à la Con A démontre une diminution des motifs oligomannosidiques en présence de TNF- α et de roziglitazone. Cependant, l'étude n'identifie pas précisément les molécules porteuses de ces modifications de glycosylation. ICAM-1 est proposé comme candidat potentiel et pourrait moduler l'adhésion des leucocytes via les modifications de sa glycosylation^{288,289}.

Dans une deuxième étude, la même équipe s'est intéressée à la glycosylation en conditions inflammatoires chroniques et notamment dans un contexte d'athérosclérose²³⁰. L'apparition des plaques d'athérome ainsi que l'établissement et le maintien d'une inflammation chronique en contexte athérosclérotique sont favorisés par l'existence de profils d'écoulement complexes. Un régime d'écoulement laminaire est considéré comme athéroprotecteur, à l'inverse d'un flux turbulent considéré comme pro-athérosclérotique²⁹⁰. Dans cette étude, des HAEC (*Human aortic endothelial cells*) ont été exposées à un flux laminaire ou turbulent (oscillatoire). Des marquages Con A ont révélé une augmentation de l'expression des motifs oligomannosidiques en réponse à un flux oscillatoire. Un modèle de souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE $-/-$) développant des plaques d'athérome dans le cadre d'une alimentation riche a été utilisé. Les marquages Con A et LCA coïncident avec les plaques d'athérome. Les mêmes marquages effectués sur des tissus humains révèlent aussi une augmentation des motifs hautement mannosylés au niveau des lésions athérosclérotiques. Grâce à des inhibiteurs d'étapes clés de synthèse des N-glycanes, les auteurs ont pu vérifier *in vitro* que la modification de la glycosylation n'empêche pas l'expression des glycoprotéines d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 à la surface des CE.

Enfin, l'influence de l'origine des lits vasculaires dans la réponse inflammatoire glycanique a été étudiée. Cinq types cellulaires différents ont été exposés aux mêmes stimuli pro-inflammatoires (TNF- α , LPS et IL-1 β). La réponse inflammatoire aiguë et chronique a été observée. Comme attendu,

à l'état physiologique, les profils N-glycaniques sont différents entre les lits vasculaires (voir [partie III.C.2 Caractérisation du glycome de l'endothélium en condition basale](#)). Cette étude montre surtout que la glycosylation des lits vasculaires est modulée après stimulus pro-inflammatoire. Ces modifications diffèrent temporellement et quantitativement entre les types cellulaires. La principale modification glycanique consiste en la sur- ou sous-expression des N-glycanes hautement mannosylés. Cette modulation a été reliée à celle de l'activité des α -mannosidases en réponse à l'inflammation. Une augmentation de l'adhésion de monocytes est observée sur les lits présentant une surexpression des N-glycanes hautement mannosylés²⁹¹. Nous verrons en [partie IV.B](#) comment les modifications glycaniques entrent en jeu dans le recrutement des cellules circulantes.

IV.A.1.c. Modifications du glycome *in vivo*

Dans les maladies inflammatoires, les CE sont au cœur de la propagation et du maintien de l'inflammation. Nous avons vu que les stimuli pro-inflammatoires modifient le glycome endothélial. *In vivo*, des études se sont intéressées à la glycosylation endothéliale dans les maladies inflammatoires chroniques. Le marquage par anticorps monoclonaux de plus de 400 pièces opératoires humaines prélevées chez des patients présentant des affections inflammatoires chroniques (thyroïdite, myocardite, psoriasis, vascularite, colite ulcéreuse) a permis l'étude du glycome endothélial. Dans les veinules post-capillaires, où s'opère classiquement l'adhésion des leucocytes, la néosynthèse de motifs sLeX et 6-sulfo-sLeX a été détectée dans tous les tissus enflammés²⁹². Dans les CE, ces motifs sont majoritairement présents sur les O-glycanes, mais aussi sur les N-glycanes. D'autres études *in vivo* ont comparé la glycosylation de tissus en conditions basales et pathologiques. Par exemple, une série de travaux a utilisé des lectines pour étudier la glycosylation endothéliale du cordon ombilical en contexte de complications de grossesse et lors de grossesse chez des patientes diabétiques insulino-dépendantes^{293,294}. Ces études révèlent une différence de glycosylation entre les lits vasculaires, et surtout un profil de glycosylation influencé par la pathologie. Les cordons ombilicaux issus de mères diabétiques présentent notamment une diminution artérielle des motifs terminaux Gal(β 1-3)-GalNAc.

Prises dans leur ensemble, ces études suggèrent que la dysfonction endothéliale provoquée par l'inflammation mène à une modification profonde dans la régulation des voies de glycosylation. Les stimuli pro-inflammatoires semblent notamment provoquer une augmentation membranaire des motifs N-glycaniques hautement mannosylés. Une part plus importante des N-glycanes produits par l'endothélium activé correspond aux N-glycanes les plus simples (hypoglycosylés)²⁵¹.

IV.A.2. Modifications du glycocalyx

IV.A.2.a. Le shedding

La nature labile du glycocalyx a été démontrée dans de nombreux modèles. Une perte rapide de ses fonctions a été démontrée en contexte inflammatoire tant au niveau local que systémique, et aussi bien pour des effets aigus que chroniques. Une stimulation au TNF- α de l'endothélium pour une période prolongée (20 min à 2 h) se traduit par une augmentation de sa porosité, en l'absence de toute adhésion entre CE et leucocytes²⁷⁰.

Le *shedding* du glycocalyx a été mis en évidence dans des affections systémiques, chroniques comme le diabète ou l'athérosclérose, mais également dans des phénomènes plus aigus comme le choc septique, ou locaux comme l'ischémie-reperfusion chirurgicale²⁹⁵⁻²⁹⁷. Le *shedding* se traduit par la perte d'une partie des constituants du glycocalyx (**Figure 24**). Il peut aller jusqu'à la suppression totale des syndécans et glypicans et de leurs chaînes GAGs associées^{295,296}. Le *shedding* du glycocalyx en réponse à des stimuli inflammatoires comme les cytokines et les chimio-attractants a été démontré au niveau des artérioles des veinules et des capillaires dans de nombreux modèles d'inflammation²⁹⁵⁻²⁹⁷. Il participe à l'amplification des phénomènes inflammatoires, car il permet la libération de médiateurs inflammatoires imbriqués dans sa partie soluble. D'autre part, la réduction de cette structure améliore l'accessibilité de l'endothélium vis-à-vis des cellules circulantes. Les molécules d'adhésion sont ainsi « révélées » aux leucocytes²⁹⁷. Ces derniers sont capables d'agir sur la CE, qui en réponse, altèrent la structure du glycocalyx. De plus, en contexte inflammatoire, certains types de leucocytes activés comme les polynucléaires, les macrophages et les mastocytes peuvent relarguer des enzymes qui contribuent au *shedding*.

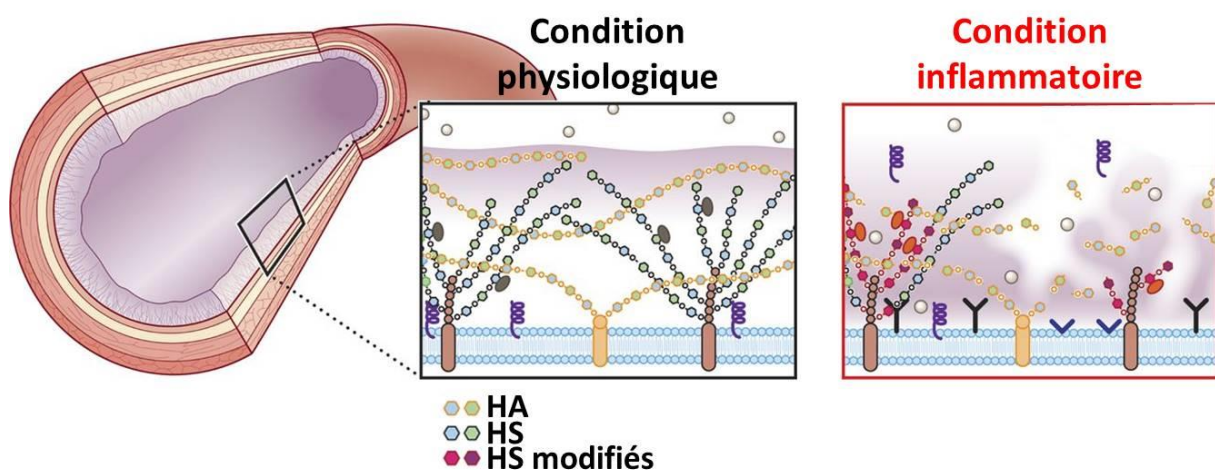


Figure 24 : le *shedding* du glycocalyx en condition inflammatoire (d'après²⁹⁸).

IV.A.2.b. Les médiateurs relargués pendant l'inflammation participent à la dégradation du glycocalyx

Lors de leur activation, les cellules inflammatoires relarguent un large spectre d'enzymes et d'espèces réactives qui peuvent participer à la destruction du glycocalyx. Les neutrophiles sont les leucocytes les plus représentés dans le sang. Leur activation se traduit par leur dégranulation et la libération de protéases. Ils sont en outre capables de produire d'importantes quantités de ROS et de RNS²⁹⁹. Les monocytes, moins représentés dans le sang, peuvent relarguer l'héparanase, plus directement impactante pour le glycocalyx, via la dégradation des HS^{277,295-297,300}.

Les phénomènes d'ischémie-reperfusion sont couramment exploités, notamment au niveau rénal, pour comprendre le *shedding*. Dans ce contexte, les ROS/RNS tertiaires comme OH[•] sont produits dans le voisinage proche du glycocalyx. Ces ROS/RNS tertiaires ont la capacité de cliver les HA, HS et CS. Parallèlement, les neutrophiles relarguent des MPO capables de potentialiser l'action des ROS/RNS. Dans ce phénomène, la capacité des GAGs à fixer le MPO exacerbe l'effet des ROS/RNS spécifiquement sur le glycocalyx²⁹⁹. Cette dégradation est accompagnée de phénomènes similaires à ceux observés lors de la dégradation enzymatique du glycocalyx^{299,301}. De plus, le noyau protéique des protéoglycanes peut subir des modifications chimiques (comme des oxydations et des nitrosations) qui peuvent influencer l'intégrité du glycocalyx. En plus de leur rôle direct sur le glycocalyx, les ROS/RNS peuvent potentialiser l'action des métalloprotéinases matricielles (MMPs) responsables de la protéolyse du glycocalyx, et inactiver les inhibiteurs de ces protéases²⁹⁹.

Les protéases sont d'importants médiateurs activés pendant l'inflammation. Elles représentent une menace pour le glycocalyx^{270,302}. On pense notamment aux MMPs stockées dans les vésicules phagocytaires et endothéliales et à l'élastase émise par les neutrophiles. Les MMPs sont produites et/ou relargués, puis activées suite notamment à des stimuli inflammatoires³⁰³. L'inhibition de ces MMP par la doxycycline réduit d'ailleurs de manière significative le *shedding* du glycocalyx³⁰²⁻³⁰⁴. Les MMPs ont été identifiées comme ayant une forte affinité pour les HS, soulignant leur rôle potentiel dans le *shedding*. Pour aller plus loin, plusieurs auteurs suggèrent que les MMPs clivent directement les protéoglycanes, notamment le syndécan-1 et le CD44. L'importance de l'élastase dans la destruction du glycocalyx est suggérée tant en condition inflammatoire locale que systémique. Sécrétée depuis les granules azurophiles des neutrophiles après leur activation, l'élastase est capable de se lier aux chaînes de HS des syndécans. Cette fixation sur les composants du glycocalyx permet la dégradation des syndécans²⁹⁹. D'autres dégradations du glycocalyx peuvent être dues à des modifications du flux sanguin ou à l'exposition de l'endothélium aux LDL. Enfin, l'action directe de médiateurs inflammatoires comme le TNF- α ^{261,262} ou les LPS sur l'endothélium pourrait induire le *shedding*. Dans ce cas, on soupçonne l'action de protéases d'origine endothéliale^{270,276,297}.

Le glycocalyx est donc une structure particulièrement vulnérable. Ces dommages au glycocalyx ne sont que les prémices de futures affections qui vont par la suite toucher l'endothélium vasculaire. Des études précliniques suggèrent cependant que les composants plasmatiques pourraient être efficaces dans la protection et la régénération de cette structure. Ont notamment été identifiées : l'antithrombine, l'orosomucoïde et l'albumine. Cette dernière éveille un vif intérêt²⁶⁸.

Les stimuli inflammatoires aigus et chroniques modifient donc le glycome endothélial. Ces modifications, concernent tous les types glycaniques. Le même type de modifications pourraient intervenir dans l'endothélium irradié et participer à la dysfonction endothéliale radio-induite.

IV.B. Influence sur le recrutement des cellules circulantes

L'endothélium activé promeut le recrutement des cellules circulantes au cours de la propagation des dommages radio-induits. L'infiltration leucocytaire résultante et persistante semble être un facteur déterminant dans le maintien de l'inflammation radio-induite et dans l'évolution des dommages aux OAR. Au cours de l'inflammation, la modification du glycome influence le recrutement des cellules circulantes. En effet, les stimuli modifient les ligands glycaniques des acteurs impliqués dans l'adhésion.

IV.B.1. Importance de la glycosylation des molécules d'adhésion dans le recrutement leucocytaire

L'influence de la glycosylation sur le recrutement leucocytaire est un phénomène très étudié. Seulement, la plupart des études se concentrent sur les épitopes glycaniques portés par les leucocytes. A l'inverse, l'influence du glycome endothélial est beaucoup moins documentée. Pourtant, toutes les molécules d'adhésion impliquées dans le recrutement leucocytaire sont fortement glycosylées. Pour certaines d'entre elles, un rôle de leur glycosylation dans le recrutement des cellules circulantes a été démontré.

IV.B.1.a. Le rolling : les sélectines

Les ligands des sélectines constituent un groupe hétérogène de molécules qui portent le motif sLe^x. Les ligands inflammatoires des sélectines sont principalement présents sur les leucocytes. Quant à ceux présents à la surface des CE, ils sont le plus souvent retrouvés à la surface des HEV au sein des ganglions lymphatiques où ils participent au «*homing* » des lymphocytes.

IV.B.1.a.i. Les sélectines endothéliales et leurs ligands

PSGL-1 est une glycoprotéine de type sialomucine fortement O-glycosylée. Elle est capable de lier la P- et la E-sélectine, mais aussi la L-sélectine en condition statique et dynamique^{305,306}. Des essais en microscopie intravitale chez la souris ont démontré l'importance de ce ligand dans le *rolling*³⁰⁷. En contexte inflammatoire, la glycosylation de PSGL-1 est modifiée pour permettre la capture et le

rolling des leucocytes par reconnaissance de la P-sélectine. Les principales modifications glycaniques de PSGL-1 sont l' α 1,3 fucosylation, l' α 2,3 sialylation, la β 1,4 galactosylation, et l'expression des cores 2. PSGL-1 est constitutivement exprimée sur l'ensemble des leucocytes et sur les plaquettes mais elle peut également être exprimée sur d'autres tissus en contexte pathologique. Elle a notamment été identifiée dans le modèle HUVEC soumis à un stimulus inflammatoire par le TNF- α , l'IL-1 β , la thrombine ou l'histamine. L'expression de PSGL-1 à la membrane endothéliale et sa glycosylation influencent l'adhésion des leucocytes et des plaquettes sur les CE *in vitro* et *in vivo*. La glycosylation du PSGL-1 endothélial n'est pas décrite mais elle pourrait jouer un rôle important dans le recrutement des leucocytes²⁸³.

Le ligand principal de la E-sélectine est nommé ESL-1 (*E-selectin ligand-1*). Cette glycoprotéine possède uniquement des motifs N-glycosylés. Même si elle est décrite depuis longtemps, son rôle de ligand de l'E-sélectine reste flou. Cependant, l'E-sélectine peut aussi lier d'autres protéines présentant des motifs sLe^x comme CD44. Dans le *rolling* des neutrophiles, ESL-1 coopère avec ses partenaires leucocytaires PSGL-1 et CD44. CD44, récepteur de l'HA, est connu pour son expression leucocytaire. Il participe à la régulation de la vitesse de *rolling* par ses interactions avec la E-sélectine via la sialylation et la fucosylation de ses N-glycanes³⁰⁸. Le motif sialyl-Lewis X a récemment été identifié sur ces N-glycanes et son rôle dans la reconnaissance E-sélectine-CD44 a été confirmé. D'autre part, il est suggéré que l'expression endothéliale de l'HA pourrait participer à l'augmentation de l'adhésion CD44-dépendante, cela grâce à l'interaction avec des protéines dérivées du sérum nommé SHAP (*serum-derived HA-associated protein*)³⁰⁹.

Les E- et P-sélectines possèdent respectivement 11 et 9 sites de N-glycosylation. La glycosylation de ces protéines est un prérequis nécessaire pour qu'elles soient exprimées aux membranes. Pour la E-sélectine, la glycosylation jusqu'au stade complexe ne semble pas indispensable. La E-sélectine des HUVECs stimulées par l'IL-1 β montre une glycosylation de type hybride ou complexe. Sa déglycosylation enzymatique n'a pas d'influence sur l'adhésion³¹⁰. Même si les sélectines sont des glycoprotéines, leur glycosylation semble uniquement utile à leur maturation et à leur transport à la membrane. En effet, la capacité des sélectines à induire le *rolling* est majoritairement due à l'existence de la fonction C-lectine présente à leurs extrémités. Cependant, une récente étude pourrait remettre en cause ce paradigme. En effet la glycosylation de la P-sélectine a été investiguée *in vitro* sur des HUVECs. En altérant la N-glycosylation de P-sélectine par des inhibiteurs des mannosidases (tunicamycine et castanospermine), l'adhésion des érythrocytes et des leucocytes est réduite. Il semble donc que la glycosylation des sélectines puisse jouer un rôle dans le recrutement des cellules circulantes³¹¹.

IV.B.1.a.ii. Rôle du motif sialyl-Lewis X dans le rolling

La L-sélectine est principalement exprimée par les leucocytes. L'interaction leucocyte-CE dépendante de la L-sélectine est particulièrement étudiée pour comprendre la migration de lymphocytes immatures vers les ganglions lymphatiques. La L-sélectine reconnaît les glycanes exprimés par les CE au niveau des HEV et des plaques de Peyer. Dans ce contexte, les ligands de la L-sélectine sont un groupe de mucines sialylées appelées PNAd (*Peripheral Node Addressins*). Parmi les PNAd, on retrouve GlyCAM-1, CD34, sgp200, la podocalyxin des HEV, et l'endomucine^{312,313}. Ces mucines portent le motif 6-sulfo-sialyl-Lewis X reconnu par la L-sélectine. La suppression de Fut7 codant pour une fucosyltransférase impliquée dans la synthèse de ce motif induit une diminution du *homing* leucocytaire. Si le motif sialyl-Lewis X peut suffire à l'interaction PNAd-L-sélectine, le motif 6-sulfo-sialyl-Lewis X est généralement préféré, notamment dans le cas de GlyCAM-1. La sulfatation joue en effet un rôle déterminant dans la création des ligands de la L-sélectine. Les gènes codant pour les 6-sulfotransférases (Glcna6st1, Glcna6st2) ont été éteints chez la souris, provoquant une diminution du recrutement dans les HEV. Les 6-sulfotransférases sont constitutivement exprimées par les HEV ; par contre, en contexte inflammatoire chronique, leur expression peut être induite dans les organes lymphoïdes tertiaires. Les structures 6-sulfo-sLe^x sont particulièrement portées par les O-glycanes de type core 1 et core 2. Cependant, de récents travaux chez l'Homme et la souris démontrent l'importance des motifs 6-sulfo-sialyl Lewis X portés par les N-glycanes dans l'adhésion des leucocytes dépendante de la L-sélectine³¹⁴.

Tant au niveau endothélial que leucocytaire, l'expression des O-glycanes joue un rôle primordial dans la capture et le *rolling* via les sélectines. Plusieurs expériences de délétion des gènes initiateurs de la O-glycosylation (Galnt1 par exemple) ont mis en évidence une diminution du *rolling* et du *homing* des lymphocytes dépendants de la L-sélectine^{315,316}. L'expression des cores 2 est particulièrement étudiée, en raison de sa capacité à porter des motifs sialyl-Lewis X. Les gènes Gcnt1-3 (qui codent pour les enzymes responsables de la transformation des cores 1 en cores 2) sont ainsi considérés comme des gènes primordiaux pour la synthèse de ligands des sélectines. Des modèles de souris KO pour Gcnt1 ont permis d'observer une suppression de l'adhésion des neutrophiles³¹⁷. De plus, une réduction significative du *rolling* dépendant des P- et L-sélectines a pu être observé en microscopie intravitale^{316,318}. Le *rolling* dépendant de la L-sélectine n'est cependant pas réduit à la seule présence des cores 2. Une étude dans les HEV chez des souris KO pour Gcnt1 a démontré que les cores 1 pouvaient générer des motifs 6-sulfo-sialyl-Lewis X capables de médier le *homing* leucocytaire³¹⁹. La voie des polylectosamines joue aussi un rôle important dans la synthèse des ligands des sélectines et notamment les cores 2. Les β 1,4 Gal-transférases (gènes B4galt1 et B4galt4) participent à l'élongation des cores 2. Par la suite, le *capping* de ces branches permet la création de motifs sLe^x.

Les souris B4galt1^{-/-} présentent une diminution du recrutement des neutrophiles dépendant de la P-sélectine en contexte inflammatoire et cicatriciel³²⁰. Cependant le recrutement dépendant de la L-sélectine ne semble pas affecté³¹⁵. D'une manière générale, la fucosylation, la sialylation et la sulfatation décorent et capent les chaînes pour former les motifs sLe^x. Les fucosyltransférases intervenant dans la synthèse des ligands des sélectines sont Fut4 et Fut7. La suppression du gène Fut7 chez la souris se traduit par une diminution importante du recrutement dépendant des sélectines dans les ganglions lymphatiques et dans les vaisseaux inflammés. Les sialyltransférases participent elles aussi à la création du sLe^x sur les cores 1 et 2 et les cores 2 étendus par les β 1,4 Gal-transférases. D'après les études *in vivo* chez des souris KO pour les St3gal, les enzymes n'ont pas la même affinité pour tous les substrats accepteurs d'acides sialiques²⁸³.

IV.B.1.a.iii. Rôle des GAGs sulfatées dans le rolling

Si le motif sLe^x est le ligand canonique des sélectines, d'autres ligands existent. Dans l'inflammation et le cancer, les GAGs sulfatés occupent des fonctions importantes. Des souris déficientes pour la maturation des HS (Ndst1^{-/-}) dans l'endothélium ont été utilisées pour prouver l'importance des HS dans le recrutement leucocytaire. En contexte inflammatoire, elles présentent d'une part une diminution du recrutement leucocytaire endothélial, de la vitesse de *rolling*, et de la liaison de la L-sélectine à la membrane endothéliale. D'autre part, une diminution de la transcytose et de la présentation des cytokines est aussi observée. Cette expérience montre que durant l'inflammation, les HS endothéliaux occupent trois grandes fonctions : (1) ils sont nécessaires à la transcytose des chimiokines ; (2) ils interagissent avec la L-sélectine et participent ainsi au *slow rolling* ; (3) ils lient les cytokines permettant ainsi leurs présentation, ce qui participe à l'activation des leucocytes³²¹⁻³²³.

Il semble que la densité de charges des GAGs, et donc leur taux de sulfatation, influence positivement le recrutement des leucocytes. Ainsi, l'héparine est un excellent compétiteur *in vitro* de la fixation du sLe^x sur les L- et P-selectines³²⁴. Les domaines fortement sulfatés des HS participent aussi à l'augmentation de l'adhésion des leucocytes^{325,326}. Dans les cancers, la sulfatation des GAGs joue également un rôle important dans l'extravasation des métastases. Une forte densité de sulfatation des GAGs permet la liaison avec la L- et la P-sélectine et pourrait promouvoir la dispersion métastatique³²⁷. Indépendamment, deux études ont ainsi montré que la sulfatation des HS et des CS étaient associées au phénotypes métastatiques^{247,328}.

Dans les étapes de *rolling* (et de *slow rolling*), l'importance de la O-glycosylation et plus généralement des antigènes Lewis reconnus par les sélectines endothéliales ou leucocytaire a été démontrée. D'autre part, le rôle des GAGs sulfatés a récemment révélé toute son importance. En

revanche, le processus d'adhésion ferme dirigé par les intégrines semble d'avantage régulé par la N-glycosylation endothéliale³²⁹.

IV.B.1.b. L'adhésion via ICAM-1 et VCAM-1

IV.B.1.b.i. ICAM-1

L'ICAM-1 humaine contient 8 sites de N-glycosylation³³⁰. Sa N-glycosylation est indispensable à son expression à la surface des CE, puisque son inhibition diminue le trafic d'ICAM-1 vers la membrane²³⁰. De la même manière, la faible glycosylation des sites d'ICAM-1 dans les CDG a été reliée à sa sous-expression membranaire³³¹. *In vivo*, dans un modèle de CDG chez la souris, le ralentissement de la synthèse des précurseurs des N-glycanes a été relié à une diminution de l'expression d'ICAM-1. Cette diminution induit une diminution de l'adhésion des leucocytes, et pourrait expliquer la chronicité des infections chez les patients atteints de CDG³³². En revanche, l'inhibition des mannosidases II permet la synthèse de motifs hypoglycosylés suffisamment aboutis pour que ICAM-1 soit exprimée à la membrane des CE²³⁰. On ne connaît pas à ce jour le rôle des sites de glycosylation d'ICAM-1 dans son adressage à la membrane²⁵¹.

La glycosylation d'ICAM-1 régule la reconnaissance des leucocytes³³³. L'interaction avec les deux corécepteurs leucocytaires que sont Mac-1 et LFA-1 est dépendante des N-glycanes d'ICAM-1. Même si les N-glycanes ne sont pas directement impliqués, le récepteur Mac-1 possède une meilleure avidité en présence de N-glycanes peu matures. Ainsi, le traitement des HUVECs par la deoxymannojirimycin (DMJ), un inhibiteur des mannosidases II, a démontré un effet fonctionnel sur l'adhésion des neutrophiles. Les N-glycanes synthétisés en présence de DMJ sont de type hautement mannosylé. Cette modification a pour effet une augmentation de l'adhésion des neutrophiles dirigée par Mac-1²⁸⁸. En condition statique, l'adhésion des neutrophiles sur des HUVECs activées par le TNF- α est augmentée. Une co-stimulation par le DMJ potentialise cette adhésion. Un traitement par anticorps anti-ICAM-1 et anti-CD18 (sous-unité β 2 commune aux intégrines Mac-1 et LFA-1) rétablit une adhésion normale³³⁴. Cela suggère l'importance des motifs N-glycanes de type oligomannosidique dans la reconnaissance d'ICAM-1 par l'intégrine Mac-1. A l'inverse, l'intégrine LFA-1 lie plus favorablement les ICAM-1 portant des motifs complexes^{288,329}. Un modèle d'HUVECs exposées au TNF- α a permis de démontrer l'existence de deux formes d'ICAM-1 en contexte inflammatoire³³³. La forme majoritairement exprimée porte des N-glycanes complexes sialylés en α -2,6. La deuxième forme, minoritaire, est glycosylée par des N-glycanes de type hautement mannosylé (forme HM). Les HM-ICAM-1 ont été retrouvés dans les artères coronaires humaines où elles semblent, cette fois-ci, représenter la forme majoritaire d'ICAM-1. La forme HM-ICAM-1 peut être obtenue par les inhibiteurs des mannosidases II, ce qui augmente le *rolling* et l'adhésion des leucocytes. L'expression d'ICAM-1 et sa reconnaissance par les leucocytes sont connues pour

transmettre transitoirement des signaux intracellulaires influençant la perméabilité endothéliale et la survie cellulaire. L'existence des HM-ICAM-1 a été reliée à un maintien de ces signaux. Étonnamment, les formes HM-ICAM-1 perdent leurs liaisons à l'actine. Les auteurs concluent que la forme HM pourrait moduler d'autres aspects de l'inflammation que la forme normale³³³.

Il est donc suggéré que la multiplicité des sites de glycosylation d'ICAM-1 pourrait servir à moduler ses fonctions. L'existence de certains motifs sur certains sites pourrait conférer des fonctions pro- ou anti-adhésives. Cette hypothèse est d'autant plus crédible du fait de l'existence d'une glycosylation différentielle des lits vasculaires. Chaque lit vasculaire pourrait donc porter différentes glycoformes d'ICAM-1, conférant ainsi une sensibilité différentielle à l'adhésion²⁵¹.

IV.B.1.b.ii. VCAM-1

VCAM-1 pourrait posséder jusqu'à 6 sites de N-glycosylation. A ce jour, seul un d'entre eux a été confirmé par spectrométrie de masse. De la même manière que ICAM-1, la N-glycosylation de VCAM-1 est indispensable à son adressage aux membranes, mais une glycosylation de type hautement mannosylé est suffisante²³⁰. Chez les CE, la stimulation au TNF- α , à l'IL-1 ou à l'IL-4 provoque une augmentation de la sialylation en α -2,6 de VCAM-1^{280,335}. Cette sialylation inhibe l'adhésion des leucocytes dépendante de VCAM-1 en condition dynamique. En revanche, une suppression des résidus sialyl α -2,6 augmente l'adhésion. Il semble que tous les N-glycanes portés par VCAM-1 ne soient pas sialylés en contexte inflammatoire. En effet, les galectines 3 (reconnaissant les extrémités Gal des N-glycanes) sont capables de reconnaître VCAM-1 sur des tapis endothéliaux soumis à un stimulus inflammatoire³²⁹.

IV.B.1.c. Activation leucocytaire : importance des HS

La présentation des chimiokines est une des étapes indispensables pour l'activation des intégrines³³⁶. Les récepteurs des chimiokines sont des glycoprotéines à sept domaines transmembranaires. Chez les leucocytes, leur glycosylation est bien documentée. Elle influence la reconnaissance des chimiokines et les stabilise contre la dégradation. Les CE portent aussi des récepteurs aux chimiokines (CXCR1, CXCR2 et CXCR4)³³⁷, mais leur rôle est très peu documenté. Ils semblent plutôt impliqués dans les mécanismes d'infection des pathogènes. La glycosylation est connue pour certains d'entre eux³³⁸.

IV.B.1.d. La transmigration : PECAM-1 et VE-cadhérine

La transmigration des leucocytes est dirigée par des molécules d'adhésion telles que PECAM-1, ICAM-2 et les JAMs³³⁹. Parmi elles, PECAM-1 humaine est connue pour être fortement glycosylée. Elle possède en effet 9 sites potentiels de N-glycosylation. A la différence d'ICAM-1 et VCAM-1, une glycosylation complexe avec une sialylation en α 2-6 semble nécessaire à son expression

membranaire. En effet, les CE issues de souris déficientes en ST6GAL1 sous-expriment PECAM-1³⁴⁰. Cependant, d'autres travaux tendent à prouver au contraire que la sialylation membranaire des CE n'est pas portée par PECAM-1³⁴¹.

L'extravasation des neutrophiles implique la réorganisation des jonctions cellulaires, ce qui implique la redistribution de VE-cadhérines. Ces protéines possèdent 8 sites de N-glycosylation, tous situés sur le segment extracellulaire. Elles portent principalement des motifs complexes bi-antennés, fucosylés avec des acides sialiques terminaux^{341,342}. Il semble que le haut degré de sialylation présent à l'état naturel sur les VE-cadhérines leur confère une charge négative qui participe au maintien de jonctions adhérentes. Les phénomènes inflammatoires pourraient venir perturber la glycosylation des VE-cadhérines, la perte des terminaisons sialylées ayant pour conséquence une ouverture des jonctions et donc une plus grande perméabilité³⁴³.

Au terme de la transmigration, les HS de la membrane basale peuvent présenter des chimiokines aux leucocytes. La libération d'enzymes par les leucocytes, notamment l'héparanase, solubilise la membrane basale. La présentation des chimiokines sur les fragments de HS ou sur les protéoglycanes permet le chimiotactisme et oriente l'extravasation³²².

La [Figure 25](#) résume l'importance de la glycosylation des différentes molécules dans la cascade d'adhésion.

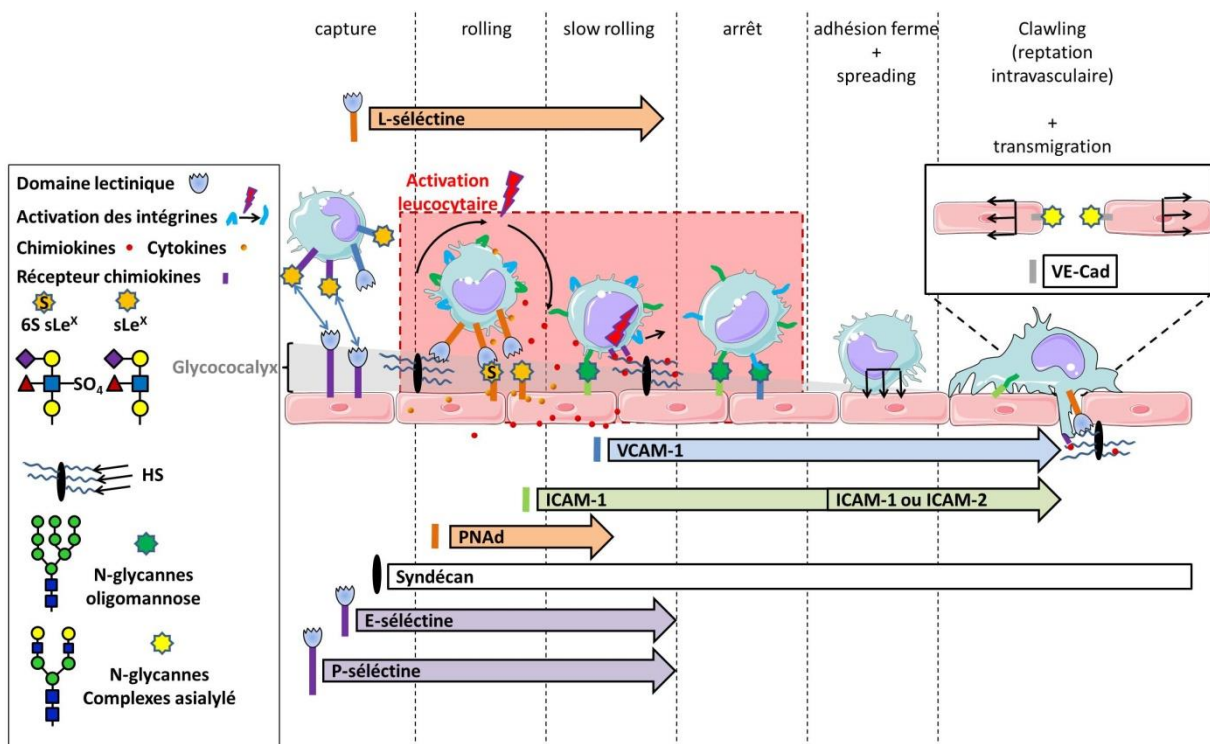


Figure 25 : rôles des glycanes dans la cascade d'adhésion.

IV.B.2. La modification de la glycosylation endothéliale influence le recrutement des leucocytes

L'idée que la glycosylation des protéines pourrait influencer le recrutement des cellules circulantes a été évoquée dès 1993 par l'équipe de Gehlsen³³⁴. Dans cette étude *in vitro*, des HUVECs ont été traitées avec un inhibiteur des mannosidases I (DMJ). Ce traitement provoque une augmentation des N-glycanes hautement mannosylés. Ce changement de profil de glycosylation est responsable d'une adhésion deux fois plus importante des neutrophiles activés. Les auteurs attribuent cette augmentation à une interaction modifiée entre les intégrines $\beta 2$ portées par les leucocytes et ICAM-1 portée par les CE. En 1994, une étude a mis en évidence l'importance des motifs glycaniques dans l'adhésion de neutrophiles sur des HUVECs exposées aux ROS. Les espèces réactives de l'oxygène provoquent une augmentation de l'adhésion médiée par des motifs glycaniques. Ces derniers semblent portés par ICAM-1 et interagissent avec les L-sélectines des neutrophiles. Une inhibition de l'adhésion est obtenue par un mélange d'anticorps anti-ICAM-1, anti-LFA-1, de mannose 6-P et d'acide sialique. Les auteurs prouvent par ailleurs que l'augmentation de l'adhésion est bien due à un changement de glycosylation, car elle est indépendante de l'augmentation d'ICAM-1²⁸⁹. Plus récemment, des souris déficientes en core 1 et core 2 portant le 6-sulfo-sialyl-Lewis X ont été utilisées pour étudier ces motifs. Le motif 6-sulfo-sialyl-Lewis X est connu pour être un ligand des sélectines leucocytaires. Son absence réduit drastiquement le recrutement leucocytaire dans les HEV. Cependant, malgré l'absence de ce motif, une importante adhésion dans les HEV est observée. L'étude révèle en effet l'existence de N-glycanes portant le motifs 6-sulfo-sialyl-Lewis X et jouant le rôle de ligand vis-à-vis des L-sélectines³⁴⁴. Il existe donc plusieurs preuves de l'importance des glycanes dans les processus inflammatoires et dans l'adhésion des cellules immunitaires à l'endothélium.

Dans une première étude, *in vitro* (évoqué en [partie IV.A.1.b](#)), l'équipe de Patel démontre que suite à un stimulus au TNF- α , les HUVECs expriment des motifs hautement mannosylés. La modification de la glycosylation est localisée aux jonctions cellulaires, qui sont également le lieu des interactions avec les leucocytes. Après exposition des HUVECs au TNF- α , l'adhésion des cellules THP-1 (une lignée cancéreuse de monocytes) est augmentée. La co-incubation des monocytes avec l' α -méthylmannose, ou le traitement des HUVECs avec la roziglitazone permettent une diminution de l'adhésion des monocytes. Cette diminution est observée seulement en condition dynamique (flux). On sait que le TNF- α augmente l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine. On sait également que le traitement à la roziglitazone n'atténue pas l'expression des molécules d'adhésion^{345,346}. Cependant l'adhésion de leucocytes est tout de même diminuée. Il existe donc un mécanisme induit par la roziglitazone qui permet de diminuer l'adhésion sans diminuer les molécules d'adhésion. L'incubation des THP-1 avec l' α -méthylmannose démontre que les motifs hautement

mannosylés, surexprimés après exposition au TNF- α , jouent un rôle dans l'adhésion des leucocytes. La roziglitazone pourrait modifier l'expression des glycanes sans modifier l'expression des molécules d'adhésion. Ces expériences laissent penser que l'augmentation de motifs hautement mannosylés empruntent une voie différente de celle qui augmente l'expression des molécules d'adhésion après TNF- α . Dans cette configuration, les modifications de la N-glycosylation sont une cible pour les ligands PPAR γ . Les auteurs suggèrent que la régulation de la composition en mannose des CAMs est un mécanisme anti-inflammatoire mené par les ligands PPAR γ ²³⁶.

L'exposition des CE à un flux turbulent, considéré comme pro-inflammatoire, a été démontré *in vitro* et *in vivo* comme générateur de N-glycanes hautement mannosylés. *In vitro*, l'adhésion des THP-1 s'en trouve également modifiée²³⁰. Une inhibition de la glycosylation par des inhibiteurs des mannosidases I (kifunensine) et II (swainsonine) potentialise l'adhésion induite par le TNF- α . Si ces inhibiteurs ne permettent pas seuls d'augmenter l'adhésion définitive des leucocytes, une augmentation du *rolling* est tout de même visible. L'étude par Western blot des molécules d'adhésion (ICAM-1 et VCAM-1) montre une modification du poids moléculaire de ces protéines dans les cellules exposées au TNF- α co-incubées ou non avec les inhibiteurs. Les molécules d'adhésion sont exprimées à la surface et le marquage des motifs hautement mannosylés est augmenté après exposition. Tous ces résultats concourent donc à démontrer que la glycosylation de molécules d'adhésion est modifiée par les stimuli pro-inflammatoires, et ce sans perturber le trafic des CAMs vers les membranes. Ces modifications ont un effet sur l'adhésion des THP-1 en condition dynamique. En effet, le masquage ou la suppression de ces motifs, respectivement par des lectines (Con A) ou par l'endoglycosidase H, permettent de réduire l'adhésion induite par le TNF- α en condition dynamique.

On note que l'hypoglycosylation des épitopes ne provoque l'adhésion des monocytes qu'en condition dynamique. L'adhésion, évaluée en condition statique, ne semble pas modifiée. On considère généralement que l'adhésion ferme est majoritairement médiée par ICAM-1 et VCAM-1. Cependant, des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que ICAM-1 et VCAM-1 peuvent jouer des rôles importants dans la régulation du *rolling*, spécialement en faible stress de cisaillement^{347,348}. Dans cette expérience, il est donc suggéré que l'augmentation de l'adhésion en condition dynamique met en jeu l'hypoglycosylation d'ICAM-1 et de VCAM-1.

Le fait que différents stimulus puissent induire différentes glycoformes d'une même protéine est en accord avec les travaux précédents qui ont montré que l'expression de molécules d'adhésion peut être indépendante de leur glycosylation. En effet, les différentes glycoformes d'une même glycoprotéine peuvent chacune occuper une fonction différente. Par exemple, la P-sélectine

endothéliale reconnaît PSGL-1 lorsqu'il porte un O-glycane sialylé en α -2,3. Il se trouve que seulement une faible partie de PSGL-1 est sialylée, ce qui signifie que le reste ne sert pas de ligand aux P-sélectines²³⁶.

IV.B.3. Pathologies associées à une modification du glycome

Nous avons vu que les stimuli, notamment inflammatoires, provoquent une modification de la glycosylation membranaire chez les CEs. D'autres stimuli, pro-angiogéniques²⁸⁵, tumoraux²⁸⁷, apoptotiques^{349,350}, ou encore hypoxiques³⁵¹, sont également capables d'induire des modifications du glycome. En raison du rôle essentiel des motifs glycaniques dans les réactions immunitaires et particulièrement dans la cascade d'adhésion, l'étude du glycome et du glycocalyx dans les maladies inflammatoires chroniques revêt une importance particulière.

IV.B.3.a. Maladies auto-immunes

Les maladies auto-immunes, souvent associées aux maladies inflammatoires chroniques, sont le résultat d'un emballement du système immunitaire et inflammatoire qui répond de manière disproportionnée à un ou des stimuli. Peu de pistes existent sur leurs origines. Cependant, en raison de l'importance des motifs glycaniques dans les phénomènes inflammatoires, plusieurs articles pointent l'intérêt de l'étude du glycome pour comprendre la physiopathologie de ces affections. Ainsi la perte de galactosylation des N-glycanes portés par les IgG pourrait jouer un rôle dans la polyarthrite rhumatoïde³⁵². Dans la sclérose en plaque, des facteurs de prédisposition génétiques et environnementaux semblent mener à une dérégulation de la N-glycosylation. La perte de l'antennation des N-glycanes des récepteurs des lymphocytes T (TCR) semble promouvoir un recrutement et une inflammation chronique²³⁵. De manière similaire, le déclenchement du lupus érythémateux pourrait trouver son origine dans une diminution de l'activité des mannosidases II, qui réduit aussi le branchement des N-glycanes. Ce signal semble être interprété par le système immunitaire comme un épitope du non-soi aux propriétés antigéniques³⁵³. Dans ces maladies, les sélectines et leurs ligands glycaniques sont étudiés avec attention. En effet, il est probable que des modifications soient impliquées dans la pathogenèse³⁵⁴.

IV.B.3.b. Diabète

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune provoquée par la disparition des îlots de Langerhans. L'étude des modèles de souris développant cette pathologie révèle l'importance de MAdCAM-1 et de PNA_d dans l'inflammation pancréatique à l'origine de la pathologie. L'augmentation de l'expression de ces deux ligands des sélectines dans les veinules endothéliales pancréatiques est corrélée à un important infiltrat leucocytaire. MAdCAM-1 est un ligand pour l'intégrine α 4 β 7 leucocytaire et pour la L-sélectine. Quant à PNA_d, elle est reconnue sur les veinules pancréatiques par la L-sélectine. Des essais avec des anticorps monoclonaux ont permis de moduler

ces interactions sans éviter complètement l'apparition du phénotype pathologique. D'autres ligands sont donc à l'œuvre dans cette réaction immunitaire. En effet, le masquage de CD44 par un anticorps permet d'enrayer l'apparition de la pathologie. Cependant, sa localisation étant autant leucocytaire qu'endothéliale, le rôle de cette glycoprotéine dans le déclenchement du diabète de type 1 reste à élucider. Ces données soulignent l'importance du rôle joué par les glycoprotéines endothéliales, ligands des sélectines dans la genèse de la maladie. L'étude de la glycosylation de ces protéines pourrait apporter des pistes thérapeutiques³⁵⁴.

Dans leurs travaux, Nieuwdorp *et al.* ont étudié le volume du glycocalyx systémique chez des patients sains soumis à un stimulus d'hyperglycémie aiguë²⁶⁷. Pour ce faire, des traceurs solubles et non solubles dans le glycocalyx ont été perfusés et dosés. Les auteurs ont reporté une diminution de moitié de l'épaisseur du glycocalyx après 6 h en condition hyperglycémique. L'équipe a réitéré l'étude en utilisant la même méthode chez les patient diabétiques de type 1. Dans ce cas, les auteurs observent une épaisseur du glycocalyx deux fois moins importante. Lorsque ces patients diabétiques sont atteints de microalbuminurie, l'épaisseur du glycocalyx est encore plus faible³⁵⁵. Toujours dans cette étude, les niveaux plasmatiques de HA et de hyaluronidases ont été dosés et relevés comme plus élevés chez les patients diabétiques. Les auteurs interprètent ces variations comme le signe d'une augmentation de la synthèse et de la dégradation des HA en condition hyperglycémique. Ces études démontrent que l'hyperglycémie aiguë²⁶⁷ ou chronique³⁵⁵ (diabète) provoque une réduction de l'abondance du glycocalyx. Ces dommages au glycocalyx peuvent être mis en relation avec la dysfonction endothéliale en condition hyperglycémique constaté chez le patient sain^{257,356}.

Plusieurs mécanismes sont avancés pour expliquer la réduction du glycocalyx chez les patients diabétiques. Le premier mécanisme proposé serait dû directement à l'augmentation de la concentration plasmatique en glucose provoquant un *shedding*. D'autres équipes ont par ailleurs prouvé que l'hyperglycémie est associée à l'existence d'altérations des fonctions artérielles, telles qu'une relaxation induite par la contrainte de cisaillement et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Ces équipes ont pu relier ces altérations à une dégradation du glycocalyx. Il est suggéré que le glucose interagit directement avec le glycocalyx et influence sa structure^{267,271}. Un des autres mécanismes envisagés prend pour cible le HA. Dans leur revue, Lennon et Singleton suggèrent que la perméabilité vasculaire pourrait être altérée suite à une biosynthèse défectueuse de HA de plus faible poids moléculaire, une augmentation de l'expression des hyaluronidases et des ROS, mais aussi une modification de CD44. Ces phénomènes concourent ensemble à l'activation intracellulaire de RhoA capable d'agir sur le cytosquelette et de relâcher les jonctions serrées existant entre les CE³⁵⁷ (*Figure 26*).

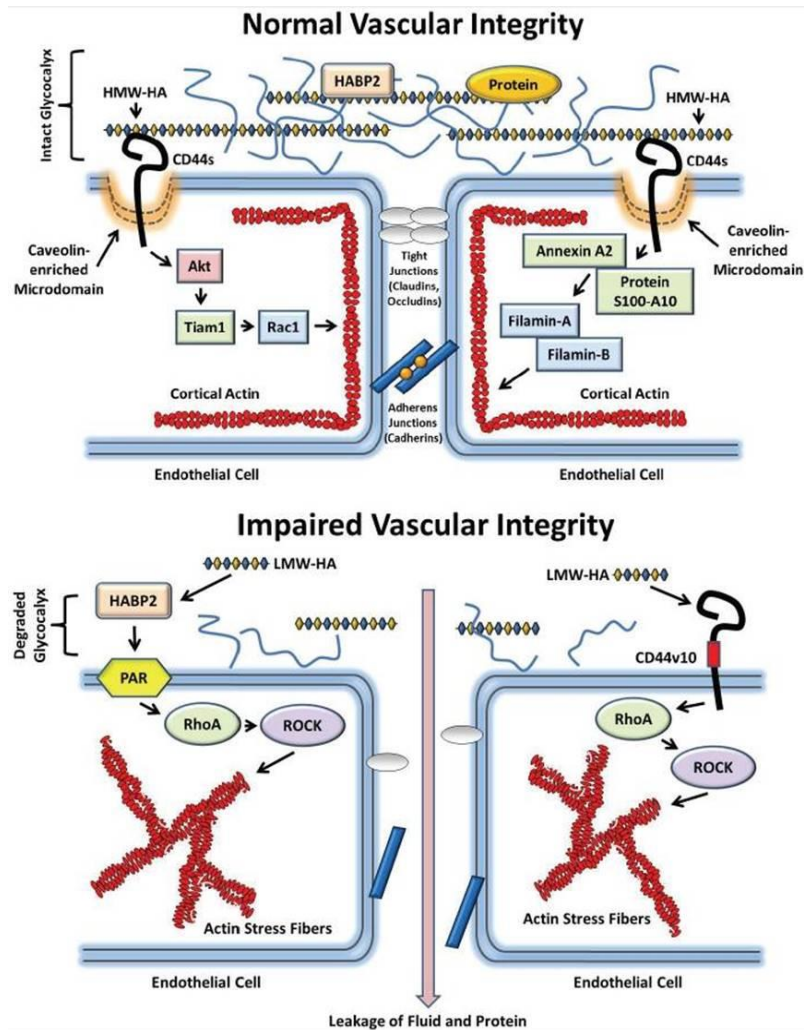


Figure 26 : mécanisme proposé pour expliquer la perte d'intégrité vasculaire dans les maladies inflammatoires chroniques.

Panneau supérieur : fonctionnement normal ; panneau inférieur fonctionnement pathologique. La perte des HA induit un signal intracellulaire agissant sur l'actine. Des fibres de stress apparaissent et les jonctions intercellulaires sont relâchées (d'après Lennon *et al.*³⁵⁷).

IV.B.3.c. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Plusieurs études se sont intéressées au rôle de la glycosylation dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), qui regroupent la maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique. Des modèles animaux et des études cliniques ont mis au jour l'importance de la glycosylation dans la pathogenèse de ces affections. Une diminution de la glycosylation de la sécrétion muqueuse a été observée chez ces patients. Dans le sérum, une baisse de la galactosylation des IgG a été proposée comme marqueur³⁵⁸. MAdCAM-1 est constitutivement exprimée dans la *lamina propria*, mais son expression est augmentée en contexte de MICI. Son interaction avec les L-sélectines et les intégrines des lymphocytes T a été démontrée *in vivo*. La PNA_d a aussi été identifiée dans les HEV durant la phase aiguë de développement de la rectocolite³⁵⁹. L'expression de PSGL-1 est aussi augmentée dans les microvaisseaux intestinaux. Comme dans le cas du diabète, CD44 et PSGL-1 semblent jouer un rôle important^{271,354}.

IV.B.3.d. Athérosclérose

L'athérosclérose est une affection des artères de gros calibre. Le facteur de risque prépondérant dans l'apparition de cette maladie est une concentration sanguine élevée de LDL. Les lésions athérosclérotiques se développent préférentiellement sur des sites artériels présentant un flux sanguin turbulent. Le dépôt sub-endothélial de LDL conduit à une inflammation chronique des vaisseaux et potentiellement à la formation de plaques d'athérome. Dans les vaisseaux présentant ces symptômes, on note une augmentation de l'expression de PSGL-1³⁶⁰. Un modèle *in vitro* de CE soumises à un stress athérosclérotique a permis l'identification de motifs N-glycaniques hautement mannosylés à la surface de l'endothélium. L'augmentation de ces motifs a été vérifiée *in vivo* chez l'Humain. Ces motifs pourraient être responsables de l'important recrutement leucocytaire au niveau des plaques athérosclérotiques²³⁰. Une étude complémentaire portant sur la glycosylation d'ICAM-1 a permis de confirmer l'importance de la glycosylation des molécules d'adhésion dans ces phénomènes³³³. Enfin, le modèle de souris ApoE-/- présentant des lésions athérosclérotiques a permis de mettre en évidence l'existence d'une modification des motifs glycaniques au niveau de ces lésions. Chez ces souris, l'augmentation des N-glycanes oligomannosidiques favorise le recrutement de leucocytes et chronicise l'inflammation^{230,361}. Une fois encore, la glycosylation endothéliale semble être un médiateur important de l'inflammation chronique. Ces études suggèrent un lien entre auto-immunité et inflammation chronique.

Le glycocalyx joue aussi un rôle important dans la progression et le maintien d'un phénotype athérosclérotique. Le rôle du glycocalyx dans l'athérosclérose n'est pas encore bien établi, mais il existe de sérieuses raisons de croire que cette structure glycanique joue un rôle dans le développement des plaques d'athérome²⁵⁷. Une première preuve a été révélée par Vink *et al.*³⁶². Le glycocalyx a été observé en vidéomicroscopie intravitale sur le muscle crémaster de hamster. Les animaux ont reçu une dose cliniquement significative de LDL oxydées (Ox-LDL) ou une injection placebo. Les résultats montrent une destruction du glycocalyx et une adhésion augmentée des plaquettes. Une injection concomitante de SOD et de catalase inhibe complètement l'effet des LDL oxydées. Le mélange catalase/SOD catalyse la dismutation de l'anion superoxyde et la décomposition du peroxyde d'hydrogène, inhibant ainsi l'effet des LDL oxydées. Ces résultats mettent en évidence l'implication des ROS/RNS dans la destruction du glycocalyx en condition inflammatoire. Plus précisément, le *shedding* du glycocalyx provoque la disparition des enzymes protectrices du glycocalyx, principalement la eSOD, aboutissant à l'apparition d'un stress oxydatif au niveau du glycocalyx et de la CE (voir [partie IV.A.2 Modifications du glycocalyx](#)). L'étude de van den Berg *et al.* s'est intéressée au glycocalyx en contexte athérosclérotique³⁶³. Des souris KO pour le gène ApoE ont été soumises à une diète riche en lipides. Leur glycocalyx et l'épaisseur de leurs vaisseaux ont été

comparés à ceux de souris sauvages sans régime particulier. Une réduction de l'épaisseur du glycocalyx ainsi qu'un épaissement de l'intima ont été constatés sur le modèle de souris athérosclérotiques. Cette étude suggère que des conditions pro-athérosclérotiques conduisent à une diminution de la capacité de barrière protectrice du glycocalyx. Le glycocalyx semble donc être impliqué dans l'initiation et la progression du processus athérosclérotique^{257,278}.

IV.B.3.e. Cancer

L'altération des motifs glycaniques est une des caractéristiques des cellules cancéreuses. Elles sur- ou sous-expriment des motifs naturellement présents, mais sont aussi capables d'induire la synthèse de motifs et de branchements non physiologiques, ou de structures normalement exprimées pendant l'embryogenèse. Ces glycosylations anormales sont associées aux phénomènes tels que l'invasion et la métastase tumorale, ainsi que l'angiogenèse. La **Figure 27** présente certains des motifs surexprimés sur les cellules cancéreuses.

Plus de 50 % des cancers sont connus pour exprimer des TACAs (*tumour associated carbohydrate antigens*). Ces antigènes peuvent être des glycolipides comme les gangliosides (GM1, GM2, GD2 et GD3), des motifs Lewis A, X ou Y et des antigènes de Thomsen Friedenreich. Les modifications les plus fréquemment relevées dans les tissus cancéreux sont des augmentations de la sialylation. Chez les O-glycanes, l'antigène Tn est augmenté, et sa sialylation en $\alpha 2,6$ l'est aussi (formation du sialyl-Tn). Cette anomalie de glycosylation est associée à la progression tumorale. La sialylation $\alpha 2,6$ des N-glycanes est aussi augmentée. La polysialylation (sialylation en $\alpha 2,8$) est également augmentée chez les N- et O-glycanes. Une des autres modifications courantes de la glycosylation est l'augmentation du branchement des N-glycanes due à une augmentation de l'activité de la GlcNAc-transférase 5 (GnT-5). Cette modification intervient notamment sur l'E-cadhérine. Elle a pour conséquence une dissociation des jonctions cellulaires qui favorise la métastase des cellules cancéreuses. L'augmentation de la fucosylation en $\alpha 1-6$ est couramment observée et a été associée au développement tumoral^{364,365}. La modification de la glycosylation de certains récepteurs des facteurs de croissance est impliquée dans la croissance et la prolifération tumorale. Par exemple, des modifications de glycosylation du récepteur endothélial VEGFR modulent ses interactions avec les galectines et promeuvent l'angiogenèse tumorale³⁶⁶. Enfin, l'augmentation chez les cellules tumorales de la fucosylation et de la sialylation augmente l'expression des motifs sLe^x et sLe^a qui, reconnus par les sélectines endothéliales, permettent l'adhésion au CE et la transmigration nécessaire à la colonisation de nouveaux tissus. La glycosylation est donc une composante indispensable de l'état métastatique des cellules tumorales³⁶⁵.

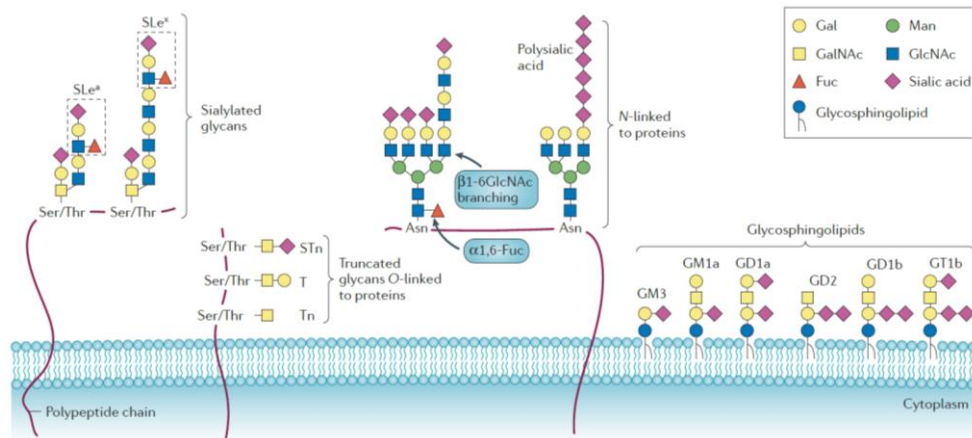


Figure 27 : principaux glycanes surexprimés par les cellules cancéreuses (d'après Pinho *et al.*³⁶⁵). De gauche à droite : motifs sialylés portant les SLe^x ; O-glycanes tronqués (antigènes Tn, T et STn) ; augmentation de la fucosylation et du branchement des N-glycanes, polysialylation ; gangliosides.

IV.B.4. Le zip code

La glycosylation des molécules d'adhésion est régulée au cours des processus inflammatoires. On a vu que les modifications peuvent intervenir sur les molécules d'adhésion et qu'elles peuvent influencer le recrutement des cellules inflammatoires. Dans l'article de Scott *et al.*²³⁰, la seule modification de la glycosylation par les inhibiteurs des mannosidases ne suffit pas à induire l'adhésion. En revanche, la stimulation du tapis endothélial par le TNF- α induit l'expression de molécules d'adhésion hypoglycosylées, ce double signal provoquant une augmentation de l'adhésion. En effet, les glycanes hautement mannosylés exprimés par les CE constituent des ligands pour les monocytes, et permettent leur *rolling* et leur adhésion. Les CAMs servent ici de support pour les « véritables » ligands des sélectines et intégrines leucocytaires que sont les glycanes et les molécules sulfatées²⁸³. Cependant, il ne faut pas conclure que le simple ajout d'un motif sur une protéine en fait un ligand valable : la structure glycanique en elle-même n'est pas suffisante comme ligand³⁶⁷. En fait, la juste combinaison de la bonne protéine et du bon glycanes est nécessaire à la reconnaissance par les récepteurs (voir Figure 28).

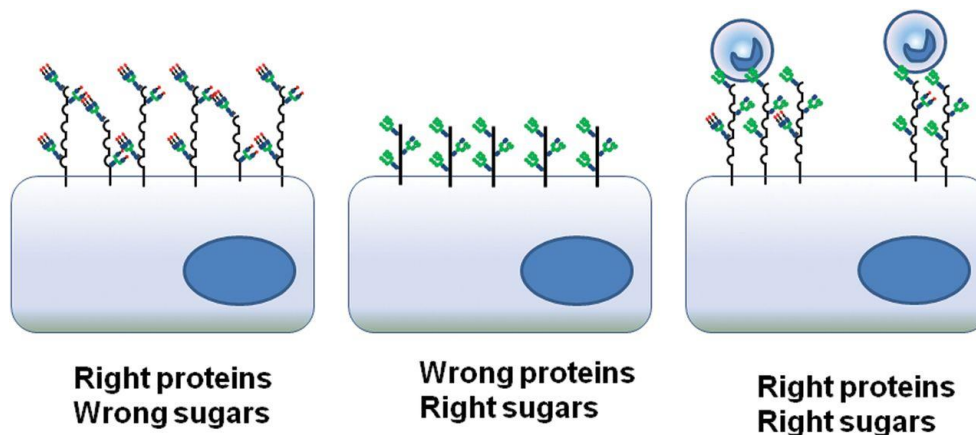


Figure 28 : hypothèse du zip code (d'après Scott *et al.*²⁵¹).

L'hypothèse selon laquelle le recrutement leucocytaire nécessite une combinaison appropriée de protéines particulières portant des motifs glycaniques particuliers a été formulée pour la première fois en 2002 sous le nom de « *zip code* »²⁹². La glycosylation constituerait donc une sorte de code d'adressage reconnu par les leucocytes et orientant leurs recrutement. Cette théorie prend en compte l'hétérogénéité glycanique des lits vasculaires et explique leurs différences de réponse à un même stimulus^{291,292}. En fonction de l'origine des lits vasculaires et du stimuli, les CE modulent leurs glycosylation pour opérer le recrutement de certains types leucocytaires^{230,251,292,329}.

IV.B.5. Glycome et signal de danger

Cette revue de la littérature a permis de faire un tour d'horizon des modifications de la glycosylation, de ses effets fonctionnels et de ses conséquences pathologiques. Nous pouvons à présent nous interroger sur la signification à donner à ces modifications. On peut envisager les modifications du glycome comme une simple conséquence du stimulus. Dans ce cas, les modifications des glycanes seraient des bons marqueurs de l'état pathologique. En effet, les tissus cancéreux présentent des modifications glycaniques spécifiques utiles au diagnostic. Cependant, le rôle fonctionnel des glycanes permet de les envisager comme des signaux cellulaires. L'hypothèse du *zip code* évoque l'intérêt de considérer les glycanes comme une complexification des signaux protéiques. Le glycome pourrait être porteur de signaux appelant à engager une réponse systémique. Vu sous cet angle, le glycome constitue une cible thérapeutique d'intérêt. La modulation des motifs glycaniques offrirait ainsi l'opportunité d'éteindre les signaux pathologiques et d'éviter l'apparition des affections.

J. Rachmilewitz propose d'envisager la glycosylation comme un indicateur de l'homéostasie cellulaire³⁶⁸. Ce « baromètre glycanique » constitue un signal pour le système immunitaire. En effet, les cellules à l'état physiologique ont tendance à présenter des structures glycaniques complètes avec des extrémités terminales matures. Le glycome des cellules saines ne déclenche pas de réaction immunitaire. A l'inverse, les cellules pathologiques (stressées ou endommagées) expriment ou relarguent des glycanes incomplets, aux terminaisons aberrantes, voire avec des motifs spécifiques. Ces signaux pourraient être interprétés comme des modifications délétères voire des signaux de danger (DAMP, PAMP). Ainsi l'apparition de carbohydrates atypiques ou du moins une élévation significative de leur proportion serait un phénotype détectable par le système immunitaire.

Plusieurs raisons amènent à envisager le glycome comme un signal immunitaire de danger :

- La glycosylation étant ubiquitaire, le signal peut être émis par tous les types cellulaires. Pour autant, chaque type cellulaire peut réagir différemment au même stimulus (exemple de la glycosylation différentielle des lits vasculaires : [partie IV.A.1](#))
- Le signal glycanique est le fruit d'une multitude de gènes et d'un grand nombre d'enzymes en constante compétition. Cela le rend très sensible : sa modulation est finement

dépendante des modifications environnementales, ce qui fait du glycome un signal robuste, résilient et sensible.

- Le renouvellement rapide du glycome membranaire (quelques heures) en fait un système très réactif.
- La reconnaissance des carbohydrates offre un large éventail de liens possibles avec les effecteurs de l'immunité. Plusieurs réactions immunologiques peuvent ainsi être orchestrées par des stimuli relativement simples.

Cette hypothèse permet d'expliquer beaucoup des phénomènes observés, comme l'abondance des domaines lectiniques dans le système immunitaire. Cela expliquerait également pourquoi la plupart des lectines qui reconnaissent les acides sialiques (sialec) ont majoritairement des propriétés inhibitrices, à l'inverse des lectines qui reconnaissent des mannoses qui ont des effets activateurs³⁶⁸. Notre revue de la littérature a permis de montrer que la glycosylation membranaire, notamment au niveau endothélial, était impliqué dans l'initiation et le déclenchement de nombreuses maladies liées à l'immunité et à l'inflammation chronique. La glycosylation pourrait donc correspondre à un signal immunitaire de danger.

Le glycome endothélial subit au cours de l'inflammation de nombreuses modifications. Cette modulation influence le recrutement des cellules circulantes. Ces modifications sont aussi observables dans les MIC, dans les lésions athérosclérotiques et dans les cancers. De ce fait, le glycome pourrait constituer une cible thérapeutique. En modulant le glycome pour rétablir les motifs physiologiques ou en empêchant les interactions dues aux motifs pathologiques, on peut espérer réduire le recrutement leucocytaire pathologique. Dans le cas des leucémies, un essai clinique en ce sens est déjà en cours. Dans l'endothélium irradié, la caractérisation du glycome et de ses interactions avec les cellules circulantes n'a jamais été effectuée. L'identification de motifs radio-induits et l'élucidation de leur rôle dans le recrutement leucocytaire pourrait offrir une issue thérapeutiques aux dommages radio-induits.

Problématique

Les RI utilisés dans le cadre des RT induisent des effets moléculaires, cellulaires et tissulaires à la fois complexes et persistants. Ces mécanismes sont à l'origine d'effets secondaires des RT. La zone abdominopelvienne est une des principales aires d'application. 60 à 80% des patients traités par RT dans cette sphère déclarent des effets secondaires pendant le traitement ou dans les mois qui suivent. Dans 5 à 10 % des cas, les patients déclarent des complications chroniques ou tardives³⁶⁹⁻³⁷¹. De nombreux travaux soulignent l'importance du système vasculaire, et notamment de l'endothélium, dans la survenue de ces complications. L'activation endothéliale radio-induite participe entre autres à l'établissement et au maintien d'un phénotype pro-coagulant et pro-inflammatoire. Ce phénotype favorise le recrutement chronique des cellules circulantes (thrombocytes et leucocytes) et est soupçonné d'être à l'origine des effets délétères. Par bien des aspects, la chronicité de l'inflammation radio-induite se rapproche de celle observée lors des maladies inflammatoires chroniques. Dans ces affections, les stimuli inflammatoires provoquent la modification du glycome endothélial. Ces modifications constituent un signal vis à vis des cellules circulantes et sont déterminantes dans le recrutement des leucocytes. De précédents travaux menés au laboratoire ont déjà mis en évidence des modifications de la glycosylation des protéines du sérum après une irradiation locale à forte dose chez la souris³⁷². De manière similaire, une évolution de la glycosylation du sérum a pu être observée chez les patients traités par RT³⁷³. Les RI sont donc à même d'induire des modifications de la glycosylation. L'étude du glycome endothélial offre l'opportunité d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques exploitables pour lutter contre les effets secondaires des RT.

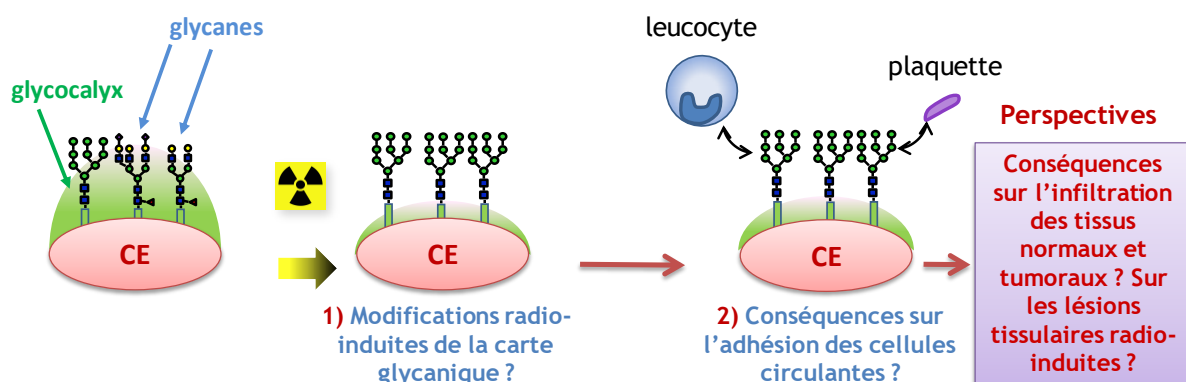


Figure 29 : problématique du projet.

Dans ce travail de thèse, nous avons voulu savoir dans un premier temps si l'irradiation provoque une modification du glycome chez la CE. Nous avons donc mis en place une série de travaux visant à observer l'évolution du glycome endothélial en réponse à l'irradiation. D'autre part, le recrutement

chronique des leucocytes à l'origine des effets délétères pourrait être influencé par une évolution du glycome endothélial. Dans un deuxième temps, nous avons alors cherché à savoir dans quelle mesure la modification radio-induite de la glycosylation endothéliale pouvait influencer le recrutement des cellules circulantes et plus particulièrement des leucocytes. La [Figure 29](#), résume la problématique du projet et les questions posées au début de ce travail.

Résultats

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet de thèse font l'objet d'un article soumis pour publication en décembre 2016. Nous résumerons brièvement les objectifs, résultats obtenus, et concluons sur cette étude. Le manuscrit de l'article suit cette courte introduction et présente les résultats de l'étude. La *partie Résultats supplémentaires* expose les résultats non soumis à publication. Dans la discussion de ce mémoire, l'ensemble des résultats est discuté en détail.

I. Présentation de l'article

I.A. Objectifs

Après irradiation, l'endothélium vasculaire présente un phénotype pro-inflammatoire et pro-thrombotique. Chez les CE soumises à une inflammation aiguë et/ou chronique, la glycosylation membranaire est modifiée. Nous faisons donc l'hypothèse que l'irradiation pourrait induire une modification de la glycosylation membranaire endothéliale.

Le phénotype pro-inflammatoire des CE après irradiation augmente le recrutement des leucocytes circulants. De précédents travaux menés au laboratoire et par d'autres équipes ont montré que l'augmentation radio-induite de l'adhésion était due à une surexpression des molécules d'adhésion. Or, la glycosylation des molécules d'adhésion influence très fortement le recrutement des cellules circulantes. S'il existe une modification radio-induite de la glycosylation, elle pourrait participer à l'adhésion leucocytaire radio-induite. Il s'agit donc d'évaluer les effets fonctionnels d'une modification radio-induite du glycome sur le recrutement leucocytaire.

I.B. Résultats

Dans cette thèse, des CE primaires (HUVECs) irradiées à 20 Gy ont été suivies en cinétique entre 1 et 21 jours post-exposition. Les N-glycanes membranaires ont été étudiés grâce à des lectines fluorescentes en microscopie et en cytométrie de flux. Les N-glycanes totaux ont été quantifiés par spectrométrie de masse (MALDI-TOF). Ces expériences montrent une augmentation de la proportion de N-glycanes hautement mannosylés et une diminution des motifs complexes. D'autre part, le dosage de l'acide uronique suggère une diminution de la quantité de GAG, signe d'une diminution probable de l'épaisseur du glycocalyx en réponse à l'irradiation. Les structures glycaniques hautement mannosylées sont connues pour leurs implications dans le recrutement des leucocytes dans les phénomènes inflammatoires. De plus une diminution de l'abondance du glycocalyx facilite les interactions entre l'endothélium et les cellules circulantes.

Les conséquences fonctionnelles de ces modifications ont été évaluées *in vitro* grâce à un test d'adhésion cellulaire en conditions dynamiques. L'adhésion ferme des leucocytes sur les HUVECs est augmentée après irradiation. L'utilisation d'un sucre compétiteur des N-glycanes hautement mannosylés permet d'atténuer l'adhésion radio-induite. Ces résultats suggèrent le rôle de ces structures dans le recrutement des leucocytes au niveau des tissus irradiés. Une étude transcriptomique ciblée sur 84 gènes de glycosylation révèle la modification de l'expression de 24 gènes codant pour des enzymes de glycosylation. Ces résultats sont en accord avec l'augmentation de l'expression des N-glycanes hautement mannosylés. Ils démontrent par ailleurs une expression augmentée des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des O-glycanes de type mucines. Des marquages membranaires par des lectines fluorescentes ont permis de révéler une augmentation des structures O-glycaniques comme le suggérait le profil d'expression génique.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'existence de ces modifications *in vivo*. Nous avons utilisé un modèle de souris irradiées à 19 Gy au niveau d'une anse intestinale. L'analyse transcriptomique ciblée sur 84 gènes codant pour les enzymes de glycosylation a permis d'identifier 25 gènes dont les niveaux d'expression sont modifiés après irradiation. La N- et la O-glycosylation pourraient être affectées. De plus, il existe plusieurs similitudes avec le profil transcriptionnel des HUVECs.

I.C. Conclusion

Notre étude indique que l'irradiation induit des modifications de la glycosylation endothéliale. *In vitro*, les N-glycanes présentent une forme peu mature hautement mannosylée. Une augmentation de la O-glycosylation est constatée avec une probable surexpression des cores 1 et 2. Enfin, la quantité de GAGs est diminuée. Chez la souris, l'étude des gènes codant pour les enzymes de glycosylation semble indiquer que des profils similaires à ceux obtenus chez le modèle HUVECs pourraient exister à l'échelle tissulaire. Ensemble, ces résultats permettent d'établir une carte glycanique des CE en réponse à l'irradiation. Le profil obtenu présente plusieurs caractéristiques communes avec les CE soumises à un stress pro-inflammatoire.

L'existence d'une modification de la glycosylation endothéliale nous a amenés à vérifier son influence sur le recrutement leucocytaire. Nous avons établi que la surexpression endothéliale de N-glycanes hautement mannosylés influence positivement l'adhésion des monocytes. Cependant, d'autres modifications radio-induites de la glycosylation pourraient elles aussi influencer le recrutement des leucocytes ou des thrombocytes.

L'influence du glycome dans le recrutement radio-induit des cellules circulantes permet d'imaginer des stratégies pour réduire le recrutement chronique des cellules circulantes et diminuer l'impact des RT sur les OAR.

II. Justification des modèles

II.A. HUVECs

Pour étudier le glycome endothélial *in vitro*, nous avons fait le choix du modèle HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells). Mon projet de thèse s'inscrit dans le programme ROSIRIS de l'IRSN. Ce programme a pour objet une meilleure compréhension des effets secondaires des radiothérapies, et en particulier du rôle des cellules endothéliales dans l'initiation et l'évolution des lésions radio-induites. Dans le cadre de ce programme, les HUVECs ont été choisies comme modèle de cellules endothéliales. Plusieurs arguments soutiennent ce choix. Tout d'abord, les HUVECs sont des cellules primaires, elles sont donc physiologiquement proche de l'état tissulaire, par comparaison à une lignée immortalisée ou cancéreuse. Ensuite, il s'agit de cellules humaines, ce qui est cohérent avec l'étude des effets secondaires de la RT chez l'Homme. Issues de cordon ombilical, ces cellules présentent un phénotype plus universel, ou moins spécifique, que des cellules microvasculaires endothéliales issues de tissus adultes. Elles expriment tous les marqueurs endothéliaux, comme le CD31 ou le vWF. De plus, il s'agit de cellules « jeunes », ayant subi un faible nombre de division cellulaires, puisqu'elles sont d'origine fœtale. Elles sont donc moins sujettes à entrer en sénescence répllicative, un processus qui pourrait interférer avec l'effet des rayonnements ionisants connus pour induire de la sénescence prématurée. D'autre part dans la littérature, la réponse inflammatoire et la réponse endothéliale radio-induite ont été très étudiées avec le modèle HUVEC. De même, les études du glycome endothélial, bien qu'elles soient rares, sont souvent menées sur ce modèle. Il est donc plus aisé d'avoir un recul sur la réponse de ces CE aux stimuli. Aussi, elles présentent l'avantage technique de mieux supporter les protocoles de transfections, ce qui offre la possibilité de moduler l'expression des gènes radio-induits. Enfin, les HUVECs sont obtenues commercialement (chez Lonza). Elles sont donc facilement disponibles. L'achat d'un seul lot de cellules utilisé dans toutes les expériences permet une plus grande reproductibilité des résultats obtenus.

II.B. Modèle murin d'irradiation de l'anse intestinale

Pour notre étude *in vivo*³⁷⁴ nous avons utilisé un modèle murin d'irradiation localisée au niveau d'une anse grêle intestinale. Ce modèle a été pris en main depuis des années par le laboratoire. Plusieurs publications du laboratoire¹⁵⁴⁻¹⁵⁷ ont déjà montrés l'intérêt de ce modèle dans l'étude des effets des RI, et notamment sur l'endothélium, après irradiation à 19 Gy. Ce modèle présente des analogies importantes avec les observations faites sur les tissus de patients traités par RT. Ces similitudes sont visibles tant au niveau histologiques que moléculaire. La cinétique de réaction tissulaire dans ce modèle permet d'obtenir au bout d'une semaine une réaction inflammatoire importante, suivie au bout d'un mois par l'apparition de lésions fibrotiques.

III. Article

Radiation-induced changes in the glycome of endothelial cells with functional consequences

Cyprien Jaillet¹, Willy Morelle², Marie-Christine Slomianny^{2,†}, Vincent Paget¹, Georges Tarlet¹, Valérie Buard¹, Sonia Selbonne¹, Fanny Caffin¹, Emilie Rannou^{1,‡}, Pierre Martinez^{2,‡}, Agnès François¹, François Foulquier², Fabrice Allain², Fabien Milliat¹ and Olivier Guipaud^{1*}

¹Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), PRP-HOM, SRBE, L3R, 92260 Fontenay-aux-Roses, France. ²University of Lille, CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, 59000 Lille, France. [†]In memory of Marie-Christine Slomianny. [‡]Present addresses: Department of Molecular, Cell and Developmental Biology, UCLA, CA 90095-7239 Los Angeles, USA (E.R.); GSK - GlaxoSmithKline, 1300 Wavre, Belgium (P.M.).

*Materials and Correspondence: Olivier Guipaud, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-HOM, SRBE, L3R, 31 avenue de la Division Leclerc 92260 Fontenay-aux-Roses, France. Phone: +33 1 58 35 70 53; Email: olivier.guipaud@irsn.fr

Abstract

Altered by ionizing radiation, the vascular network is considered as a prime target to limit normal tissue damage and improve tumor control in radiation therapy. Irradiation activates endothelial cells which then participate in the recruitment of circulating cells, especially by overexpressing cell adhesion molecules, but also by other as yet unknown mechanisms. We show here that ionizing radiation increases high mannose-type N-glycans and decreases glycosaminoglycans. These changes stimulate interactions between irradiated endothelial cells and monocytes under flow conditions. Targeted transcriptomic approaches *in vitro* in endothelial cells and *in vivo* in a radiation enteropathy mouse model confirm that genes involved in N- and O-glycosylation are modulated by radiation, and give insight into the mechanism by which radiation modifies glycosylation. The endothelium glycome should therefore be considered as a key therapeutic target for modulating the chronic inflammatory response observed in healthy tissues or for participating in tumor control by radiation therapy.

Key words

Radiotherapy; Ionizing radiation; Vascular endothelium; Glycosylation; Monocyte adhesion.

Introduction

Radiation therapy is used to treat a variety of cancers, as well as benign disorders, in more than half of patients with tumors¹. Despite tremendous advances in radiation dose delivery techniques, the therapeutic index of radiation therapy is still limited by normal tissue injury in organs at risk and by the radiation resistance of some tumors². Therefore, efforts to develop new approaches to optimize the response of normal tissue and tumors remain essential for improving the outcomes of radiation therapy, by increasing the likelihood of cancer cure or by decreasing normal tissue toxicity, or both^{3,4}.

The vasculature plays a crucial role in tumor progression and in tumor sensitivity or resistance and is considered as a target in attempts to destroy tumors⁵. On the other hand, the vasculature is required for normal tissue homeostasis and also orchestrates wound healing in the case of injury⁶. The vascular endothelium is thus considered as a key cell compartment for the response to ionizing radiation of healthy tissue and tumors, and as a promising target to improve the differential effect of radiation therapy in the future⁴. Following stress such as radiation exposure, the global cell response covers a wide range of molecular changes with a global gene/miRNA/protein/metabolite expression pattern of modifications. Changes occur at the transcriptional, translational and post-translational levels and impact cell phenotype, but also the microenvironment, by production and secretion of soluble factors such as reactive oxygen species, chemokines, cytokines and growth factors⁷. These radiation-induced dynamic modifications of molecular networks may control the endothelial cell phenotype and govern recruitment of immune cells.

Ionizing radiation induces an inflammatory response in organs⁸ and tumors⁹ characterized by immune cell infiltration. Vascular endothelium plays an integrative role in the tissue response following stress, and controls the initiation and resolution of inflammatory responses through the regulation of chemotaxis and activation of leukocytes in the periphery^{9,10}. The development of this inflammatory response is regulated by a complex process that involves leukocyte-endothelium interactions composed of activation, rolling, adhesion and transmigration in the surrounding tissue¹¹. Engaging the immune system for optimal anti-cancer therapy is an attractive contemporary concept¹². Promising current strategies generate an effective immune response to destroy the tumor in combination with radiation therapy¹³. In this context, control of the adaptive immune response by the tumor endothelium is a crucial process. By specific expression of a panel of adhesion molecules as cell adhesion molecules, integrins and selectins, vascular endothelial cells act as a barrier regulating immune cell trafficking on the surface vessel and subsequent extravasation or transmigration. Moreover, secretion of chemokines, cytokines and growth factors contributes to endothelial permeability⁹. The endothelium is thus able to activate a global molecular program in physiological conditions or in response to stress and serves as a key checkpoint to control the immune response. For all these reasons, the vascular endothelium can be considered as a principal checkpoint for radiation-induced inflammatory and immunity processes following radiation exposure in both normal and tumor tissues.

Both endothelium and circulating cell protein glycosylation, as well as endothelial glycocalyx, play fundamental roles in immune cell trafficking during acute and chronic inflammation¹⁴⁻¹⁹. Successful therapies for modulating leukocyte-endothelial interactions in human inflammatory disease may target adhesion molecule glycoforms. However, the existence and role of such protein modifications of endothelium in response to ionizing radiation have never been investigated. We and others previously showed that glycosylation of serum proteins is deeply modified in response to localized dorsal radiation injury²⁰ and to radiation therapy²¹. These modifications could occur through modifications in expression of genes involved in glycosylation in the liver²⁰. Such modifications might have an inhibitory effect on the selectin-mediated entry of leukocytes into inflamed areas through the endothelium²²⁻²⁴ and might represent a feedback response of the hepatic acute phase reaction in an attempt to reduce the cellular inflammatory reaction. However, to our knowledge, this hypothesis has so far neither been tested nor proved.

Here, we show using fluorescence microscopy, flow cytometry, mass spectrometry and targeted transcriptomics that ionizing radiation deeply modified the glycome of primary human

endothelial cells. These modifications were in part responsible for the radiation-induced increase of monocyte-endothelium interactions under flow, as shown by videomicroscopy experiments. Collectively, these results suggest for the very first time that regulation of the endothelium glycome is an important process for the adhesion of circulating cells in either healthy tissues or tumors exposed to ionizing radiation.

Results

Ionizing radiation increases the level of high mannose N-glycans. The response of endothelial cells to radiation exposure leads to a long-term radiation-induced dysfunction phenotype²⁵, resulting in greater adhesion of circulating cells²⁶⁻²⁹. To address whether these radiation-induced changes include changes in glycosylation, HUVECs at confluency were irradiated at 0 and 20 Gy and studied from day 1 to day 21 post-exposure. We used fluorescein-conjugated concanavalin A (FITC-Con A) lectin to quantify high mannose glycan structures in irradiated HUVECs, compared with non-irradiated HUVECs. This lectin tightly binds oligomannose- and hybrid-type N-glycans³⁰, but also interacts weakly with biantennary complex-type N-glycans (Supplementary Fig. 1a). As shown by fluorescence microscopy, the intensity of FITC-Con A on the outer cell membrane of HUVECs increased from day 4 after irradiation and as function of time (Fig. 1a). We tested the specificity of FITC-Con A staining by using the competitive inhibitor α -methylmannose, which clearly caused a complete disappearance of the fluorescence signal (Supplementary Fig. 2a). Since the FITC-Con A staining increased after irradiation, we checked that this was not due to an increase of plasma membrane permeabilization induced by radiation. Cells were stained with the red fluorescent phalloidin conjugate after applying the standard FITC-Con A staining protocol (i.e. without permeabilization of plasma membranes). Using fluorescence microscopy, no labeling of F-actin was observed after irradiation unless the cells were permeabilized with Triton X-100 before staining (Supplementary Fig. 2b). This result shows that radiation alone did not permeabilize plasma membranes and suggests that Con A bound specifically to plasma cell membranes and not to intracellular structures.

As HUVECs were increasingly larger in size and less numerous after irradiation (Fig. 1a and Supplementary Fig. 3a, day 14 post-irradiation), we chose to evaluate the variation of fluorescence levels per unit area of plasma cell membrane rather than fluorescence levels per cell (Supplementary Fig. 3b,c). By using this method of quantification, we show that HUVECs displayed an increase in FITC-Con A intensity per μm^2 of plasma cell membrane at days 4, 7 and 14 post-irradiation, reaching a maximum fold change of about 2 at day 14 (Fig. 1b), while no change was observed at day 1 post-irradiation. Consistent with these results, flow cytometry analyses of living HUVECs showed an increase of FITC-Con A staining after irradiation, as attested by cell size (FSC)/FITC-Con A bi-parametric analyses (Fig. 1c and Supplementary Fig. 4). Fig. 1d displays fold changes of fluorescence median distributions, indicating a clear increase in FITC-Con A staining following radiation exposure. Interestingly, flow cytometry allowed analysis of cells at late times (day 21) and showed a persistent effect three weeks after irradiation. Altogether, fluorescence microscopy and flow cytometry data with FITC-Con A show that irradiated HUVECs expressed more high mannose glycans on their outer cell membranes than non-irradiated cells, especially at the late time point.

Irradiation increases the proportion of oligomannose N-glycans at the expense of complex-type structures. To validate observations and quantifications made with FITC-Con A staining, the N-glycans of total protein extracts of HUVECs were investigated by MALDI-TOF mass spectrometry (MS). MS-based analytical strategies offer highly sensitive and reproducible tools for the structural analysis and relative quantitation of permethylated N-glycans^{31,32}. We used a comparative glycomic approach that distinguished quantitatively between the N-glycan structures derived from 0 and 20 Gy-irradiated HUVECs. Profiles of permethylated glycans from approximately 3 mg of total protein extracts per sample were recorded for the m/z range 1500-5500 Da using MALDI-TOF MS (Supplementary Table 1 and 2). Nine different ions were finally selected as possible glycan species

according to the following criteria: good reproducibility of the signal between the three acquired spectra per sample and between samples (absence of or few null values), credible structures determined on the basis of composition and biosynthetic pathway knowledge and signal-to-noise (S/N) ratios over 10. The nine structures are shown in Supplementary Fig. 5, which also displays putative schematic structures determined on the basis of composition and biosynthetic pathway knowledge. Fig. 2a illustrates representative glycan map profiles of 0 and 20 Gy-irradiated HUVEC proteins 14 days after exposure, and shows qualitatively similar profiles but different peak intensities between the 2 samples. All generated maps displayed the same broad profile whatever the dose received by the cells, as expected for good data interpretation³¹. No structure was found to be unique and specific to a particular dose of irradiation. Among these structures, five species contained at least five mannose residues (referred to as high mannose or oligomannose-type N-glycans; m/z 1579.7, 1783.7, 1987.8, 2191.8 and 2395.9) and four species were bi- (three species; m/z 2244, 2605 and 2966.1) or triantennary (one species; m/z 3055) complex-type N-glycans (referred to as complex-type N-glycans). All complex-type N-glycans contained a fucose residue and no (one species; m/z 2244), one (one species; m/z 2605) or two (two species; m/z 2966.1 and 3055) N-acetylneuraminic acid residues. These results confirmed that HUVECs expressed high mannose and complex N-glycans. It should be noted that no hybrid-type N-glycans were detected and quantified reliably.

Changes in relative abundances of the nine structure species and the two glycan types (i.e. families) observed in glycosylation patterns between control and irradiated HUVECs were further determined by comparing fold change values of expression from day 1 to day 21 post-exposure (Fig. 2b,c). Overall, the results show an increased proportion of oligomannose-type structures and a decreased proportion of complex-type N-glycans. Comparing the relative proportion of each structure at each time post-irradiation, histograms display tendencies to increased levels of high mannose glycan structures and to decreased levels of complex structures. However, these tendencies were only significantly statistically different for some species at some time points, and never at day 1 after irradiation (Fig. 2b). Most statistically differentially expressed glycan structures were seen at day 14 post-irradiation: four oligomannose-type N-glycans (m/z 1783.7, 1987.8, 2191.8 and 2395.9) increased and one complex-type N-glycans (m/z 2605) decreased in proportion. This last structure was significantly decreased at all times post-exposure except at day 1. We also determined the relative proportion of the two glycan families, i.e. oligomannose- (m/z 1579.7, 1783.7, 1987.8, 2191.8 and 2395.9) and complex-type N-glycans (m/z 2244, 2605, 2966.1 and 3055), by summing the proportions of all glycan structures of each family (Fig. 2c). This way of comparing the relative expressions of the two different families of glycans shows that proportions of oligomannose-type N-glycans increased while complex-type N-glycans decreased at day 7 ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) and day 14 ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) in response to ionizing radiation. Tendencies to increased levels of oligomannose-type glycans and to decreased levels of complex-types were also observed at early times and at day 21, but statistical test results were not significant, likely because of too large variability in the measurements on control cells, especially at day 21 post-irradiation.

The results of MS analyses are consistent with the results of quantification using FITC-Con A and show increased levels of these types of glycans after irradiation. Moreover, they suggest that the level of complex-type N-glycans decreases in response to radiation. To assess the radiation-induced decrease in expression of these structures, we performed fluorescence microscopy and quantified staining of FITC-PHA-L and FITC-UEA-I lectins, which respectively bind to bi- and tetraantennary complex-type N-glycans, and to α 1-2-linked fucose present on complex-type N-glycans³⁰ (Supplementary Fig. 1b,c). After a temporary increase at day 1 post-irradiation, the results show clearly decreased staining of FITC-PAH-L from day 4 to day 14 (Fig. 3). Similarly, FITC-UEA-I decreased after irradiation, but less clearly. Altogether, these results show a decrease in complex-type N-glycan structures following irradiation.

Ionizing radiation decreases the level of glycosaminoglycans in endothelial cells. Our results show that ionizing radiation increased high mannose N-glycan structures in HUVECs, especially at late time points. These observations are consistent with work showing that a pro-inflammatory stimulus (i.e. $\text{TNF}\alpha$) and pathological chronic inflammation (i.e. atherosclerosis) induce stimulation of high mannose N-glycans and have functional consequences for the recruitment of monocytes³³⁻³⁵. Besides, pro-inflammatory stimuli such as $\text{TNF}\alpha$ induce shedding of glycosaminoglycans (GAGs), thereby decreasing the width and size of the endothelial glycocalyx^{16,36}. This allows greater accessibility of endothelial glycoprotein epitopes, on which circulating leukocytes roll and to which they adhere. In a proposed model, $\text{TNF}\alpha$ modulates the pattern of endothelial N-glycosylation in concert with decreased glycocalyx size which in turn mediates higher affinity interactions with circulating monocytes³³. To examine whether ionizing radiation affects the glycocalyx, we quantified total GAGs of endothelial cells in a time-course experiment from day 1 to day 14 post-exposure. By using a carbazole assay to quantify uronic acid content, we found that the total GAG content was about 2-fold lower in irradiated HUVECs from day 2, like the effect of $\text{TNF}\alpha$ for 24 hours (Fig. 4). Interestingly, this decrease lasted over time and even at day 14 a non-significant tendency to decreased level could be observed. These results suggest a decrease of the width and size of the endothelial glycocalyx in response to ionizing radiation.

The radiation-induced stimulation of monocyte-endothelial interactions is partly inhibited by a competitive inhibitor of mannose. Since irradiated cells overexpressed high mannose N-glycans and their glycocalyx may have diminished, we wondered whether these modifications could have effects on radiation-induced adhesion of monocytes. Firm adhesions of monocytes were assessed under flow conditions at days 2, 4 and 7 following 20 Gy irradiation, compared with non-irradiated cells. Cell Tracker Red-labeled THP-1 monocytes were continuously flowed for 5 minutes on a confluent monolayer of control or 20 Gy-irradiated endothelial cells, whereupon the number of adherent cells and the number of adherent cell clusters (at least 3 contiguous adherent cells) were counted through analysis of ten-image movies using IMARIS software. We found that the number of firmly adherent monocytes increased dramatically (4- to 10-fold) after irradiation (Fig. 5, Supplementary Fig. 6 and Supplementary Video 1-4), as expected based on prior *in vitro* and *in vivo* work²⁶⁻²⁸. We also found that radiation increased the number of clusters of adherent cells, consistent with the results of a previous study on immortalized coronary artery endothelial cells following irradiation³⁷. To test whether increased high mannose N-glycans contribute to radiation-induced adhesion to endothelial cells, a competition experiment was performed in which dynamic flow-dependent THP-1 monocyte adhesion to irradiated HUVECs was evaluated in the absence and presence of α -methylmannose. Fig. 5 shows that THP-1 adhesion during flow was affected by α -methylmannose in terms of both the number of adherent THP-1 and the number of clusters of adherent cells. Inhibition was not complete, reaching levels of about 55-60% regarding the number of adherent cells and 80-90% for the number of clusters. This suggests that determinants other than high mannose glycans are likely involved in radiation-induced stimulation of the monocyte-endothelium interaction, possibly through other glycan structures.

The glycosylation gene expression profile of endothelial cells is deeply modified by ionizing radiation. It has been estimated that about 700 enzymes are involved in the complete diversity of glycans in mammalian cells³⁸. Numerous data highlight the key role of transcriptional regulation control of the enzymes in determining the glycosylation profile, in terms of abundance and diversity, of a cell³⁹. In order to gain insight into the mechanism by which irradiation modulates the glycosylation of endothelial cells, and to test whether other modifications of glycosylation could occur, we used quantitative PCR to profile the expression of 84 key human genes encoding enzymes involved in glycosylation (Supplementary Table 3). Control and 20 Gy-irradiated HUVECs were profiled at early (days 1 to 4) and late (day 14 and 21) times post-irradiation (Fig. 6 and Supplementary Table 4). Hierarchical clustering analysis using the 77 detected and reliably measured genes out of the 84 indicates a clear clustering of control and irradiated samples, whatever the time after exposure (Fig. 6a). A principal component analysis (PCA) of the dataset (Fig.

6b) and a hierarchical classification on principal components of this PCA confirms the differences between the samples on the basis of transcriptional variations of these 77 glycosylation genes, especially at later time points (Supplementary Fig. 7a). These results clearly indicate that ionizing radiation modifies the expression of genes involved in glycosylation.

The two different non-supervised multivariate statistical analyses show a clear clustering of early (days 1 to day 4) and late (days 14 and 21) times after irradiation. We therefore chose to group data to select genes that were differentially expressed in these two periods. This also allowed a gain in statistical power. For each time period, we selected genes that were modified by a fold change of at least 1.5 and an adjusted Student's *t*-test *p*-value less than 0.05 to minimize the false discovery rate, leading to selection of 24 statistically differentially expressed genes at early and/or late time points (Fig. 6c and Supplementary Table 4). Using the dataset obtained from expression measurements of these 24 genes, unsupervised multivariate statistical analyses show a more obvious clustering of control and irradiated samples, and of early and late time points (Supplementary Fig. 7b,c). Interestingly, these analyses show that the expression of some glycosylation genes is also modified in non-irradiated cells over time, which reinforces the importance of having a control sample at each study time point.

The transcriptomic analysis revealed changes in gene expression at early and, even more, at late times post-irradiation. We found that many genes encoding enzymes involved in N-glycan biosynthesis were differentially expressed in response to ionizing radiation. In particular, the under-expression of MAN1C1 may explain the accumulation of high mannose structures, which is consistent with the results presented above, and with the results of stimulation of HUVECs with TNF α ³³. We also found genes encoding lysosomal enzymes involved in the degradation of glycans, such as FUCA1, which breaks down fucose in fucose-containing glycoproteins and glycolipids. Remarkably, many genes encoding enzymes involved in O-glycosylation were also differentially expressed following irradiation, suggesting that O-glycosylation was also deeply altered by ionizing radiation exposure. Some of these genes were the most overexpressed at late times (GALNTL1, 3-fold increase and GCNT4, 28-fold increase). A time-course analysis of the 24 selected genes shows that these effects were amplified over time. Examples of such time effects are given in Supplementary Fig. 8 for key genes involved in N-glycosylation (MAN1C1), glycan degradation (FUCA1) and O-glycosylation (GALNTL1/GALNTs16 and GCNT4).

Ionizing radiation stimulates expression of O-glycans in endothelial cells. Since many genes involved in O-glycosylation were overexpressed after irradiation, we wondered whether irradiated cells display an increase in plasma membrane O-glycans. We performed fluorescence microscopy and quantified the staining of FITC-JACALIN (FITC-JAC), FITC-SNA and FITC-MAL-II lectins, the first of which binds to mucins while the second and third bind to N-acetylneuraminic acid through particular carbohydrate structures³⁰ (Supplementary Fig. 1d-e). The results show a clear increase of the staining of the three labeled lectins, especially at the last time point (day 14) post-irradiation (Fig. 7). These increases took place from day 4 for SNA and MAL-II. These results are in agreement with the transcriptomic profile and suggest an increase in O-glycans in response to ionizing radiation.

***In vivo* localized exposure to radiation induces modifications of glycosylation gene expression pattern in the small intestine.** Since ionizing radiation induced dramatic changes in glycosylation gene and glycan expression in endothelial cells, we sought a proof of principle that this profile could also be modified *in vivo*. We assessed the glycosylation gene expression profile in a radiation enteropathy mouse model. In this model, a small part of the intestine was exposed to a high dose of X-rays (19 Gy) to induce acute and late lesions similar to side effects of radiation therapy⁴⁰. Using this model, we have previously shown that endothelium contributes to radiation-induced late effects and death⁴¹. Here, we used the total RNA of the intestine to profile by quantitative PCR the expression of 84 key mouse genes encoding enzymes involved in glycosylation (Supplementary Table 3). Sham- and 19 Gy-irradiated mice were profiled at days 3, 7 and 42 post-irradiation (Fig. 8 and Supplementary Table 5). Hierarchical clustering and PCA analyses using the 81 detected and reliably measured genes out of the 84 as a dataset indicate that day 3 and day 7 irradiated mice were

different from day 3, day 7 and day 42 sham-irradiated mice, and from day 42 irradiated mice (Fig. 8a-d). These results clearly indicate that ionizing radiation modifies the expression of genes involved in glycosylation in the irradiated intestine. As shown in Fig. 8e, the variation of expression occurred mainly at days 3 and 7. We therefore grouped data to select genes that were differentially expressed at days 3 and 7, gaining also in statistical power. For each time period, we selected genes that were modified by a fold change of at least 1.5 with an adjusted *p*-value less than 0.05, leading to selection of 25 statistically differentially expressed genes at early time points (Fig. 8f and Supplementary Table 5). As in endothelial cells, many differentially expressed genes encode enzymes involved in N-glycosylation and O-glycosylation.

Pathway analysis of differentially expressed genes from HUVECs and mouse intestine. Pathway Studio software was employed to establish the molecular interaction and regulation network based on high-throughput interaction datasets. Biological interactions of the selected differentially regulated genes were explored by interpreting high-throughput expression data to identify relationships among the proteins and cellular processes involved, and to organize the data into functional networks based on a repository database of known protein-protein interactions and functional interactions. We first asked whether the selected differentially expressed endothelial and mouse genes shared interactions with 14 genes commonly involved in the regulation of gene transcription induced by irradiation⁴²⁻⁴⁸. Interestingly, pathway analyses show that 11 out of the 24 differential HUVEC genes share relationships with 10 out of the 14 radiation genes (Fig. 9a), and that 12 out of the 25 differential mouse genes share relationships with 12 out of the 14 radiation genes (Fig. 9b and Supplementary Table 6 for detailed relationships). We also identified an important gene network around the cell process “cell adhesion” from pathway analysis using the enriched sub-networks plugin of Pathway Studio with which we searched for significant cell processes using HUVEC and mouse differentially expressed genes (Supplementary Table 7). We used these enriched sub-networks to build a pathway in which the genes were connected to the cell adhesion process and colored according to their differential under- or overexpression (Fig. 9c,d and Supplementary Table 8 for the detailed relationships). Among the 24 differential HUVEC genes, 11 genes were found to be related to cell adhesion, indicating that radiation may also affect this cell process through the modulation of expression of these genes. Similarly, 11 genes among the 25 differential mouse genes were found to be related to the cell adhesion process, suggesting that the latter could also be modified in the irradiated intestine.

Discussion

Vascular endothelium is the primary entry point of immune cells into radiation-injured normal tissues and tumors. While this recruitment can be beneficial in the control of tumor cells², a number of studies suggest that it may become detrimental to healthy tissues when chronic and unresolved⁶, and possibly participates in the initiation and/or the side effects of radiation therapy. Controlling this recruitment may thus open up therapeutic opportunities to protect healthy tissues from radiation while increasing tumor control. However, the mechanisms by which radiation sustainably activates endothelial cells are largely unknown. The work presented herein provides new insights into endothelium-monocyte interactions induced by radiation exposure, where high mannose N-glycans and likely other glycans may act as ligands for monocyte adhesion. Irradiation stimulated expression of high mannose N-glycans and O-glycans reduced the level of glycosaminoglycans and exacerbated monocyte adhesion under flow, which was attenuated by masking mannose recognition sites on monocytes. Transcriptomic analyses show that radiation modified gene expression profiles of both human endothelial cells and mouse intestine, and support observations made on glycan levels. These modifications could partly explain the modification of the glycome, which is mainly controlled by transcriptional regulations^{38,39}. *In silico* analyses of differential genes indicate an important pathway around the cell adhesion process. Relationships between common proteins involved in the response to radiation and differential glycosylation genes provide clues to how radiation may directly influence their expression. These pathways show links between some of the

differential glycosylation genes and these well-known radiation proteins, which are mainly regulated by radiation-induced ROS release and the DNA damage response. Collectively, these data identify temporal radiation-induced modifications of glycosylation as a novel potential regulator of cell adhesion following radiation exposure.

In this study we used high doses of ionizing radiation, i.e. 20 Gy for HUVECs and 19 Gy for mouse intestine, which may appear to be far from conventionally fractionated radiation therapy protocols that deliver daily dose fractions of 1.8-2 Gy. However, in the mouse, this single dose induces biological effects similar to the side effects of fractionated radiation therapy⁴⁰. Furthermore, advances in treatment planning and delivery have made it possible to deliver one or more fractions of high-dose ionizing radiation (15-20 Gy) to tumors by stereotactic body radiation therapy (SBRT)⁴⁹, which is increasingly being used to treat patients⁵⁰. In our work, *in vitro* studies in HUVECs show that high doses of irradiation changed the glycome profile of cells, and especially stimulated sustainable overexpression of high mannose structures. These results are in agreement with MS and lectin staining experiments showing that cells expressed less complex-type N-glycans. Since the biosynthesis of N-glycans is sequential, early processing steps that trim mannoses are absolutely required to allow late processing steps leading to hybrid and complex N-glycans³⁸. In line with current understanding, it was thus expected that an increase in high mannose N-glycans would be associated with a decrease in complex N-glycans. Supporting this information, gene expression analyses revealed that MAN1C1, a gene encoding a key mannosidase 1 involved in the earliest steps of mannose removal, was down-regulated in response to radiation. This decrease was amplified with time post-irradiation, consistent with the results of Con A binding and MS experiments. These results suggest a sustainable down-regulation of oligomannose-type N-glycans that may be part of the chronic alteration of the endothelial phenotype. Similarly, we found that *in vivo* localized irradiation of mouse intestine also down-regulated the expression at early post-irradiation times of the two mannosidase genes MAN1A1 and MAN1B1, which are also involved in the earliest steps of the trimming of mannoses. Interestingly, our findings share similarities with earlier work on acute and chronic inflammation showing that TNF α treatment of HUVECs increased surface expression of high mannose/hybrid N-glycans, promoting adhesion of monocytes on the treated cell monolayer^{33,51,52}. In the same way, alteration of endothelial N-glycan profiles by tumor-conditioned media has been proposed as an important mechanism for tumor extravasation⁵³. Also, overexpression of high mannose glycans has been observed under chronic inflammatory conditions in human aortic endothelial cells and in atherosclerotic plaques in ApoE^{-/-} mice and human coronary arteries, revealing potential novel effectors of monocyte adhesion during atherogenesis³⁵. This increase in high mannose N-glycans, associated with stimulation of monocyte adhesion, could be due to down-regulation of mannosidases 1 since decreases in gene expression or enzyme activity have been shown in these different inflammatory contexts and also interestingly in rat aorta during drug-induced diabetes mellitus⁵⁴.

Our results also suggest a general increase in O-glycosylation. Expressions of several genes encoding different polypeptide-N-acetylgalactosamine (GalNAc) transferases (the enzyme that links the first N-acetylgalactosamine to the protein) were found to be durably overexpressed in HUVECs (GALNT2, GALNT9, GALNT12, GALNT14, GALNTL1, GALNTL6) and mouse (GALNT3, GALNT2, GALNT10, GALNT6). The transfer of the first sugar from UDP-GalNAc directly to serine or threonine in a protein is essential for the biosynthesis of mucin, which are heavily O-glycosylated glycoproteins found as transmembrane glycoproteins of the cell surface with the glycans exposed to the external environment³⁰. An increase in GalNAc transferase genes could thus induce an increase in O-glycan levels. Consistently, these modifications were supported by lectin binding assays on living endothelial cells showing increased staining of JAC, SNA and MAL-II. To go further, gene expression profiles suggest that radiation may stimulate the expression of core 2, in agreement with UEA-I and MAL-II lectin staining, and core 4 O-glycans (overexpression of GCNT3 and GCNT4 in HUVECs, and of GCNT1 and GCNT3 in mouse, which are N-acetylglucosaminyl transferases). Core 1 and core 2 O-glycans are typically increased *in vitro* and *in vivo* in inflammatory conditions⁵⁵. Core 2 O-glycans are the main support of the sialyl Lewis^x epitopes, which bind to the L-selectin of

leukocytes in high endothelial venules^{17,56}. Overexpression of sialyl Lewis^X motif on endothelial cells may enhance the interaction between endothelium and circulating cells⁵⁵. Although we did not investigate this important sugar motif in our study, a possible increase in α 2-3 sialylation as attested by the increase in MAL-II staining after radiation may suggest an increase of sialylation in agreement with an increase of the sialyl Lewis^X motif. This putative increase after irradiation could thus be involved in the residual adhesion of monocytes to irradiated endothelial cells in the presence of α -methylmannose. In this way, our previous findings that radiation induced overexpression of multiantennary N-glycans on serum proteins²⁰, which are expected to carry sialyl Lewis^X motifs, support the hypothesis that such modifications might represent a feedback response of the hepatic acute phase reaction in an attempt to reduce the cellular inflammatory reaction²²⁻²⁴. However, these protein modifications should not have an inhibitory effect on high mannose-mediated adhesion of monocytes since they do not carry high mannose structures, possibly in connection with the fact that tissues never stop recruiting immune cells in severe radiation-induced lesions.

To conclude, the current work demonstrates that radiation deeply modifies the glycome of endothelial cells and has functional effects on radiation-induced monocyte adhesion, and suggests that these changes may have an essential impact on the recruitment of circulating cells in both healthy tissues and tumors. Understanding the control and molecular basis of immune cell entry processes might be of therapeutic use both to protect normal tissues against radiation-induced injury and to enhance tumor control. Interestingly, specific ICAM-1 N-glycoforms could modulate distinct aspects of the inflammatory response³⁴. Since ionizing radiation increases the expression of ICAM-1 in endothelial cells^{26,57,58}, it would be interesting to investigate if an increase in high mannose N-glycans also occurred on this protein and explain the increased interaction between monocytes and irradiated endothelial cells. High mannose glycoproteins, and especially high mannose ICAM-1 as previously proposed in the case of chronic inflammatory diseases³⁴, should now be considered as a new therapeutic target for controlling radiation-induced leukocyte trafficking and endothelial radiation-induced inflammation.

Methods

Reagents. FITC-conjugated lectins concanavalin A (Con A), *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L), *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-I), *Artocarpus intergrifolia* agglutinin (Jacalin lectin, JAC), *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), *Maackia amurensis* leucoagglutinin (MAL-II), α -methylmannose and Vectashield antifade mounting medium with DAPI were from Vector Laboratories. CellTracker™ Red CMTPIX and To-Pro-3 dyes were from Thermo Fisher Scientific. TNF α was from R&D systems, Trypsin-EDTA from Life Technologies, and paraformaldehyde (10% neutral buffered formalin), HEPES buffer and Triton X-100 were from Sigma.

Cells. Primary HUVECs (pooled donors) from Lonza were grown at 37°C with 5% CO₂ in EBM-2 MV medium containing 5% FBS (Lonza). THP-1 cells from ATCC were grown at 37°C with 5% CO₂ in RPMI 1640 medium (ATCC modification) containing 10% FBS (Thermo Fisher Scientific) and 0.05 mM 2-mercaptoethanol at 0.5-1.0 X 10⁶ cells.mL⁻¹ to maintain them in the log cell growth phase.

Irradiation procedure. Cell irradiation (single dose of 20 Gy) was performed at cell confluence using a ¹³⁷Cs source (IBL 637, CisBio, 1.15 Gy.min⁻¹). Radiation enteropathy was induced by exposure of an intestinal segment to 19 Gy of radiation as previously described⁵⁹. Briefly, 10-week-old male mice (C57BL/6 from Charles River Laboratories) were anesthetized by spontaneous inhalation of isoflurane-N₂O gas (Abbott GmbH) and, after laparotomy, a 3 cm long intestinal segment was exteriorized and exposed to a single dose of 19 Gy using an Elekta Synergy® Platform delivering 4 MV X-rays at 2.5 Gy.min⁻¹. Sham-irradiation (Sham-IR) was performed by maintaining the intestinal segment exteriorized without radiation exposure. After radiation exposure or sham-IR, the exposed segment was returned to the abdominal cavity and peritoneum/abdominal muscles and skin were separately closed with interrupted sutures. Experiments were conducted in compliance with legal

regulations in France for animal experimentation, and protocols were approved by the national ethics committee for animal experimentation of the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety no. 81 (protocol 15-04).

Lectin staining. Monolayers of adherent HUVECs were grown to confluence on microscope coverslips. For incubation with cells, lectins were diluted as follows: Con A in 10 mM HEPES, 0.15 M NaCl, pH 7.5, 0.01 mM MnCl₂, 0.1 mM CaCl₂; PHA-L, UEA-I, JAC, SNA and MAL-II in 10 mM HEPES, 0.15 M NaCl, pH 7.5, 0.1 mM CaCl₂. At different times post-treatment, control (0 Gy) and 20 Gy-irradiated cells were washed twice using ice-cold PBS containing 1 mM each MgCl₂ and CaCl₂ (PBS++) and then stained with 10 µg.mL⁻¹ lectin in their respective HEPES buffers for 15 min on ice in the dark. Cells were washed twice with ice-cold PBS++ and fixed using 4% paraformaldehyde in PBS++ for 10 min at room temperature. Fixed cells were washed twice in ice-cold PBS++ and incubated for 10 min at 4°C in PBS++. Coverslips were mounted for viewing in Vectashield antifade mounting medium with DAPI to stain DNA. Images were acquired using a Zeiss Axiophot fluorescent microscope. The different lectins used in this study and their specificities are shown in Supplementary Fig. 1. Surface fluorescence was quantified by the software Histolab (Microvision). For fluorescence quantifications, the edges of the microscopy images were not taken into account so as to limit variations due to lighting effects. The density of fluorescence emission (in intensity level per unit area) was used to compare the difference in labeling between control and 20 Gy-irradiated cells. This quantity was calculated by the ratio between the integrated fluorescence emission and the squared cell surface area of cells. Fluorescence quantification is described in Supplementary Fig. 3.

Phalloidin immunostaining. 20 Gy-irradiated HUVECs were stained with FITC-Con A as above. Cells were either fixed using 4% paraformaldehyde and permeabilized in 0.1% Triton X-100 in PBS (5 min at room temperature) prior to phalloidin immunostaining, or directly immunostained for phalloidin prior to fixation, without membrane permeabilization, to test the plasma membrane integrity of irradiated cells. After washing, CytoPainter F-actin staining kit-Red fluorescence (Abcam) was used according to the manufacturer's instructions to visualize F-actin by the staining of phalloidin. Coverslips were mounted for viewing in Vectashield antifade mounting medium with DAPI.

Cell tracker labeling of THP-1 monocytes. For adhesion experiments under flow conditions, THP-1 monocytes (1.0 X 10⁶ cells.mL⁻¹) were labeled with CellTracker™ Red CMTPX (2 µM) in RPMI 1640 without FBS for 45 min at 37°C in the dark. After centrifugation (120 X 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 X g for 6 min) and resuspended in EBM-2 MV medium without FBS at a concentration of 1.0 X 10⁶ cells.mL⁻¹ and then used in an adhesion assay (see below).

Sugar inhibition experiments. α-Methylmannose (200 mM) was mixed with FITC-Con A prior to lectin HUVEC staining and viewing by fluorescence microscopy, or with THP-1 prior to initiation of flow for adhesion experiments.

Flow cytometry. At different times post-treatment, control (0 Gy) and 20 Gy-irradiated cells were washed in PBS and incubated with trypsin-EDTA for 2 min at 37°C. Trypsin was inactivated by adding complete culture medium, cells were centrifuged for 5 min at 200 X g and 1.0 X 10⁶ cells were resuspended in 1 mL of PBS++ containing 5% FBS. After staining, each pellet was resuspended in 500 µL of PBS++ containing 5% FBS and transferred into flow cytometry-compatible tubes (Dutscher) to proceed to data acquisition. Multiparametric analyses were performed on BD FACSCanto™ II (3-laser, 4-2-2 configuration) for data recording and using FlowJo 7.6.5 software (FlowJo LLC) for the analysis of samples. Cell viability was first checked by using To-Pro-3 dye. To-Pro-3 fluorescence was collected on the APC channel (filters λem: 660/20 nm) after an air-cooled 633 nm HeNe (17-mW output) laser excitation. This step in cell viability was performed to record living cell events to ensure an analysis of at least 1.0 X 10⁴ living cells per replica. For these gated events, gating was done on size (FSC: forward scatter)/granulometry (SSC: side scatter) parameters to collect fixed cells and to remove fragmented cells and debris. Finally, the FITC-Con A signal was collected on the

FITC channel (filters λ em: 530/30 nm) after an air-cooled 488 nm solid state (20-mW output) laser excitation. The gating strategy for flow cytometry analysis is presented in Supplementary Fig. 4. The cell size (FSC)/FITC-Con A biparametric analyses are reported as dot plot representations. Results are presented as average median values of FITC-Con A fluorescence with at least 1×10^4 gated events per replica.

MALDI-TOF MS analysis of permethylated N-glycans. At different times post-treatment, control (0 Gy) and 20 Gy-irradiated HUVECs were washed twice with PBS, scraped, pelleted and stored at -80°C until N-glycan extraction and analysis. After thawing on ice, cells were sonicated in extraction buffer (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA and 1% CHAPS, pH 7.4) and then dialyzed in 6-8 kDa cut-off dialysis tubing in an ammonium bicarbonate solution (50 mM, pH 8.3) for 48 hours at 4°C and lyophilized. About 3 mg of proteins/glycoproteins per sample was reduced and carboxyamidomethylated followed by sequential tryptic and peptide N-glycosidase F digestion and Sep-Pak purification as previously described³². Permethylated of the freeze-dried glycans and MALDI-TOF MS of permethylated glycans were performed as described elsewhere³². Spectra were obtained by accumulation of 500 laser shots over a range of m/z 1500-5500 Da. Each sample was spotted three times on the MALDI plate and one spectrum was acquired per deposited spot.

Data evaluation and statistical analysis of mass spectra. The MS profiles of permethylated N-glycans were processed using Data Explorer version 4.7 to generate files containing m/z values and signal intensities after filtering peaks based on an S/N ratio threshold of 3 and noise filtering/smoothing function (noise removal method, standard deviation to remove: 2). For each m/z value, the peak intensities of the three acquired spectra per replica were averaged prior to further analysis. Furthermore, the processing method took into account isotopic distributions to recalculate S/N ratios to eliminate those under 10. The mass lists and their corresponding peak intensities (raw data) are given in Supplementary Table 1. Nine different ions were finally selected as possible glycan species according to the following criteria: good reproducibility of the signal between the three acquired spectra per sample and between samples (no or few null values), credible structures determined on the basis of composition and biosynthetic pathway knowledge, and S/N ratios over 10. Each monoisotopic signal was assigned to a monosaccharide composition, determined on the basis of composition and biosynthetic pathway knowledge and further classified in two different families: high mannose and complex species. Supplementary Fig. 5 shows the structures and families investigated in this work. The relative proportion (% intensity) of each structure or family was calculated as the (intensity \times 100)/(sum of intensities). Supplementary Table 2 displays all MALDI-TOF MS signal intensities and % intensities for each m/z value of our glycan database and for each acquisition.

GAG quantification. Control (0 Gy), 20 Gy-irradiated HUVECs and HUVECs treated for 24 hours with $\text{TNF}\alpha$ ($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) were washed twice with PBS, scraped, pelleted and stored at -80°C until GAG extraction. After thawing on ice, cells were suspended in 1 mL of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100) and GAGs were prepared from about 5 mg per sample as previously described⁶⁰. GAGs were quantified using a carbazole assay, according to the method developed by Cesaretti et al.⁶¹ with the previously described modifications⁶⁰.

Cell adhesion assay under flow condition. Five days after seeding on a glass lamella, HUVECs at confluency were irradiated at 20 Gy. At different times post-irradiation, the lamella was placed in a flow chamber characterized previously²⁷ for videomicroscopy analysis. THP-1 monocytes fluorescently labeled with CellTracker™ Red CMPTX were perfused through the flow chamber for a total time of 5 min at a constant wall shear rate of 50 s^{-1} and a constant flow rate of $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ using a syringe coupled to an electric pump (Harvard Apparatus). The entire experiment was visualized in real time at 20 X magnification with a black and white video camera (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 20 ms per frame. After 5 min of perfusion,

a ten-image time-lapse video was recorded to determine the number of firmly adherent monocytes. The time-lapse videos were subsequently analyzed using image analysis IMARIS software version 8 (Bitplane) to determine the number of firmly adherent monocytes.

RNA isolation, reverse transcription, and real-time quantitative PCR. Total RNA was prepared from HUVECs and mouse intestinal tissue with the total RNA isolation kit (RNeasy Mini Kit, Qiagen) with an additional step of genomic DNA removal by digestion with DNase I (DNA-free™ DNA Removal Kit, Thermo Fisher Scientific). After quantification on a NanoDrop spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies), reverse transcription was performed with 1 µg RNA using the High Capacity Reverse Transcription Kit from Applied Biosystems. Quantitative PCR was carried out on a 7900HT Fast-Real Time PCR system (Applied Biosystems) using the Human or Mouse Glycosylation RT² Profiler™ PCR Arrays (SABiosciences) to profile the expression of 84 key genes encoding proteins involved in glycosylation (Supplementary Table 3). Analyses were conducted according to the procedure previously described in detail⁴¹. Briefly, Ct values were extracted from a global analysis using RQ Manager software (Applied Biosystems) in order to apply and normalize optimal baselines and threshold parameters for each target. Next, Data Assist software (Applied Biosystems) was used for determine fold changes, with fixed criteria: a maximum allowable Ct value at 35 was fixed and maximum Ct values were not included in calculations. For all analyses, the reference sample group was the non-irradiated group for each time post-irradiation, automatically leading the mean of the reference group to the value 1. Normalization was performed using a global normalization method: the software first finds the common assays among all samples and then uses the median Ct of those assays as the normalizer, on a per sample basis⁶².

Statistical analyses. Data are given as means ± SD (n<10) or means +/- SEM (n≥10). Statistical analyses were performed by two-way ANOVA or a two-tailed *t*-test when appropriate, with a level of significance of *p*<0.05, using GraphPad Prism 7 software. For targeted transcriptomic analyses, Student's *t*-test *p*-values were adjusted using the Benjamini-Hochberg false discovery rate method using Data Assist software, and a fold change cut-off of 1.5 and an adjusted *p*-value less than 0.05 were applied to select statistically differentially expressed genes. For unsupervised hierarchical clustering analyses and heat map creation with Data Assist software, distances between samples were calculated for hierarchical clustering based on the ΔCT values using Pearson's correlation, assay centric as map type, and average linkage as clustering method. PCA and hierarchical clustering on principal components were performed with R software⁶³ using the Rcmdr package⁶⁴ and the FactoMineR plugin⁶⁵, and were used in interpreting relationships between experimental groups.

Pathway analysis of differentially expressed genes. Pathway and sub-network enrichment analyses were performed using the web version of the software Pathway Studio (Mammalian, ChemEffect, DiseaseFX, version 11.2.5.9, updated Oct 22, 2016) from Elsevier, the database of functional relationships and pathways of mammalian proteins. The web-based database consists of millions of individually modeled relationships between proteins, genes, complexes, cells, tissues, drugs and diseases compiled using MedScan technology from over 24,000,000 PubMed abstracts and over 3,500,000 Elsevier and third party full-text papers⁶⁶. Names and expression ratio values of the differentially expressed genes were imported into the Pathway Studio. The data input was queried against the Pathway Studio knowledge base for biological interactions. Proteins mapped to the knowledge base were used to build protein networks. Interaction networks were added that included selected neighbors or cell processes.

References

1. DeVita, V. T., Lawrence, T. S. & Rosenberg, S. A. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer. Principles & Practice of Oncology*. (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2011)
2. Moding, E. J., Kastan, M. B. & Kirsch, D. G. Strategies for optimizing the response of cancer and normal tissues to radiation. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 526-542 (2013).
3. Begg, A. C., Stewart, F. A. & Vens, C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat Rev Cancer* **11**, 239-253 (2011).
4. Liauw, S. L., Connell, P. P. & Weichselbaum, R. R. New paradigms and future challenges in radiation oncology: an update of biological targets and technology. *Sci Transl Med* **5**, 173sr2 (2013).
5. Chung, A. S., Lee, J. & Ferrara, N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **10**, 505-514 (2010).
6. Korpela, E. & Liu, S. K. Endothelial perturbations and therapeutic strategies in normal tissue radiation damage. *Radiat. Oncol.* **9**, 266 (2014).
7. Ritchie, M. D., Holzinger, E. R., Li, R., Pendergrass, S. A. & Kim, D. Methods of integrating data to uncover genotype-phenotype interactions. *Nat Rev Genet* **16**, 85-97 (2015).
8. Francois, A., Milliat, F., Guipaud, O. & Benderitter, M. Inflammation and immunity in radiation damage to the gut mucosa. *Biomed Res Int* **2013**, 123241 (2013).
9. Gajewski, T. F., Schreiber, H. & Fu, Y. X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol* **14**, 1014-1022 (2013).
10. Weninger, W., Biro, M. & Jain, R. Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. *Nat Rev Immunol* **14**, 232-246 (2014).
11. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* **7**, 678-689 (2007).
12. Mauge, L., Terme, M., Tartour, E. & Helley, D. Control of the adaptive immune response by tumor vasculature. *Front Oncol* **4**, 61 (2014).
13. Zitvogel, L. & Kroemer, G. Subversion of anticancer immunosurveillance by radiotherapy. *Nat Immunol* **16**, 1005-1007 (2015).
14. Scott, D. W. & Patel, R. P. Endothelial heterogeneity and adhesion molecules N-glycosylation: Implications in leukocyte trafficking in inflammation. *Glycobiology* **23**, 622-633 (2013).
15. Lipowsky, H. H. The endothelial glycocalyx as a barrier to leukocyte adhesion and its mediation by extracellular proteases. *Ann Biomed Eng* **40**, 840-848 (2012).
16. Mulivor, A. W. & Lipowsky, H. H. Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H1282-91 (2002).
17. Sperandio, M., Gleissner, C. A. & Ley, K. Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunol Rev* **230**, 97-113 (2009).
18. Reitsma, S., Slaaf, D. W., Vink, H., van Zandvoort, M. A. & oude Egbrink, M. G. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Eur J Physiol* **454**, 345-359 (2007).
19. Megens, R. T. *et al.* In vivo high-resolution structural imaging of large arteries in small rodents using two-photon laser scanning microscopy. *J Biomed Opt* **15**, 11108 (2010).
20. Chaze, T. *et al.* Alteration of the serum N-glycome of mice locally exposed to high doses of ionizing radiation. *Mol Cell Proteomics* **12**, 283-301 (2013).
21. Tóth, E. *et al.* Changes of protein glycosylation in the course of radiotherapy. *J Pharm Biomed Anal* **118**, 380-386 (2016).
22. Phillips, M. L. *et al.* ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science* **250**, 1130-1132 (1990).
23. De Graaf, T. W., Van der Stelt, M. E., Anbergen, M. G. & van Dijk, W. Inflammation-induced expression of sialyl Lewis X-containing glycan structures on alpha 1-acid glycoprotein (orosomuroid) in human sera. *J Exp Med* **177**, 657-666 (1993).
24. Walz, G., Aruffo, A., Kolanus, W., Bevilacqua, M. & Seed, B. Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Lex determinant on myeloid and tumor cells. *Science* **250**, 1132-1135 (1990).
25. Stone, H. B., Coleman, C. N., Anscher, M. S. & McBride, W. H. Effects of radiation on normal

- tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol* **4**, 529-536 (2003).
26. Hallahan, D., Kuchibhotla, J. & Wyble, C. Cell adhesion molecules mediate radiation-induced leukocyte adhesion to the vascular endothelium. *Cancer Res* **56**, 5150-5155 (1996).
 27. Vereycken-Holler, V., Aigueperse, J. & Gaugler, M. H. Radiation effects on circulating and endothelial cell interactions studied by quantitative real-time videomicroscopy. *Int J Radiat Biol* **78**, 923-930 (2002).
 28. Holler, V. *et al.* Pravastatin limits radiation-induced vascular dysfunction in the skin. *J Invest Dermatol* **129**, 1280-1291 (2009).
 29. Corre, I., Guillonnet, M. & Paris, F. Membrane signaling induced by high doses of ionizing radiation in the endothelial compartment. Relevance in radiation toxicity. *Int J Mol Sci* **14**, 22678-22696 (2013).
 30. Varki, A. *et al.* *Essentials of Glycobiology*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
 31. Wada, Y. *et al.* Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans-HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study. *Glycobiology* **17**, 411-422 (2007).
 32. Morelle, W. & Michalski, J. C. Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nat Protoc* **2**, 1585-1602 (2007).
 33. Chacko, B. K., Scott, D. W., Chandler, R. T. & Patel, R. P. 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 (2011).
 34. Scott, D. W., Dunn, T. S., Ballestas, M. E., Litovsky, S. H. & Patel, R. P. 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**, C228-37 (2013).
 35. Scott, D. W. *et al.* Role of endothelial N-glycan mannose residues in monocyte recruitment during atherogenesis. *Arterioscler Thromb. Vasc Biol* **32**, 51-59 (2012).
 36. Henry, C. B. & Duling, B. R. TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **279**, H2815-H2823 (2000).
 37. Lowe, D. & Raj, K. Premature aging induced by radiation exhibits pro-atherosclerotic effects mediated by epigenetic activation of CD44 expression. *Aging Cell* **13**, 900-910 (2014).
 38. Moremen, K. W., Tiemeyer, M. & Nairn, A. V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 448-462 (2012).
 39. Nairn, A. V. *et al.* Regulation of glycan structures in animal tissues: transcript profiling of glycan-related genes. *J Biol Chem* **283**, 17298-17313 (2008).
 40. Zheng, H., Wang, J., Kotliansky, V. E., Gotwals, P. J. & Hauer-Jensen, M. Recombinant soluble transforming growth factor beta type II receptor ameliorates radiation enteropathy in mice. *Gastroenterology* **119**, 1286-1296 (2000).
 41. Rannou, E. *et al.* In vivo evidence for an endothelium-dependent mechanism in radiation-induced normal tissue injury. *Sci Rep* **5**, 15738 (2015).
 42. Weintraub, N. L., Jones, W. K. & Manka, D. Understanding radiation-induced vascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **55**, 1237-1239 (2010).
 43. Chou, C. H., Chen, S. U. & Cheng, J. C. H. Radiation-induced interleukin-6 expression through MAPK/p38/NF-kappaB signaling pathway and the resultant antiapoptotic effect on endothelial cells through Mcl-1 expression with sIL6-Ralpha. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **75**, 1553-1561 (2009).
 44. Halle, M., Hall, P. & Tornvall, P. Cardiovascular disease associated with radiotherapy: activation of nuclear factor kappa-B. *J Intern Med* **269**, 469-477 (2011).
 45. Ekstrom, M. *et al.* Systemic inflammation activates the nuclear factor-kappaB regulatory pathway in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**, E234-40 (2010).
 46. Halle, M. *et al.* Sustained inflammation due to nuclear factor-kappa B activation in irradiated human arteries. *J Am Coll Cardiol* **55**, 1227-1236 (2010).
 47. Schaeue, D., Kachikwu, E. L. & McBride, W. H. Cytokines in radiobiological responses: a review. *Radiat Res* **178**, 505-523 (2012).

48. Yang, F. *et al.* Phosphoproteome profiling of human skin fibroblast cells in response to low- and high-dose irradiation. *J Proteome Res* **5**, 1252-1260 (2006).
49. Potters, L. *et al.* American Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ASTRO) and American College of Radiology (ACR) Practice Guideline for the Performance of Stereotactic Body Radiation Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **76**, 326-332 (2010).
50. Simone, C. B. *et al.* Stereotactic body radiation therapy for lung cancer. *Chest* **143**, 1784-1790 (2013).
51. García-Vallejo, J. J. *et al.* Activation of human endothelial cells by tumor necrosis factor- α results in profound changes in the expression of glycosylation-related genes. *J Cell Physiol* **206**, 203-210 (2006).
52. Willhauck-Fleckenstein, M. *et al.* Transcriptional regulation of the vascular endothelial glycome by angiogenic and inflammatory signalling. *Angiogenesis* **13**, 25-42 (2010).
53. Peng, Y., Li, J. & Geng, M. The glycan profile of endothelial cells in the present of tumor-conditioned medium and potential roles of beta-1,6-GlcNAc branching on HUVEC conformation. *Mol Cell Biochem* **340**, 143-152 (2010).
54. Wolinsky, H. *et al.* Hydrolase activities in the rat aorta. I. Effects of diabetes mellitus and insulin treatment. *Circ. Res.* **42**, 821-831 (1978).
55. Renkonen, J., Tynnenen, O., Hayry, P., Paavonen, T. & Renkonen, R. Glycosylation might provide endothelial zip codes for organ-specific leukocyte traffic into inflammatory sites. *Am J Pathol* **161**, 543-550 (2002).
56. Kobayashi, M. *et al.* Prominent expression of sialyl Lewis X-capped core 2-branched O-glycans on high endothelial venule-like vessels in gastric MALT lymphoma. *J Pathol* **224**, 67-77 (2011).
57. Gaugler, M. H. *et al.* Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro. *Int J Radiat Biol* **72**, 201-209 (1997).
58. Molla, M. *et al.* Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **57**, 264-273 (2003).
59. Milliat, F. *et al.* Essential role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation enteropathy. *Am J Pathol* **172**, 691-701 (2008).
60. Martinez, P. *et al.* Macrophage polarization alters the expression and sulfation pattern of glycosaminoglycans. *Glycobiology* **25**, 502-513 (2015).
61. Cesaretti, M., Luppi, E., Maccari, F. & Volpi, N. A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction. *Carbohydr Polym* **54**, 59-61 (2003).
62. Mestdagh, P. *et al.* A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* **10**, R64 (2009).
63. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. (2015).
64. Fox, J. The R Commander: A basic statistics graphical user interface to R. *J Stat Soft* **14**, 1-42 (2005).
65. Lê, S., Josse, J. & Husson, F. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *J Stat Soft* **25**, 1-18 (2008).
66. Nikitin, A., Egorov, S., Daraselina, N. & Mazo, I. Pathway studio-the analysis and navigation of molecular networks. *Bioinformatics* **19**, 2155-2157 (2003).

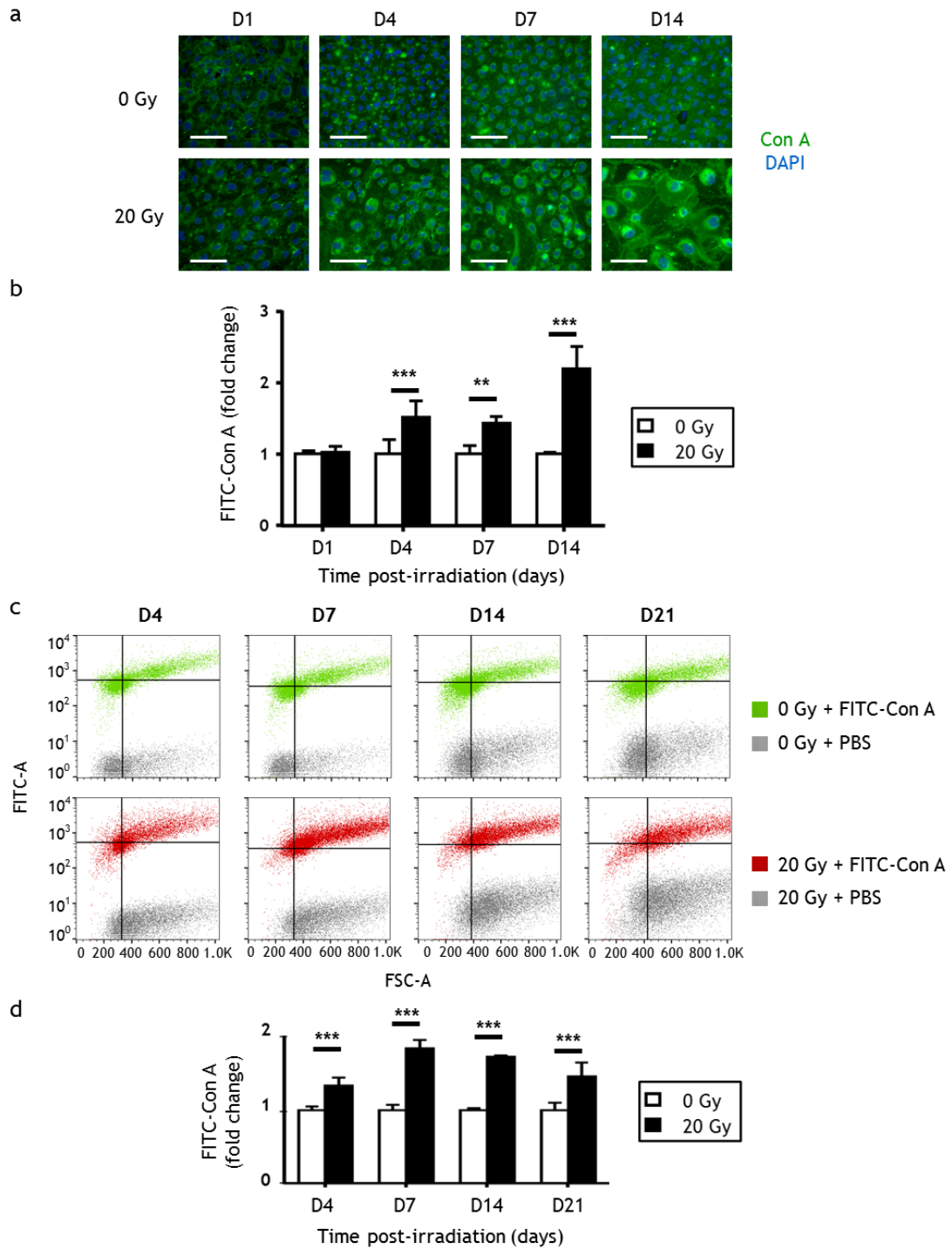


Figure 1. Quantification of Con A staining of HUVECs after irradiation. (a) Representative fluorescence microscopy images of HUVECs labelled with FITC-Con A. Scale bar: 100 μ m. (b) Fold changes of FITC-Con A fluorescence emission densities determined by fluorescence microscopy (mean \pm SD). Experiment was replicated twice (two different cultures) with n=4 repeated measures within each replication for each time point. Data represent one of the two experiments. (c) Biparametric flow cytometry analysis (FSC/FITC-Con A) of HUVECs (one representative experiment). The black solid lines indicate the average medians of the FSC-A (vertical bar) and the FITC-A (horizontal bar) of the control samples at the indicated time post-irradiation. (d) Fold change of FITC-Con A fluorescence intensity medians determined by flow cytometry (mean \pm SD). Experiment was replicated twice (two different cultures) with respectively n=4 and n=3 repeated measures within each replication for each time point. Data represent the mean of the two experiments. Data analyzed by two-way ANOVA (b, d). *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001.

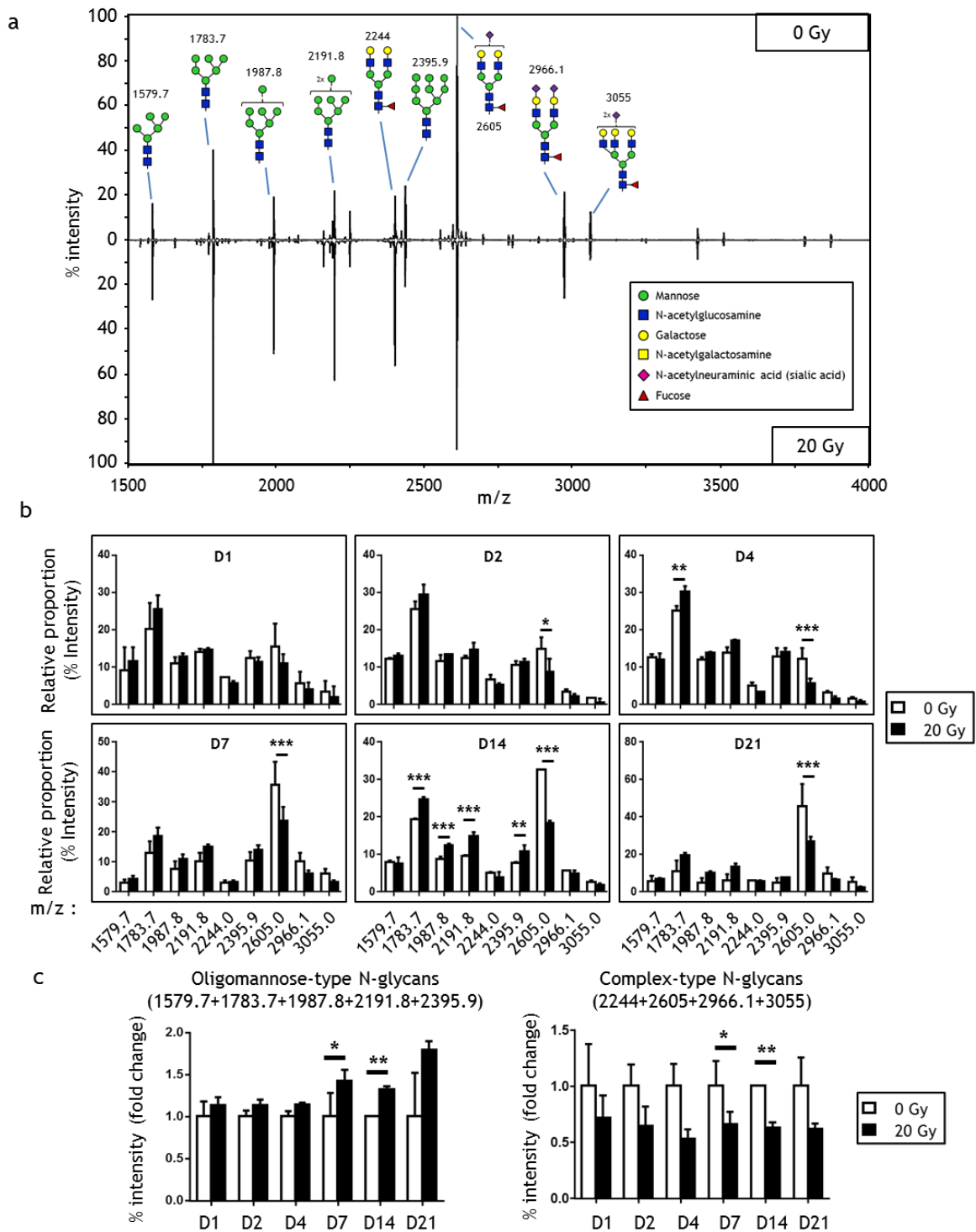


Figure 2. Quantification of N-glycans structures of HUVECs by MALDI-TOF mass spectrometry. (a) Representative MALDI-TOF MS mirror spectra of permethylated N-glycans derived from control and 20 Gy-irradiated HUVECs 14 days post-exposure. The nine structures species quantified in this study are indicated. (b) Changes in relative abundances of the nine structure species observed in glycosylation patterns between control and 20 Gy-irradiated HUVECs (mean \pm SD). Data analyzed by two-way ANOVA (b). (c) Changes in relative abundances of oligomannose- and complex-type N-glycans observed in glycosylation patterns between control and 20 Gy-irradiated HUVECs (mean \pm SD) (see Supplemental Fig. 4 for the classification of N-glycans types). Data analyzed by two-tailed t-test (c). Experiment was replicated twice (two different cultures) with n=2 repeated measures and n=3 spectrum acquisitions within each replication for D7, and twice (two different cultures) with n=1 repeated measures and n=3 spectrum acquisitions within each replication for the other time points. Data represent the mean of the two experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

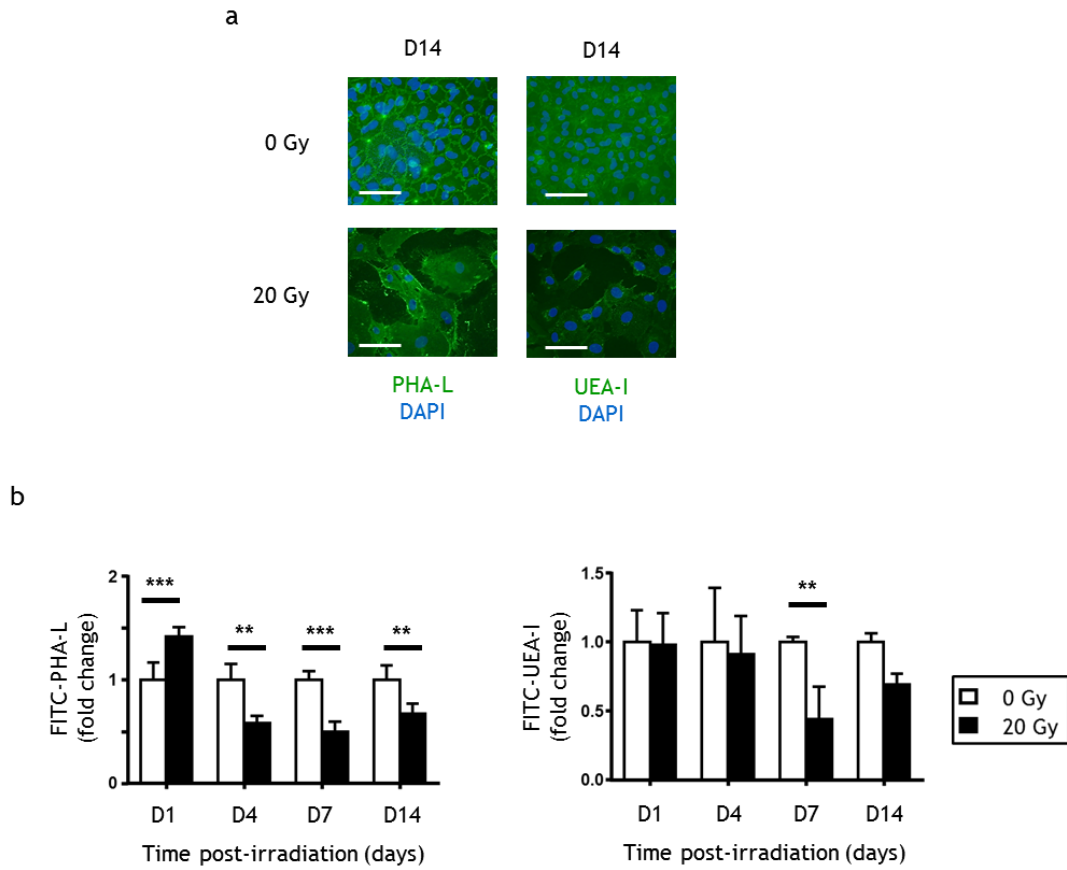


Figure 3. Quantification of PHA-L and UEA-I labelling of HUVECs after irradiation. (a) Representative fluorescence microscopy images of HUVECs labelled with FITC-PHA-L and FITC-UEA-I. Scale bar: 100 μ m. (b) Fold changes of FITC-PHA-L and FITC-UEA-I fluorescence emission densities determined by fluorescence microscopy (mean \pm SD). Experiment was replicated twice (two different cultures) with n=4 repeated measures within each replication for each time point. Data represent one of the two experiments. Data analyzed by two-way ANOVA (b). *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001.

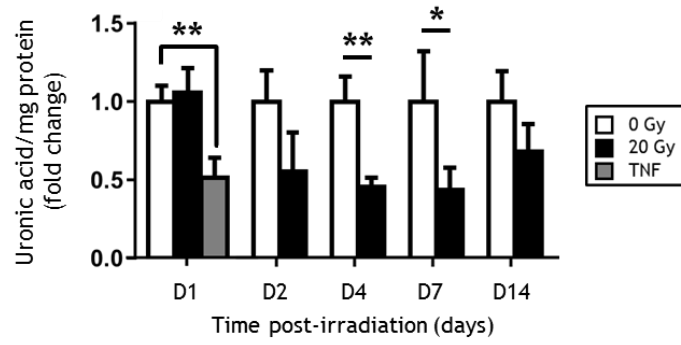


Figure 4. Measurements of glycosaminoglycans content in HUVECs after irradiation or TNF α treatment. Fold changes in abundances of uronic acid between control, TNF- α -treated and 20 Gy-irradiated HUVECs (mean \pm SD). Values were normalized by the amount of proteins of the samples after the measurements. Experiment was made once with n=3 repeated measures for D1, D2 and D14, twice (two different cultures) with n=4 repeated measures within each replication for D7, and in triplicate (three different cultures) with n=3 repeated measures within each replication for D4. Data represent the mean of the two experiments. Data analyzed by two-tailed *t*-test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

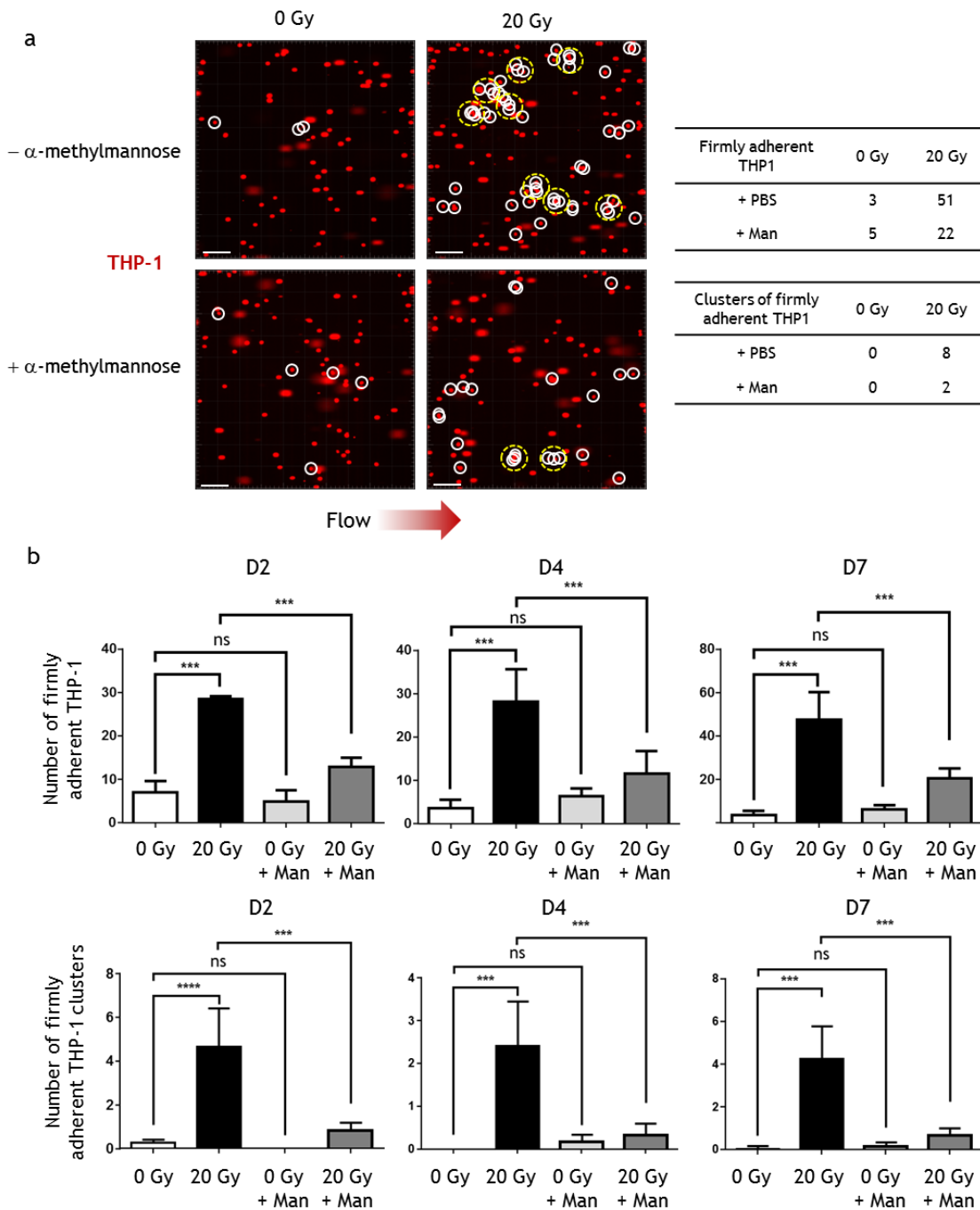


Figure 5. Interaction of THP-1 cells with a monolayer of HUVECs under flow conditions. (a) Snapshots of representative movies used in the experiments illustrating the interactions between THP-1 and control or 20 Gy- irradiated HUVECs at day 7 post-irradiation in the presence or absence of the mannose competitive inhibitor α -methylmannose. After 5 minutes of a continuous flow of red-labelled (Cell Tracker) THP-1 cells, a film of ten images was recorded to determine the number of firmly adherent THP1 cells (surrounded by white circles) and the number of clusters of firmly adherent THP-1 cells (three cells or more) (surrounded by yellow dotted-line circles). The full representative movies are available in Supplementary information (Supplementary Movies 1-4). The number of single and clusters of firmly adherent THP-1 cells is shown to illustrate this representative example. Scale bar: 100 μ m. (b) Quantification of firmly adherent THP-1 cells in the presence or absence of α -methylmannose (Man) at different times post-irradiation of HUVECs (mean \pm SD). Firmly adherent THP-1 cells (single and clusters) were counted using the movies recorded in the experiment. Experiment was replicated twice (two different cultures) with at least n=3 repeated measures from at least three different lamella and with n=3 repeated measures from three different fields of observation within each lamella, for each time point. Data represent the mean of the two experiments. Data analyzed one-way ANOVA (b). *, p<0.05; **, p<0.01, ***, p<0.001.

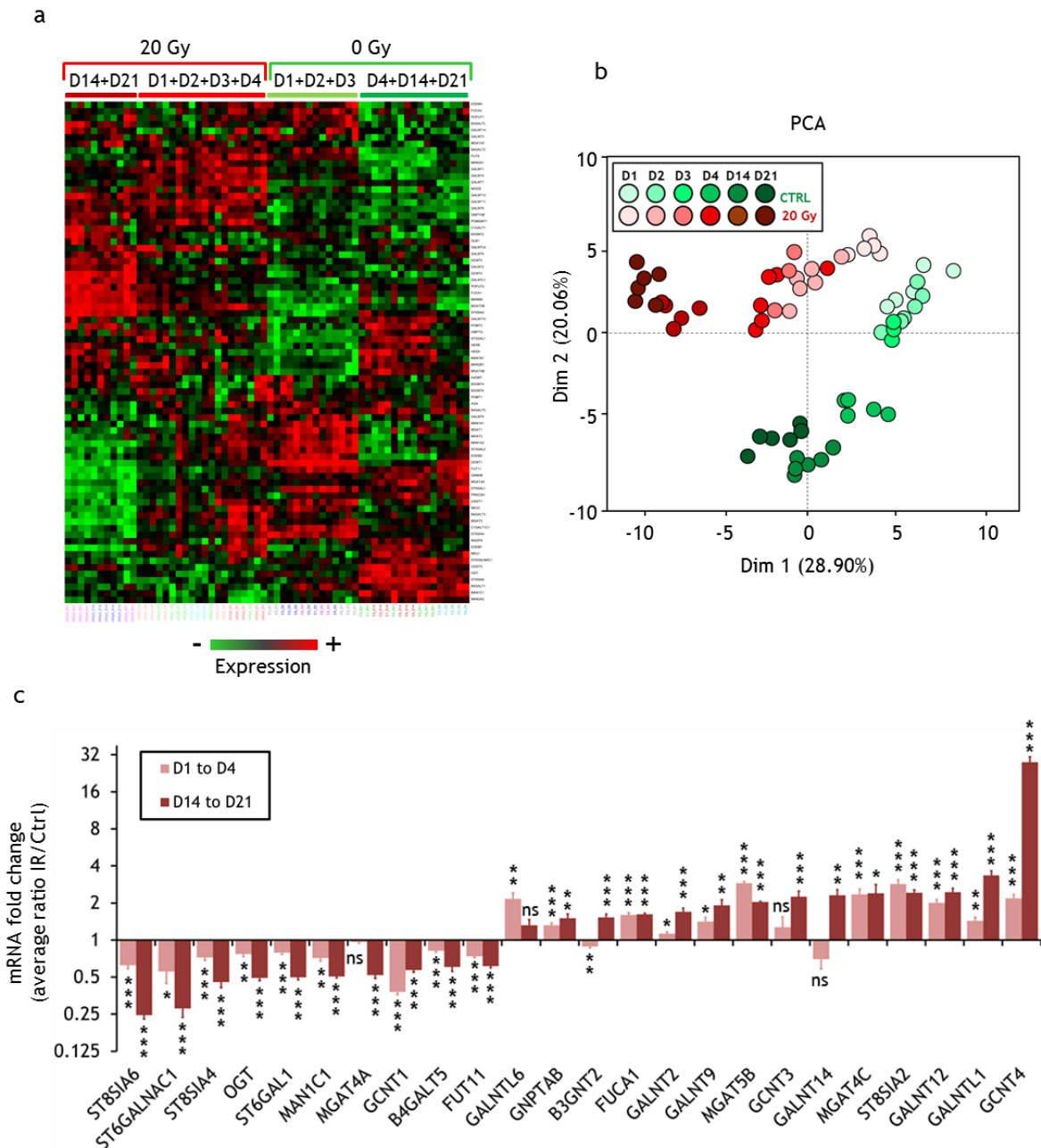


Figure 6. Glycosylation transcriptome analysis of irradiated HUVECs. Control and 20 Gy-irradiated HUVECs mRNA levels of 84 genes encoding proteins involved in glycosylation were measured by real-time quantitative PCR using the SABiosciences Human Glycosylation RT² Profiler™ PCR Array (1, 2, 3, 4, 14 and 21 days post-exposure). (a) Heat map of the hierarchical clustering of all HUVECs samples based on measured gene expression values (Pearson's correlation, average linkage, assay centric). (b) Principal component analysis of all HUVECs samples based on measured gene expression values. (c) Fold changes of statistically differentially expressed mRNA (24 genes) between control (0 Gy) and 20 Gy-irradiated HUVEC samples (fold change threshold 1.5) (mean \pm SEM, Log₂ scale). For statistical comparisons, samples from different time points were grouped according to the HC and PCA multivariate analyses that show a clear difference between early (days 1 to 4) and late (days 14 and 21) time points at 20 Gy. Experiment was replicated twice (two different cultures) with n=3 repeated measures within the replications for each time point. The hierarchical clustering and the PCA have been performed using all samples from the two experiments. The histogram has been built from the two experiments and by grouping the data from D1 to D4 (with final n=19 for 0 Gy samples and n=20 for 20 Gy samples), and from D14 to D21 (with finally n=12 for 0 Gy samples and n=11 for 20 Gy samples). Data analyzed by two-tailed *t*-test (c). Adjusted *p*-values (Benjamini-Hochberg procedure) (Ctrl vs IR) : ns, non significant ($p \geq 0.05$); *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Ct, Δ Ct, $2^{-\Delta Ct}$, fold changes, SD, SEM and *p*-values are displayed in the Supplementary Table 4.

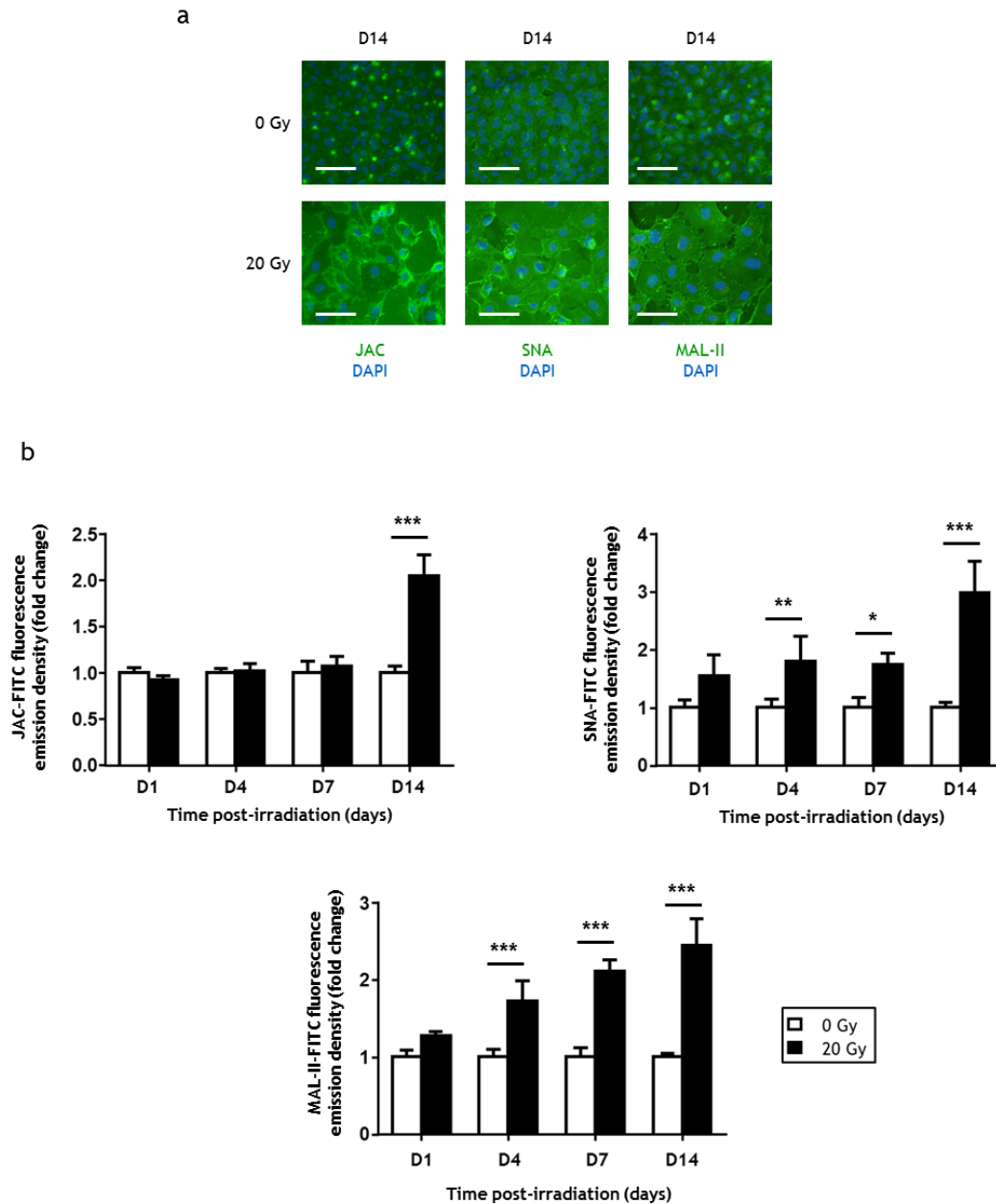


Figure 7. Quantification of JAC, SNA and MAL-II labelling after irradiation. (a) Representative fluorescence microscopy images of HUVECs labelled with FITC-JAC, FITC-SNA and FITC-MAL-II. Scale bar: 100 μ m. (b) Fold changes of average FITC-JAC, FITC-SNA and FITC-MAL-II fluorescence emission densities determined by fluorescence microscopy (mean \pm SD). Experiments were replicated twice (two different cultures) with n=4 repeated measures within each replication for each time point. Data represent one of the two experiments. Data analyzed by two-way ANOVA (b). *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001.

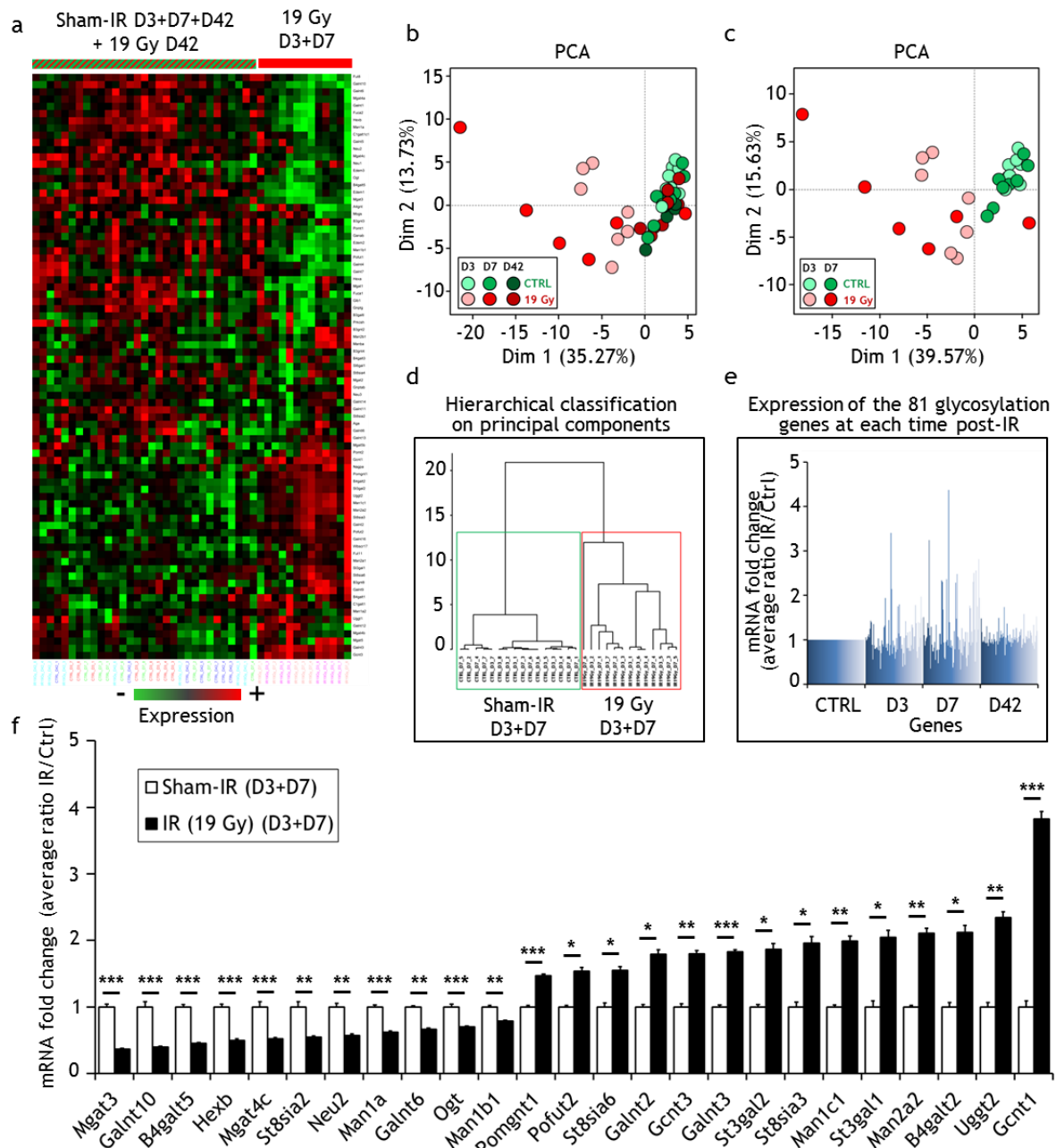


Figure 8. Glycosylation transcriptome analysis of irradiated C57BL/6 small intestine. Sham- and 19 Gy-irradiated C57BL/6 mRNA levels of 84 genes encoding proteins involved in glycosylation were measured by real-time quantitative PCR using the SABiosciences Mouse Glycosylation RT² Profiler™ PCR Array (3, 7 and 42 days post-exposure). (a) Heat map of the hierarchical clustering of all mouse samples based on measured gene expression values (Pearson's correlation, complete linkage, assay centric). (b) Principal component analysis of all mouse samples based on measured gene expression values. (c) Principal component analysis of D3 and D7 mouse samples based on measured gene expression values. (d) Hierarchical classification on principal components from the PCA of D3 and D7 mouse samples. (e) Fold change expression (sham-IR vs 19 Gy) of the measured glycosylation genes at each time post-IR. (f) Fold changes of statistically differentially expressed mRNA (25 genes) between sham- and 19 Gy-irradiated C57BL/6 samples (threshold 1.5 Sham-IR vs 19 Gy at D3 or D7) (mean \pm SEM). For statistical comparisons, samples from D3 and D7 time points were grouped according to the HC and PCA multivariate analyses that show a clear grouping of the D3 and D7 samples. Experiment was performed once with n=8 mice for sham-irradiation at day 3, n=7 mice for 19 Gy-irradiation at day 3, n=8 mice for sham-irradiation at day 7, n=6 mice for 19 Gy-irradiation at day 7, n=7 mice for sham-irradiation at day 42, and n=8 mice for 19 Gy-irradiation at day 42. The histogram has been built by grouping the data from D3 and D7, with final n=16 for sham-irradiated mice and n=13 for 19 Gy-irradiated mice. Data analyzed by two-tailed *t*-test (c). Adjusted *p*-values (Benjamini-Hochberg procedure) (Ctrl vs IR) : *, *p*<0.05; **, *p*<0.01; ***, *p*<0.001. Ct, Δ Ct, $2^{-\Delta\text{Ct}}$, fold changes, SD, SEM and *p*-values are displayed in the Supplementary Table 5.

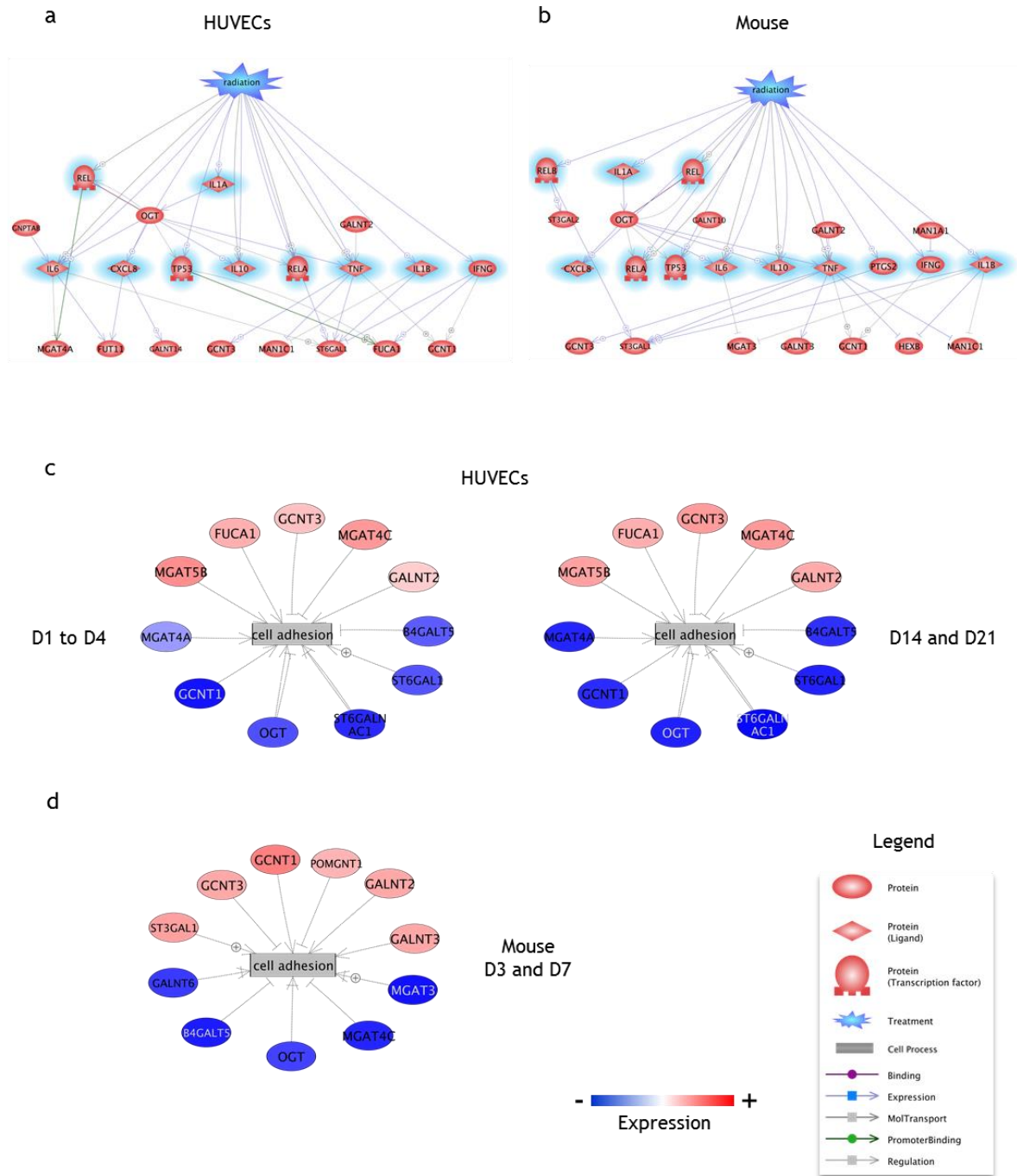
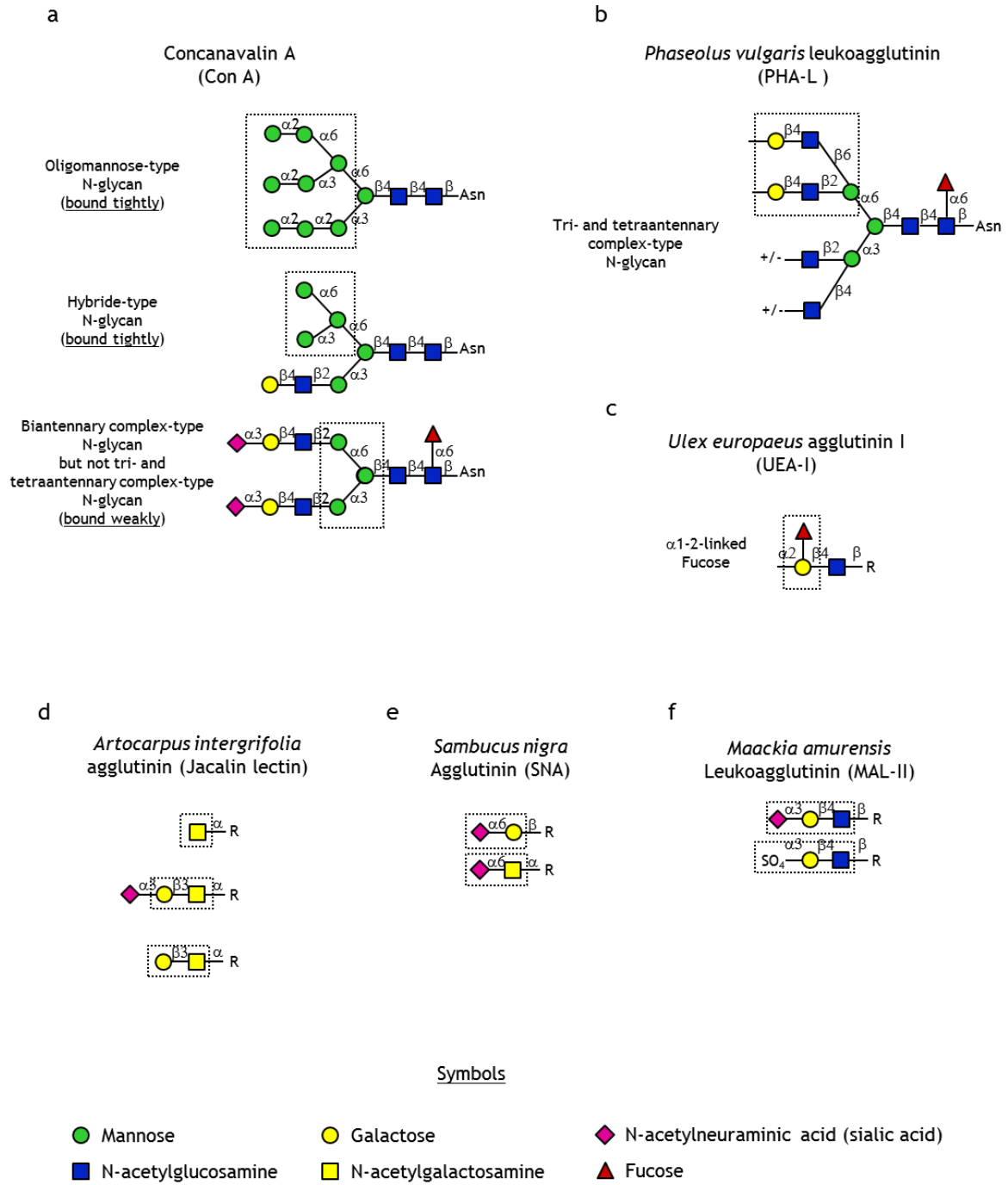
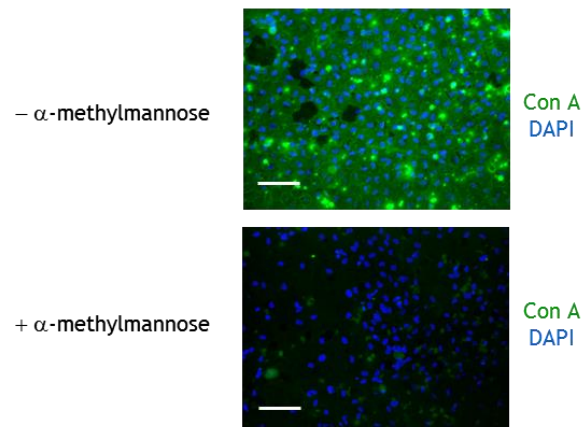


Figure 9. Pathway analysis of statistically differentially expressed genes. Gene/protein networks were established with Pathway Studio software by using a text mining algorithm. (a, b) Relationships of the twenty four selected HUVECs genes and the twenty five selected mouse genes to “Radiation” and common genes/proteins (highlighted in blue) involved in the response to ionizing radiation (CXCL8 (i.e. MIP-1 in mouse), CXCL12, IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, NF κ B1, PTGS2, REL, RELA, RELB, TNF α and TP53). (c, d) Networks of statistically differentially genes linked by the regulating cell process “Cell adhesion”. Genes in blue and red ovals are respectively under- and over-expressed at indicated days post-irradiation. Relationships details are given in Supplementary Tables 6-8.

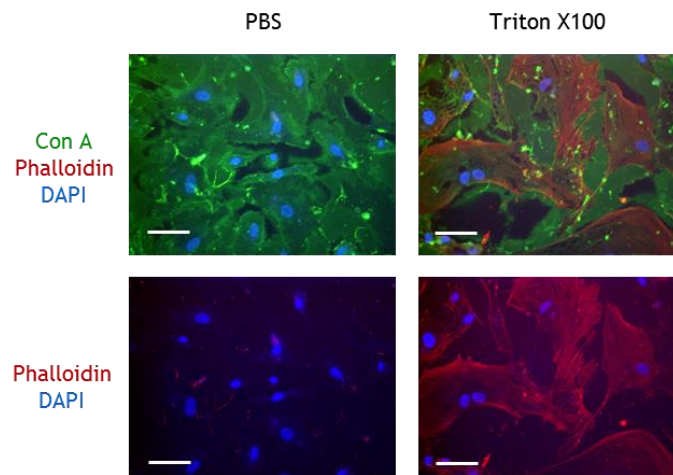


Supplementary Figure 1. Types of glycan determinants bound with high affinity by the different plant lectins used in the study (from Varki et al, 2009)³⁰. (a) Examples of N-glycans recognized by concanavalin A (Con A). (b) N-glycans recognized by *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L). (c) Types of glycan recognized by *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-I). (d) Types of glycan recognized by *Artocarpus intergrifolia* agglutinin (Jacalin lectin, JAC). (e) Types of glycan recognized by *Sambucus nigra* agglutinin (SNA). (f) Types of glycan recognized by *Maackia amurensis* leucoagglutinin (MAL-II). The determinants required for binding are indicated in the dotted boxed areas.

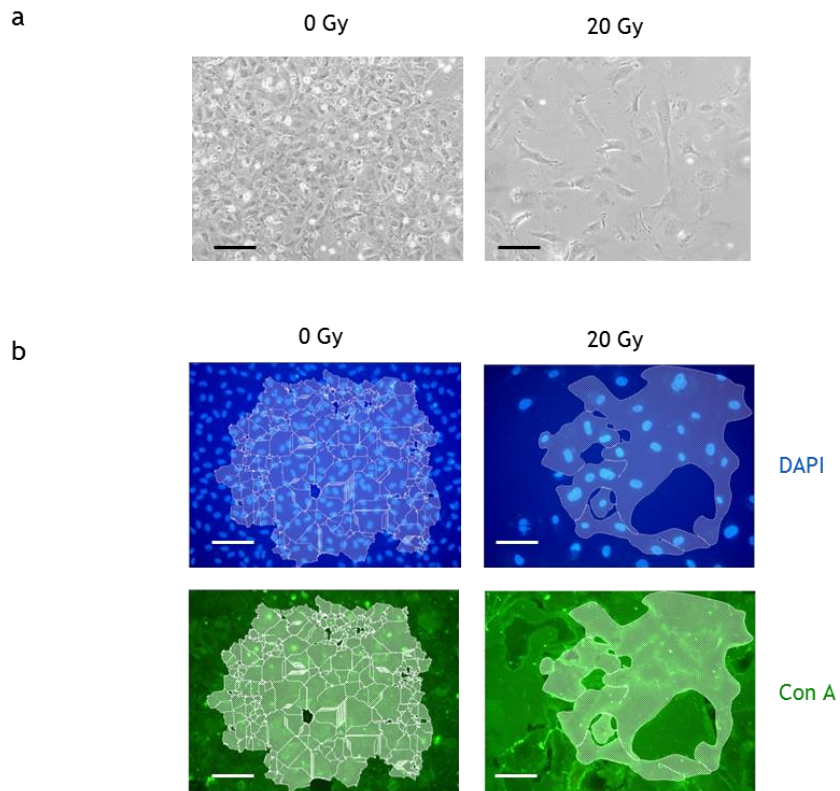
a



b



Supplementary Figure 2. High mannose/hybrid N-glycans labeling of the outer surface of the plasma membrane of HUVECs using FITC-Con A. (a) Con A staining of non-irradiated HUVECs in the absence and presence of α -methylmannose. Experiment was replicated twice (two different cultures) with n=2 repeated measures within each replication. (b) Con A and phalloidin staining of 20 Gy-irradiated HUVECs at day 15 post-exposure with or without membrane permeabilization using Triton X100 prior to staining. The experiment was performed once with n=3 repeated measures. Scale bar: 100 μ m.



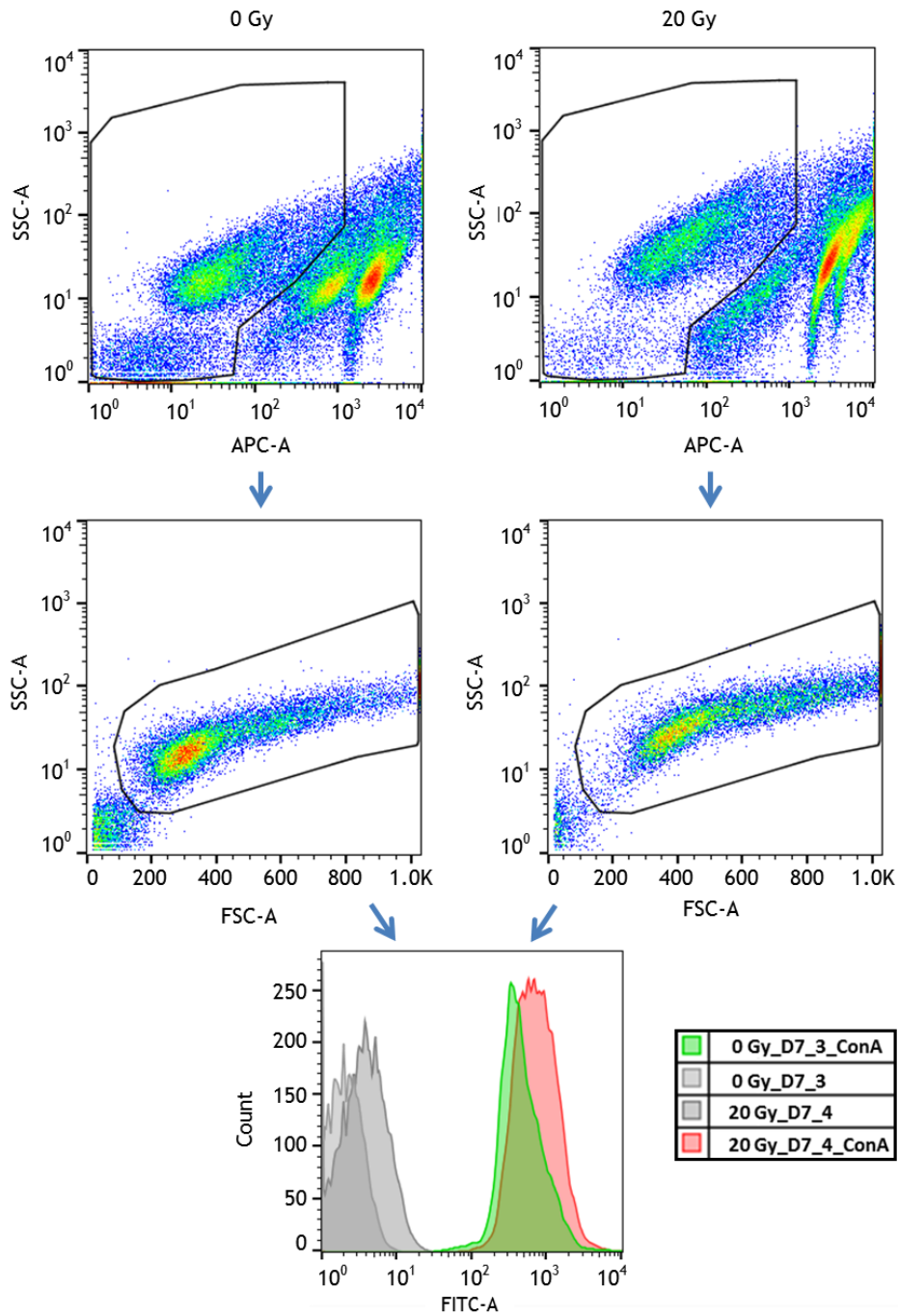
c

$$\text{Fluorescence Emission Density} = \frac{\text{Integrated Fluorescence Emission}}{(\text{Surface area of cells})^2}$$

Units:

- Fluorescence Emission Density: Intensity level. μm^{-2}
- Integrated Fluorescence Emission: Intensity level. μm^2
- Surface of cells: μm^2

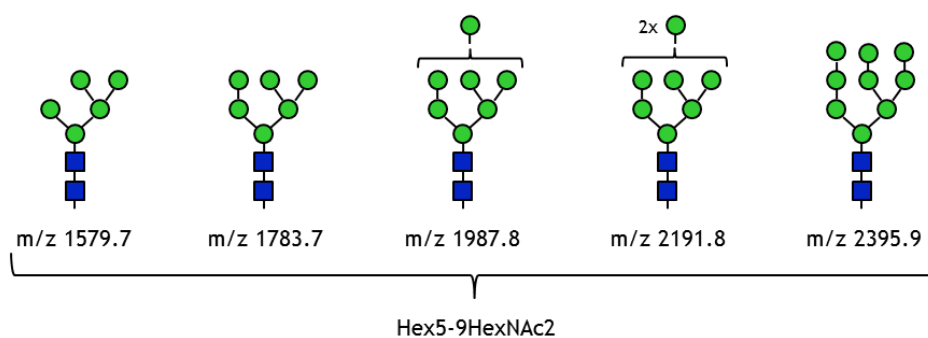
Supplementary Figure 3. Microscopy fluorescence quantification of lectin staining. (a) Representative phase-contrast microscopy images of control and 20 Gy-irradiated HUVECs at day 14 post-exposure. (b) Fluorescence microscopy images of control and 20 Gy-irradiated HUVECs labeled with FITC-Con A at day 14 post-exposure. An example of surface fluorescence quantification of FITC-Con A labeling is shown. The quantified areas are shown as white cross-hatched surfaces. Areas were automatically (control cells) or semi-automatically (irradiated cells) determined, and subsequently quantified by the software Histolab (Microvision). Note that the edges of images were not taken into account for the quantification to limit variations due to lighting effects. Scale bar: 100 μm . (c) The density of fluorescence emission (in intensity level per unit area) was used to compare the difference of labeling between control and 20 Gy-irradiated cells. This quantity was calculated by the ratio between the integrated fluorescence emission and the squared cell surface area of cells.



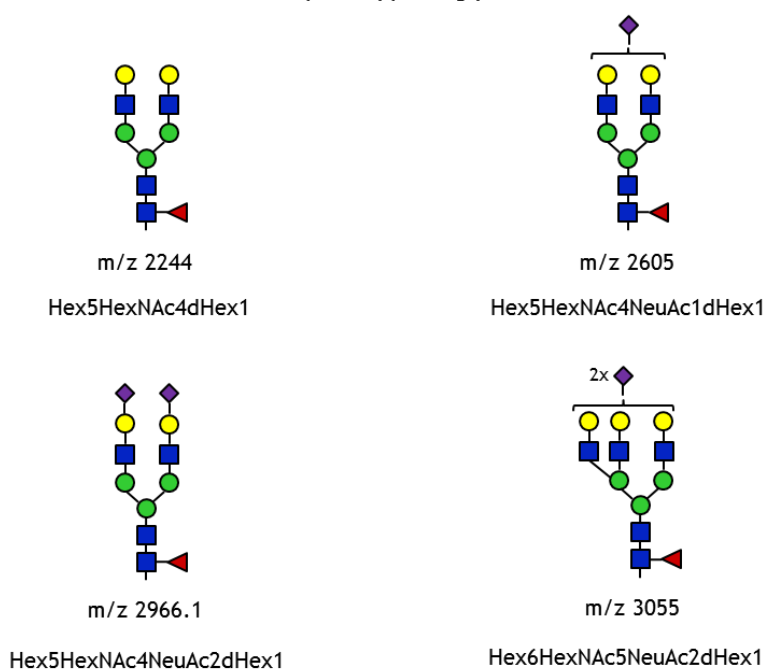
	Sample Name	Count	Median : FITC-A	Mean : FITC-A	Geometric Mean : FITC-A	Count	Median : FSC-A
■	0 Gy_D7_3_ConA	16002	417	596	451	16002	336
■	0 Gy_D7_3	27946	1.01	1.76	1.50	27946	324
■	20 Gy_D7_4	24484	3.21	4.06	3.02	24484	454
■	20 Gy_D7_4_ConA	12908	685	869	695	12908	476

Supplementary Figure 4. Gating strategy for flow cytometry analysis. An example of representative FITC-Con A labeled control and 20 Gy-irradiated HUVECs 7 days post-exposure is shown. Cells were first gated on the basis of their viability assessed by the To-Pro-3 labeling (APC-A) (top panels), and then on the basis of their size (FSC-A) and granulometry (SSC-A) (middle panels). The bottom panel shows a merge of the control and 20 Gy-irradiated FITC-Con A labeled cell distributions (the unlabeled cell distributions are also shown). The table displays the median values of the FITC intensities of the corresponding distributions. SSC, side scatter size; FSC, forward scatter; APC, To-Pro-3; FITC, Con A.

Oligomannose-type N-glycans



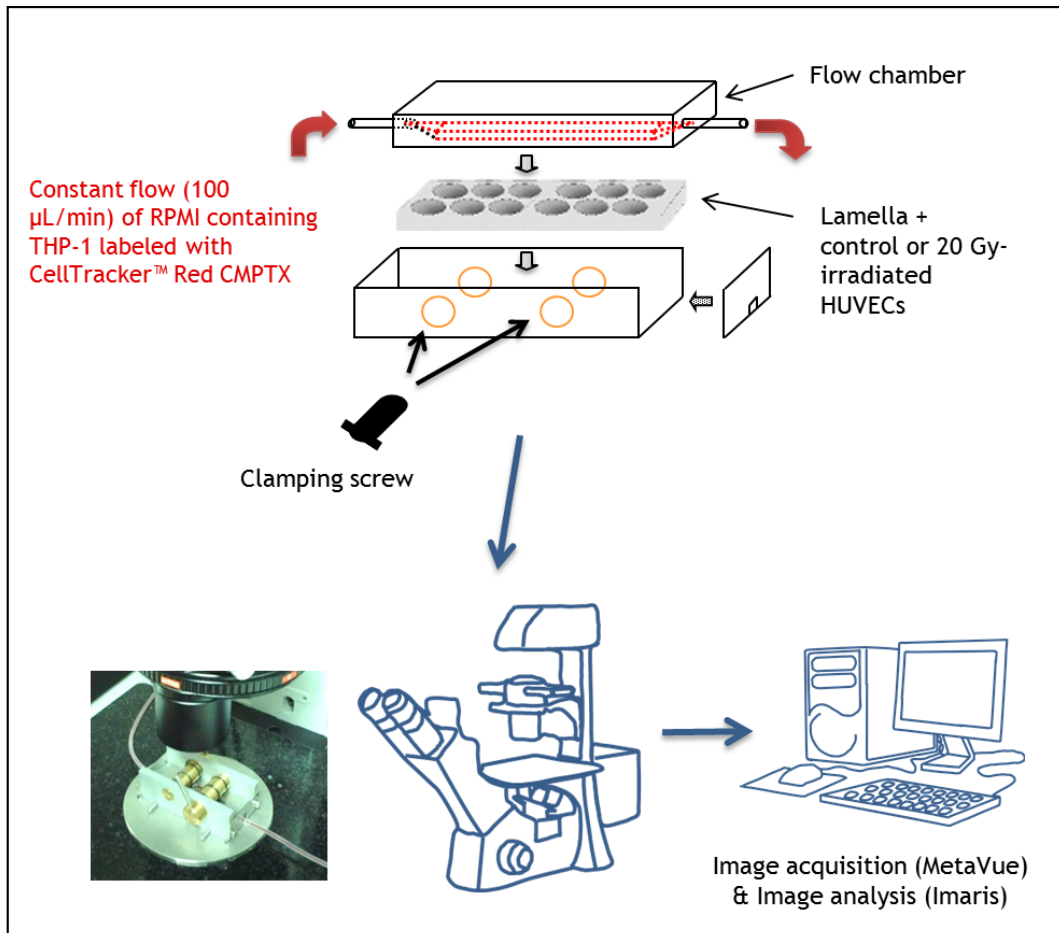
Complex-type N-glycans



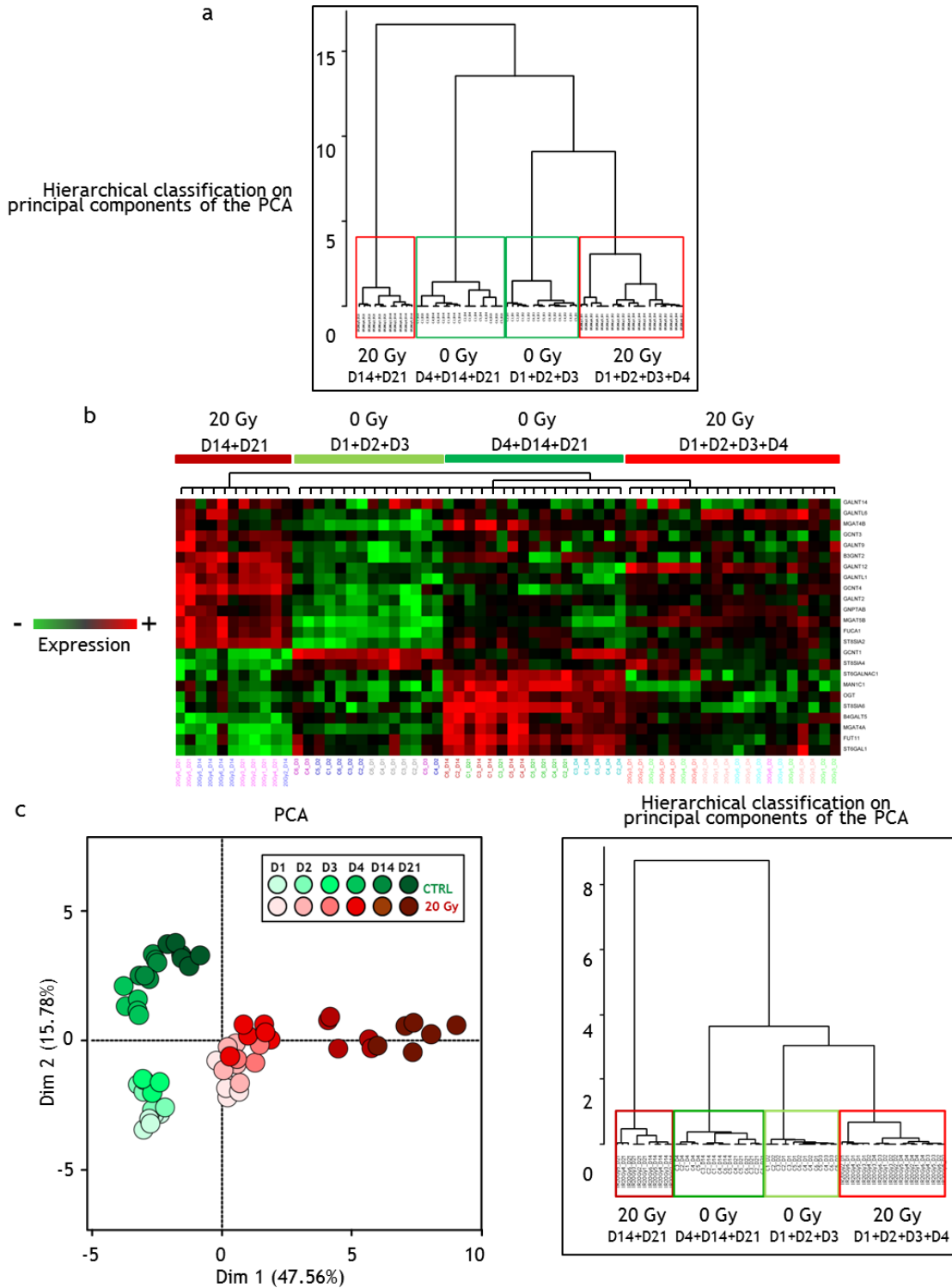
Symbols

- | | | |
|---------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| Mannose | Galactose | N-acetylneuraminic acid (sialic acid) |
| N-acetylglucosamine | N-acetylgalactosamine | Fucose |

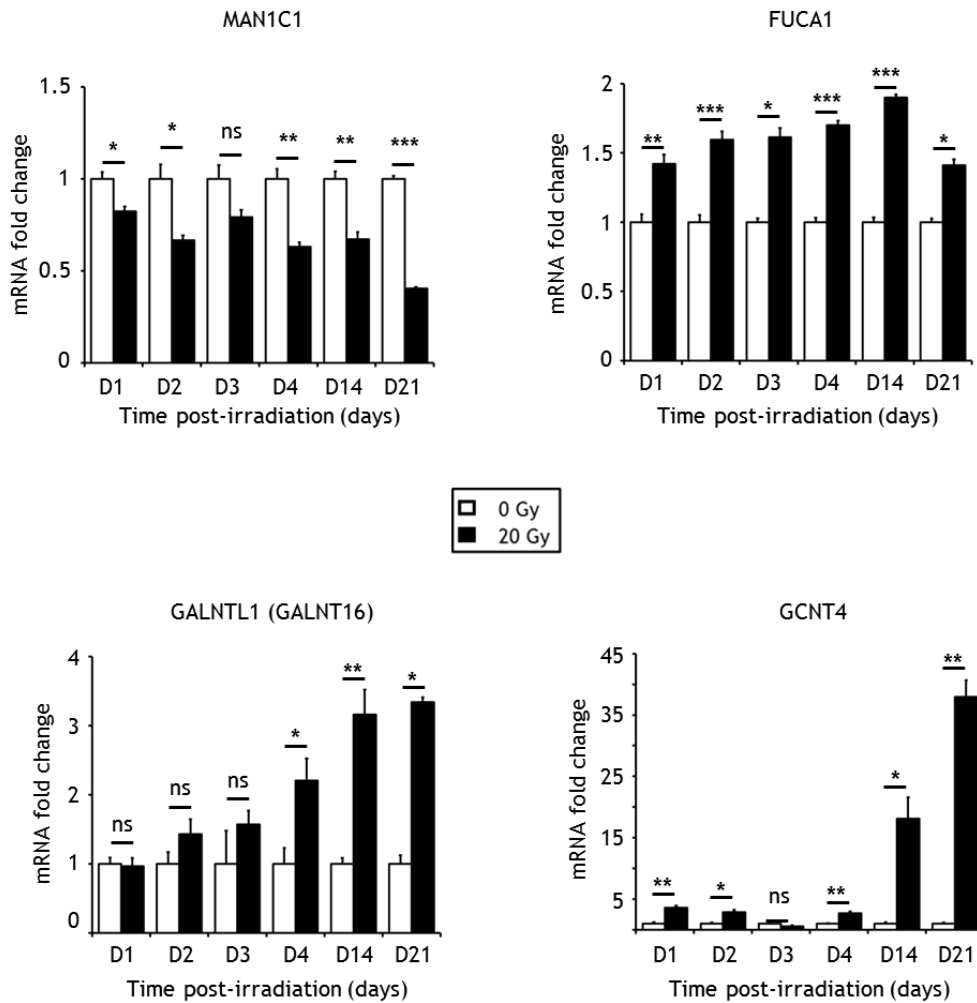
Supplementary Figure 5. m/z and putative structures of the nine N-glycans quantified in the study by MALDI-TOF MS. Putative structures were determined on the basis of composition and biosynthetic pathway knowledge. The structures have been grouped into two types of N-glycans : oligomannose- and complex-type N-glycans.



Supplementary Figure 6. Illustration of the flow chamber and the image analysis workflow used in the study. HUVECs were seeded on a glass lamella. Five days later, the cells at confluency were irradiated at 20 Gy and the lamella was placed in the flow chamber at the chosen time point. THP-1 monocytes fluorescently labeled with CellTracker™ Red CMPTX were perfused through the flow chamber for a total time of 5 min at a constant wall shear rate of 50 s^{-1} and a constant flow rate of $100 \mu\text{L}/\text{min}$ using a syringe coupled to an electric pump (Harvard Apparatus). The entire experiment was visualized in real time at 20 x magnification with a black and white video camera (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. After 5 min of perfusion, a ten-image time-lapse video was recorded to determine the number of firmly adherent monocytes. The time-lapse videos were subsequently analyzed using the image analysis IMARIS software (Bitplane) to determine the number of rolling and firmly adherent monocytes.



Supplementary Figure 7. Multivariate unsupervised statistical analysis of the targeted transcriptomics dataset from control (0 Gy) and 20 Gy-irradiated HUVECs. (a) Hierarchical classification on principal components of the analysis presented in the Figure 6b (all measured genes as variables). (b) Heat map from a hierarchical clustering using the 24 identified statistically differentially genes presented in the Figure 6c. (c) PCA and hierarchical classification on principal components using the twenty-four differentially identified genes presented in Fig. 6c. The experiment was replicated twice (two different cultures) with $n=3$ repeated measures within the replications for each time point. The hierarchical clustering and the PCA were performed using all samples from the two experiments. Ct, ΔCt , $2^{-\Delta Ct}$, fold changes, SD, SEM and p -values are displayed in the Supplementary Table 4.



Supplementary Figure 8. Time-course gene expression analysis of MAN1C1, FUCA1, GALNTL1 and GCNT4 identified in the targeted transcriptome analysis (see Figure 6) following irradiation of HUVECs. Control and 20 Gy-irradiated HUVEC mRNA levels of the 4 genes were measured by real-time quantitative PCR using the SABiosciences Human Glycosylation RT² Profiler™ PCR Array (1, 2, 3, 4, 14 and 21 days post-exposure) (mean +/- SEM). The experiment was replicated twice (two different cultures) with n=3 repeated measures within the replications for each time point. Data represent the mean of the two experiments. Data analyzed by two-tailed *t*-test. Adjusted *p*-values (Benjamini-Hochberg procedure) (Ctrl vs IR): ns, nonsignificant ($p \geq 0.05$); *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Ct, Δ Ct, $2^{-\Delta\text{Ct}}$, fold changes, SD, SEM and *p*-values are displayed in the Supplementary Table 4.

Acknowledgements

Marie-Christine Slomianny died in May 2014. We are grateful to Mathieu Carpentier for technical advices and to Christian Slomianny for the critical review of this manuscript. We thank the GSEA (Groupe de Soutien à l'Experimentation Animale) of IRSN for their excellent skills. This work was supported by Electricity of France (Groupe Gestion Projet-Radioprotection) and IRSN (ROSIRIS program).

Author contributions

Conceived and designed the experiments: C.J., W.M., M-C.S., V.P., F.C., P.M., A.F., F.M. and O.G. Performed the experiments: C.J., W.M., M-C.S., V.P., G.T., V.B., S.S., F.C., E.R., P.M., A.F. and O.G. Analyzed the data: C.J., W.M., V.P., F.F., F.A., F.M. and O.G. Wrote the paper: C.J., F.M. and O.G.

L'article complet comporte aussi des données non publiées dans ce mémoire de thèse :

- Supplementary Table 1 - Raw MALDI-TOF MS mass spectra
- Supplementary Table 2 - MALDI-OF MS signal intensities and per cent intensities of each m/z value
- Supplementary Table 3 - Human and Mouse Gene Table
- Supplementary Table 4 - Dataset and Statistical analysis of HUVEC gene expression data
- Supplementary Table 5 - Dataset and Statistical analysis of Mouse gene expression data
- Supplementary Table 6 - Pathway Analysis - Relationships - Radiation - Common radiation genes
- Supplementary Table 7 - Pathway Analysis - Subnetwork enrichment- Cell Process
- Supplementary Table 8 - Pathway Analysis - Relationships - Cell Process - Cell Adhesion
- Vidéo de la microscopie en flux (vidéo 1-4)

IV. Synthèse des résultats

Afin de faciliter l'interprétation, les résultats obtenus ont été replacés dans les chaînes de synthèse des glycanes. La *Figure 30* présente les résultats pour la chaîne de synthèse des N-glycanes.

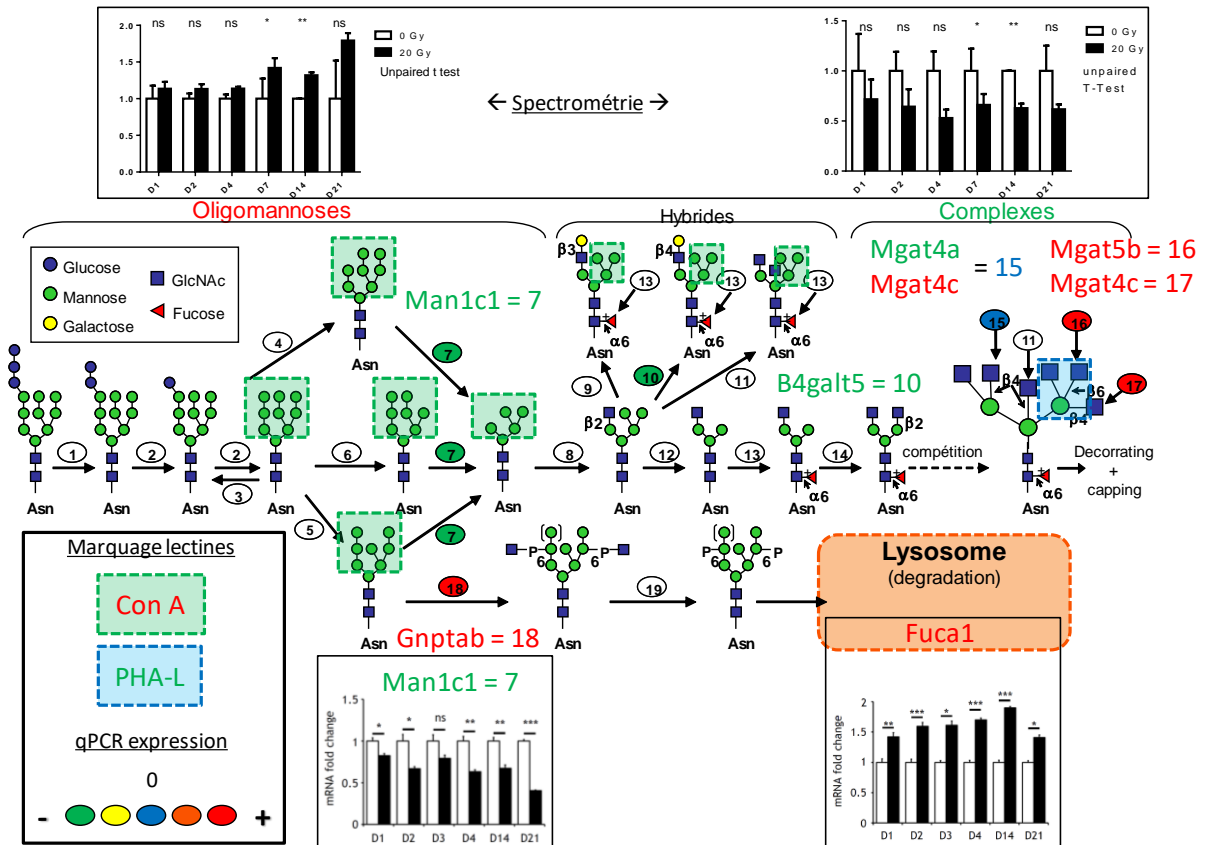


Figure 30 : Présentation globale des résultats concernant l'effet de l'irradiation sur la régulation des N-glycanes, voie de synthèse adaptée d'après Nairn *et al.*²⁰⁸.

La chaîne de synthèse des N-glycanes a été annotée avec les résultats de notre étude. Les structures potentiellement identifiées par les lectines sont encadrées. Les marquages dont l'intensité **augmente** après irradiation sont annotés en **rouge**, ceux dont l'intensité **diminue** sont annotés en **vert**. Le même système est appliqué à l'expression des gènes. Les gènes sont regroupés en famille en fonctions des étapes catalysées par les enzymes pour lesquelles ils codent. Plusieurs enzymes peuvent correspondre à une même étape (les groupes fonctionnels de gènes sont détaillées en ANNEXE IV.B). Le rôle de certaines enzymes peut être redondant. Les résultats de spectrométrie de masses sont en regard des groupes de structures correspondantes dans la chaîne de synthèse.

La **Figure 31** présente les résultats pour la chaîne de synthèse des O-glycanes.

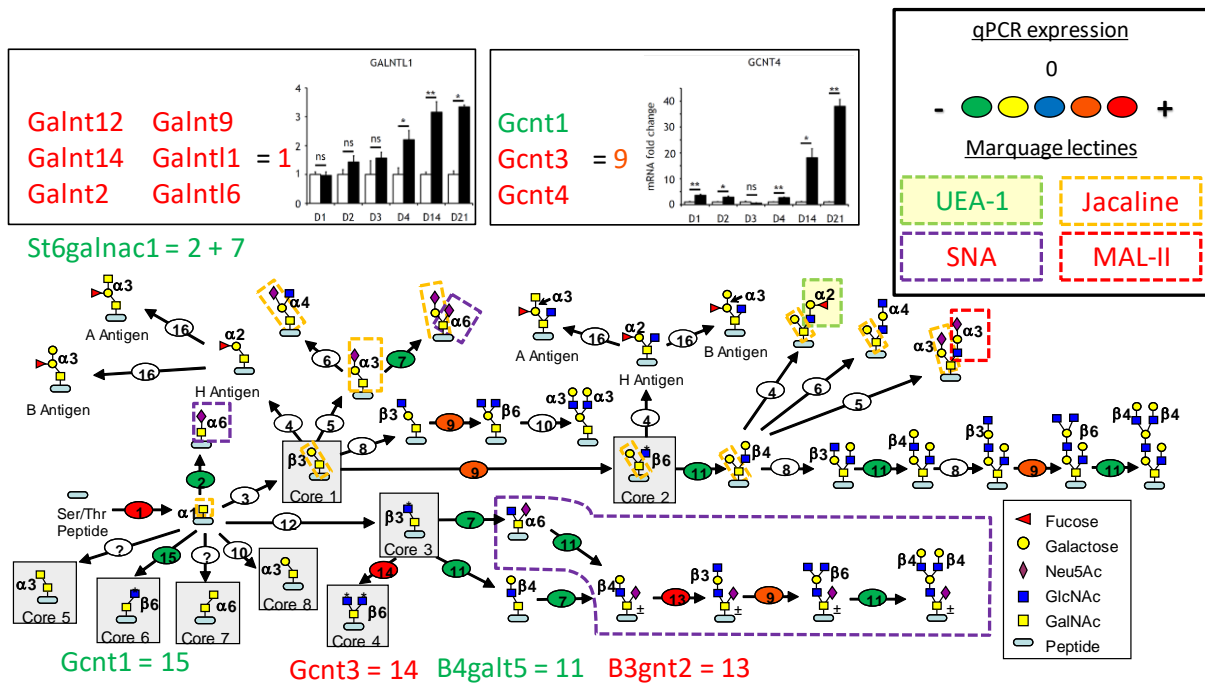


Figure 31 : Présentation globale des résultats concernant l'effet de l'irradiation sur la régulation des O-glycanes, voie de synthèse adaptée d'après Nairn *et al.*²⁰⁸.

La chaîne de synthèse des O-glycane est annotée avec les résultats de notre étude. Les structures potentiellement identifiées par les lectines sont encadrées. Les marquages dont l'intensité **augmente** après irradiation sont annotés en **rouge**, ceux dont l'intensité **diminue** sont annotés en **vert**. Le même système est appliqué à l'expression des gènes. Les gènes sont regroupés en famille en fonctions des étapes catalysées par les enzymes pour lesquelles ils codent (les groupes fonctionnels de gènes sont détaillées en ANNEXE IV.C). Plusieurs enzymes peuvent correspondre à une même étape. Le rôle de certaines enzymes peut être redondant. Par exemples le groupe des Gcnc (Gcnc 1-4) code pour les enzymes de l'étape 9 qui apparait 4 fois dans la chaîne de synthèse présenté ici. Parallèlement le gène Gcnc3 code seul, pour l'enzyme de l'étape 14.

La **Figure 32** présente les résultats pour l'étape de *capping* commune aux N- et aux O-glycanes

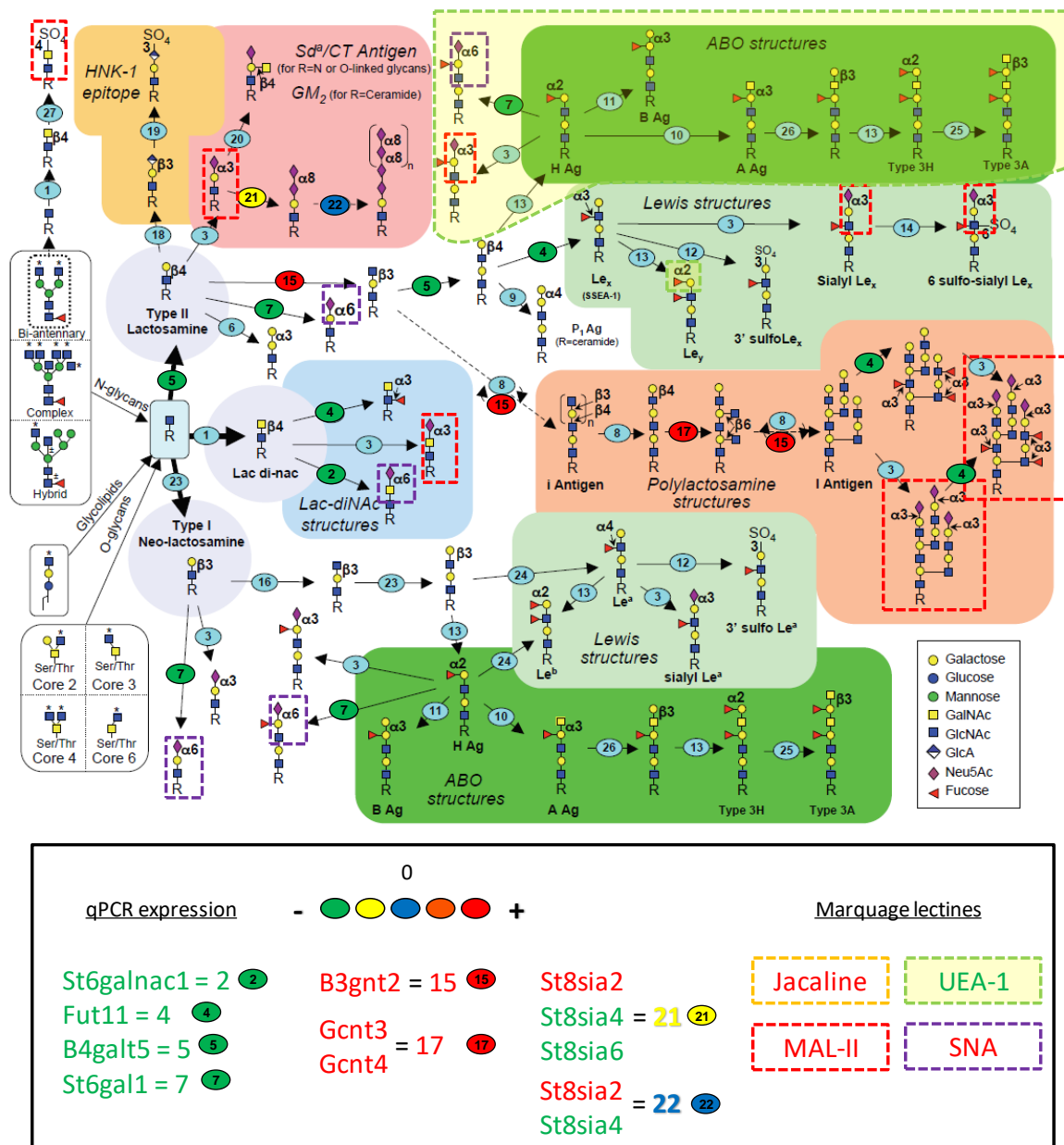


Figure 32 : Présentation globale des résultats concernant l'effet de l'irradiation sur la régulation de la maturation (*capping*), voie de synthèse adaptée d'après Nairn *et al.*²⁰⁸.

La chaîne de synthèse des structures terminales (*capping*) a été annotée avec les résultats obtenus dans l'étude. Les marquages dont l'intensité **augmente** après irradiation sont annotées en **rouge**, ceux dont l'intensité **diminue** sont annotées en **vert**. Le même système est appliqué à l'expression des gènes. Les gènes sont regroupés en famille en fonctions des étapes catalysées par les enzymes pour lesquelles ils codent (les groupes fonctionnels de gènes sont détaillées en ANNEXE IV.D).

Ces résultats seront interprétés et mis en regard de la littérature existante dans la *Discussion*.

Résultats supplémentaires

I. Etude transcriptomique des gènes codant pour les enzymes impliqués dans la synthèse des GAGs

Comme le taux de GAGs diminue après irradiation dans les HUVECs, nous avons cherché à connaître l'impact des RI sur la machinerie de synthèse des GAGs. Une analyse transcriptomique de cellules HUVECs témoins (0 Gy) et irradiées (20 Gy) a été effectuée sur 8 gènes codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse des GAGs. Le niveau d'expression des gènes a été mesuré par RT-qPCR (Taqman) entre 1 et 21 jours post. Un contrôle en condition inflammatoire (10 ng.mL⁻¹ TNF- α , 4 h) a également été utilisé. Les résultats obtenus sont présentés en *Figure 33*.

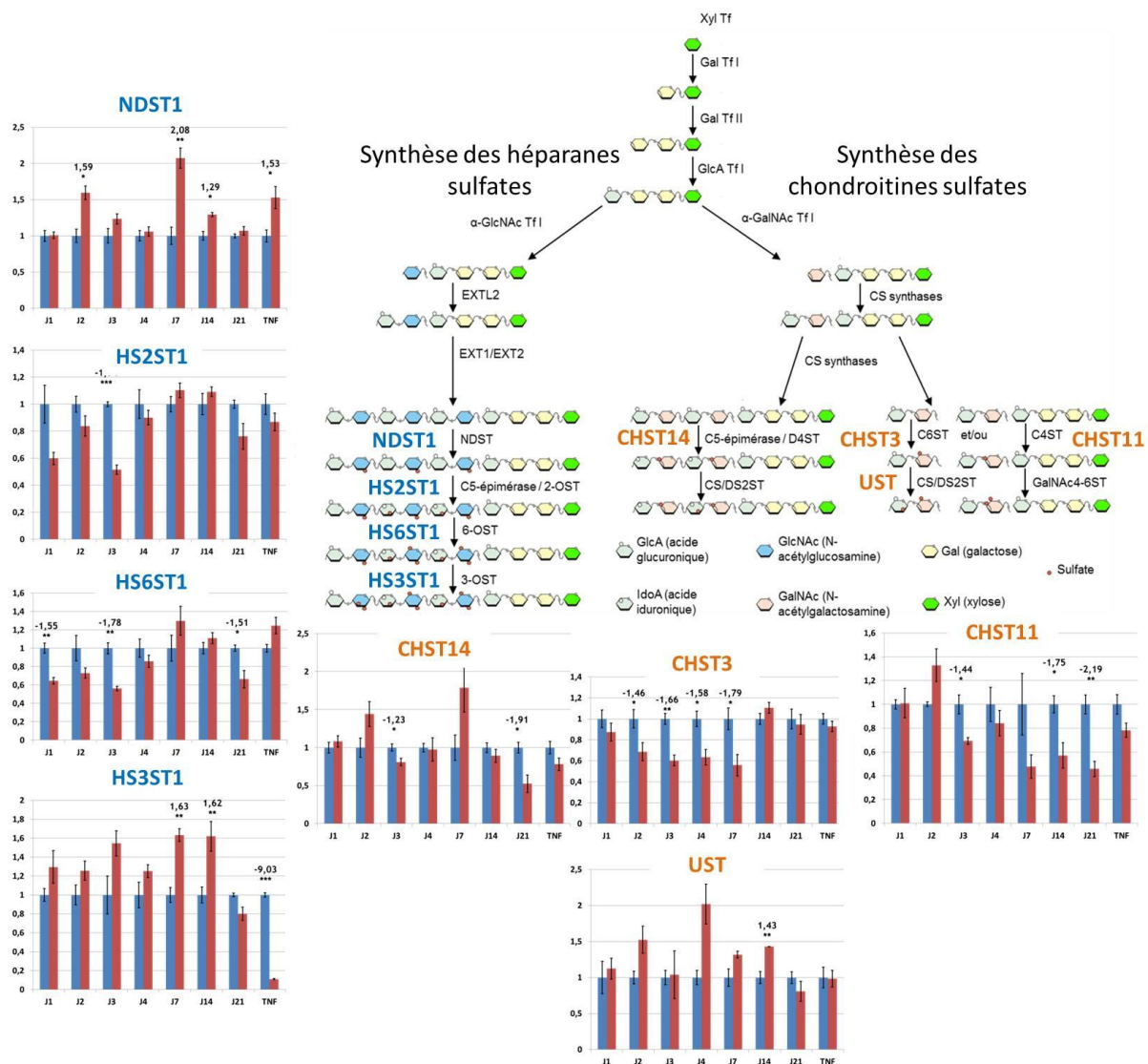


Figure 33 : Facteur d'expression relative (IR/CTRL) des gènes de glycosylation impliqués dans la synthèse des GAGs (moyenne +/- SEM). t-test : *, p < 0,05, **, p < 0,01, ***, p < 0,001. Le rôle dans la voie de biosynthèse des enzymes codées par les gènes mesurés sont indiqués dans le schéma.

II. Profil de glycosylation sur les tissus murins

Nous avons montré que la glycosylation est modifiée *in vitro* dans les HUVECs et que les niveaux d'expression de gènes impliqués dans la glycosylation sont modifiés dans l'intestin irradié. Nous avons ensuite cherché à évaluer le profil de glycosylation de l'endothélium vasculaire intestinal murin suite à une irradiation localisée à forte dose. Des lectines fluorescentes ont été utilisées pour identifier les glycanes à la surface des vaisseaux sanguins *in vivo*. Une dose de 13 Gy (X, 4 MV, 2,5 Gy.min⁻¹) au niveau de l'anse intestinale a été délivrée chez la souris C57BL/6 (voir [annexes VI Modèle murin](#)). Les lectines fluorescentes Concanavaleine A (Con A) et WGA ont été injectées au niveau du sinus rétro-orbital chez la souris sous anesthésie. Après 45 minutes, les souris ont été sacrifiées et les tissus intestinaux prélevés et congelés. Des marquages complémentaires ont été effectués (DAPI pour identifier les noyaux cellulaires et PECAM-1 (CD31) pour identifier les vaisseaux sanguins) sur coupes avant observation au microscope confocal. L'intensité de la fluorescence émise par les marquages lectine reflète la quantité de glycanes identifiés. La quantification du marquage lectine au niveau des vaisseaux informe sur la quantité des glycanes présents. Un exemple d'image utilisée pour la quantification est donné ci-dessous. ([Figure 34](#)). Nous avons utilisé la suite logicielle Icy (<http://icy.bioimageanalysis.org/>) pour quantifier l'intensité des marquages lectines au niveau des capillaires sanguins. Au terme de l'analyse, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence d'intensité de marquage entre les souris témoins et les souris irradiées.

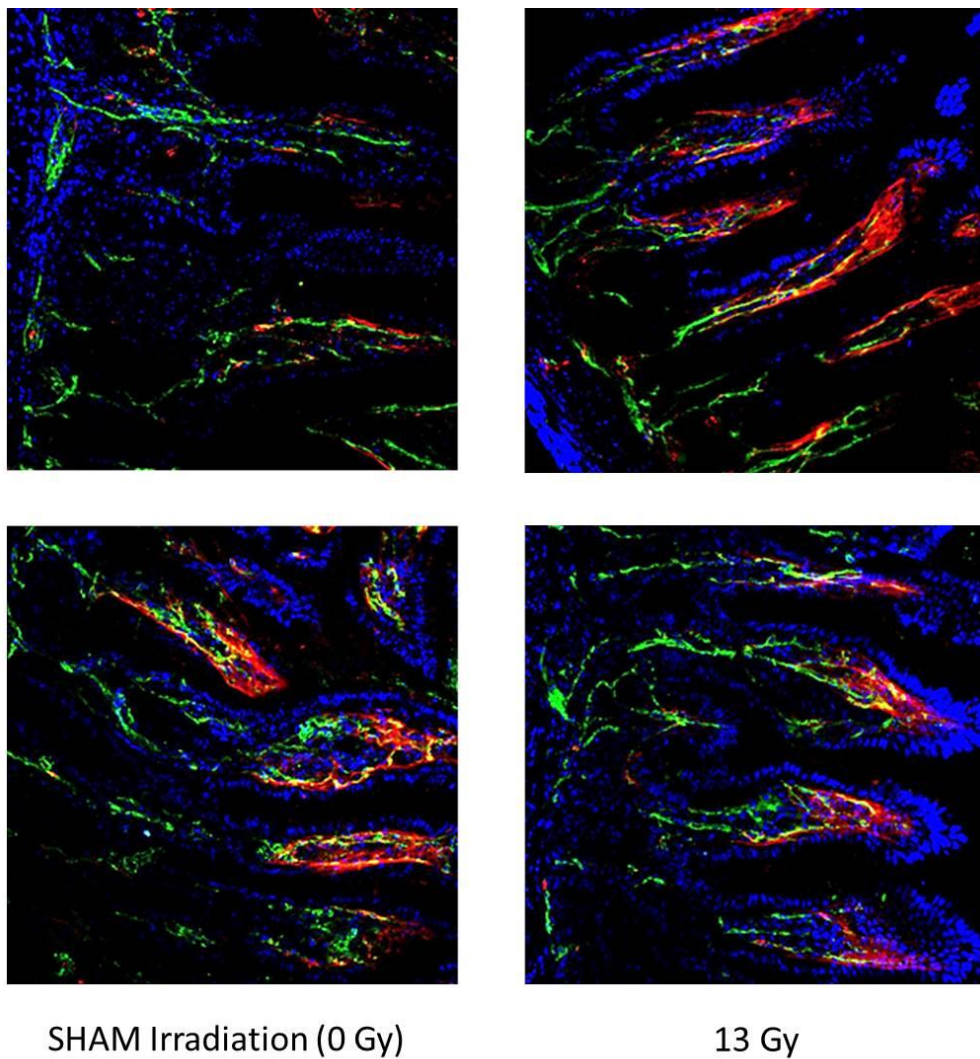


Figure 34 : clichés pour la quantification du marquage vasculaire à la lectine **WGA-FITC** injectée dans le sinus rétro-orbital sur coupes (80µm) d'anse intestinale irradiée chez la souris C57BL/6. Les noyaux sont marqués au **DAPI**. Les CE sont identifiées par marquage **CD31-AlexaFluor568**, les flèches pointent l'endothélium.

III. Profil de glycosylation sur résection de patients traités par radiothérapie

Toujours dans le but d'obtenir une preuve de principe que la glycosylation pouvait être modifiée *in vivo* en réponse à l'irradiation, nous avons ensuite cherché à évaluer le profil de glycosylation de l'endothélium vasculaire dans des tissus digestifs humains. Les tissus utilisés étaient issus de résections chirurgicales de patients traités pour un adénocarcinome du rectum par radiothérapie puis chirurgie cinq semaines après le traitement. Nous disposons ainsi pour chaque patient de tissus sains (marges chirurgicales non irradiées, histologiquement normales) et de tissus lésés non cancéreux. Pour cette étude nous avons sélectionné des patients avec des atteintes sévères ou très sévères. La lectine fluorescente Con A a été utilisée pour identifier les N-glycanes hautement mannosylés à la surface des vaisseaux sanguins. Des marquages complémentaires ont été effectués : DAPI pour identifier les noyaux et PECAM-1 (CD31) pour identifier l'endothélium. Les tissus ont été observés en microscopie confocale. La quantification du marquage lectine au niveau des vaisseaux informe sur la quantité des glycanes présents. Un exemple d'image utilisée pour la quantification est donné ci-dessous ([Figure 35](#)). Nous observons que le marquage Con A couplée Rhodamine (en rouge sur les photos), n'est pas spécifique de l'endothélium. Cependant le marquage est intense au niveau de l'endothélium et co-localise avec le marquage CD31. L'intensité de la fluorescence émise par le marquage lectine reflète la quantité de glycanes identifiés. Nous avons utilisé le logiciel Imaris pour quantifier l'intensité du marquage Con A au niveau de l'endothélium dans les vaisseaux. Dans un premier temps, un détourage par le marquage CD31 (en vert sur les images) a été effectué. Il permet d'obtenir un volume endothélial. Par la suite, l'intensité de fluorescence émise par le marquage Con A a été mesurée dans le volume endothélial. Les premières analyses n'ont pas permis de mettre en évidence de différence d'intensité de marquage entre les tissus lésés et sains. Cependant, l'analyse n'a pas pu être achevée par manque de temps. L'analyse d'un nombre suffisant d'échantillons pourrait permettre de conclure sur l'existence ou non d'une modification endothéliale de la glycosylation *in vivo* chez l'Humain.

Résection saine

Résection avec atteinte très sévère

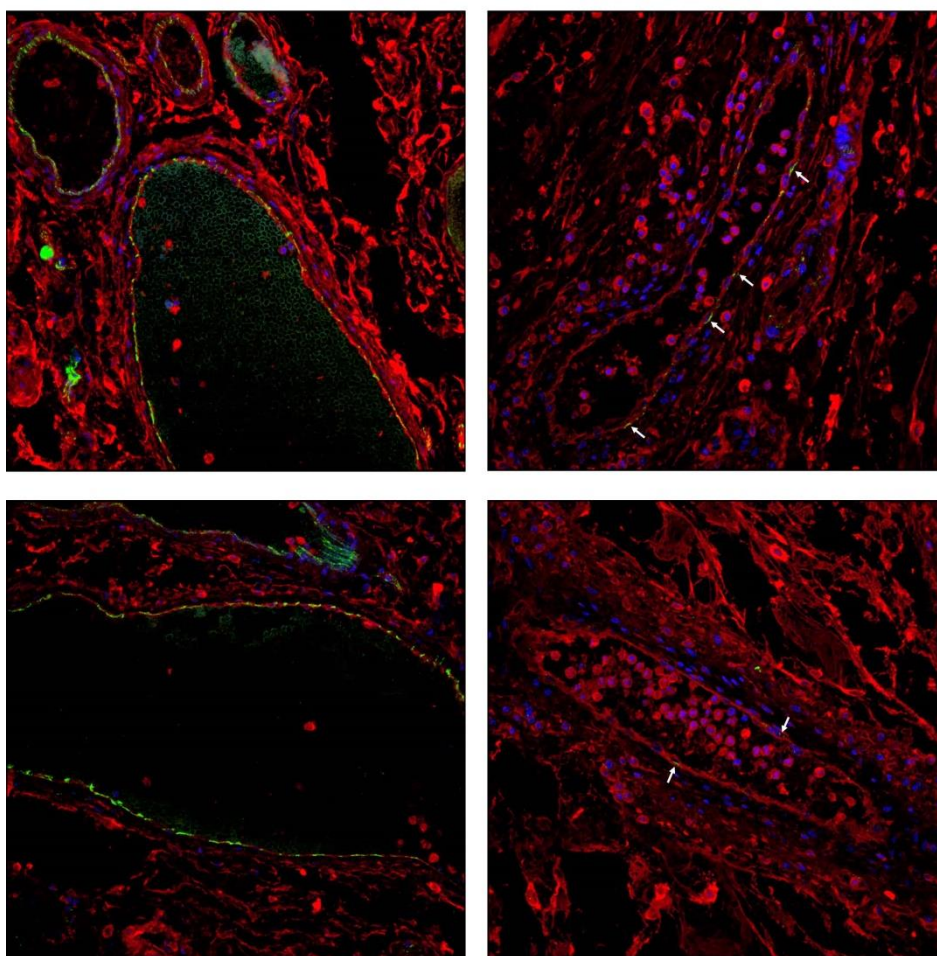


Figure 35 : clichés pour la quantification du marquage vasculaire à la lectine **Con A-rhodamine** sur coupes humaines de rectum. Les noyaux sont marqués au **DAPI**. Les cellules endothéliales sont identifiées par marquage **CD31-AlexaFluor568**, les flèches pointent l'endothélium.

Discussion

I. L'irradiation provoque une modification du profil de glycosylation

Les résultats présentés dans cette thèse apportent de nouveaux éléments sur les interactions monocyte/endothélium induites par l'irradiation. Les N-glycanes hautement mannosylés mais aussi d'autres glycanes radio-induits pourraient agir comme ligand dans l'adhésion des monocytes. L'irradiation induit une surexpression des N-glycanes hautement mannosylés et des O-glycanes. Elle induit aussi une diminution de la quantité de GAGs. Enfin, elle exacerbe l'adhésion des monocytes en condition dynamique.

Les analyses transcriptomiques montrent que l'irradiation modifie le profil d'expression des gènes codant pour les enzymes de glycosylation, tant in vitro (modèle HUVECs) qu'in vivo dans les tissus intestinaux de souris irradiées. Ces analyses sont en accord avec l'observation directe des glycanes. Les modifications transcriptomiques constatées expliquent en partie les modifications glycaniques observées. En effet, les variations de glycosylation sont principalement contrôlées au niveau transcriptionnel^{205,206}. Les réseaux de relations établis in silico entre les différents gènes différenciellement exprimés après irradiation montrent l'importance de ces gènes dans les processus d'adhésion cellulaire. De plus les relations établies entre les principaux médiateurs radio-induits et les gènes de glycosylations mesurés, apportent des pistes pour envisager par quels mécanismes l'irradiation induit une modification du glycome. En effet, plusieurs liens directs sont établis entre les protéines radio-induites et les gènes de glycosylation modulés. Ensemble, nos résultats montrent que la modification dynamique de la glycosylation est un processus essentiel de la régulation de l'adhésion radio-induite.

I.A. Modifications du N-glycome

Chez les HUVECs, les données obtenues par RT-qPCR, marquage à la Con A et spectrométrie de masse ont permis de mettre en évidence trois phénomènes en partie interdépendants dans la synthèse des N-glycanes.

I.A.1. Augmentation des N-glycanes oligomannose

Suite à l'irradiation, on remarque une augmentation des motifs N-glycaniques hautement mannosylés et hybrides. Comme l'atteste par le marquage Con A ([article figure 1](#)). Les données de spectrométrie de masse confirment une augmentation des motifs hautement mannosylés significative à partir de 7 jours post-irradiation ([article figure 2](#)). Cette augmentation est en accord avec les données de RT-qPCR montrant une diminution de l'expression du gène Man1c1 qui code

pour une mannosidase I (*article figure 6 + figure supplémentaire 8*). En effet, une diminution des mannosidases I ralentit le *trimming* des N-glycanes et empêche la transformation des structures hautement mannosylées en structures hybrides puis complexes. Les données de RT-qPCR et de spectrométrie de masse ne permettent pas en revanche d'en apprendre plus sur l'influence de l'irradiation sur les structures hybrides. On observe uniquement une diminution de l'expression du gène B4galt5 qui code pour une enzyme permettant l'allongement de la première antenne. En revanche, les données de spectrométrie ne valident la présence d'aucune structure hybride. Il est probable que la plupart des N-glycanes hybrides soient rapidement transformés en N-glycanes complexes.

L'irradiation provoque une augmentation de la N-glycosylation de type hautement mannosylé. Ce phénomène, jamais décrit après irradiation, présente des similitudes avec les données de la littérature dans un contexte inflammatoire aiguë et chronique. En effet, une exposition des HUVECs au TNF- α pendant 4 ou 24 h provoque une augmentation membranaire de la quantité ou de la proportion de N-glycanes hautement mannosylés^{212,236}. Ce phénomène a aussi été identifié en contexte tumoral²⁸⁷. L'augmentation de la N-glycosylation est également retrouvée en contexte inflammatoire chronique chez des HAECs soumises à un stress oscillatoire pro-athérogène, mais aussi *in vivo* dans les lésions athérosclérotiques chez des souris ApoE^{-/-} et sur des artères coronariennes humaines²³⁰. L'augmentation des motifs hautement mannosylés semble avoir pour origine une diminution de l'expression des gènes codant pour des mannosidases I. En effet, une diminution de l'activité des mannosidases I et/ou une baisse de l'expression de leurs gènes sont constatées en contexte inflammatoire^{230,236}, et notamment dans les artères de rats diabétiques³⁷⁵.

1.A.2. Effets sur le catabolisme des N-glycanes

La dégradation des N-glycanes pourrait être augmentée après irradiation. En effet, l'analyse transcriptomique met en évidence l'augmentation significative de Gnptab et Fuca1. Ces gènes codent pour des enzymes impliquées dans l'orientation et la dégradation des N-glycanes vers le lysosome. GNPTAB est une sous-unité du complexe GlcNAc-1-phosphotransférase, responsable de la phosphorylation des mannoses et de l'adressage des N-glycanes au lysosome via la voie des mannose-6-phosphates^{241,376}. FUCA1 est responsable de la dégradation lysosomale des groupements fucosylés liés aux N- ou aux O-glycanes (*article figure supplémentaire 8*). Son augmentation, sans être spécifique des N-glycanes, est liée à une activité lysosomale plus importante. En plus du ralentissement de la chaîne de synthèse, une partie des N-glycanes pourrait donc être dégradée. L'augmentation de la dégradation lysosomale pourrait être le reflet d'un stress du Golgi. En effet, les RI ont directement été reliés au stress Golgien et à une surexpression membranaire du marquage Con A³⁷⁷. De même, les lésions radio-induites à l'ADN conduisent à une réorganisation Golgienne.

Cette réorganisation passe par l'activation de la voie DNA-PK en jeu dans la réparation de dommages radio-induits à l'ADN³⁷⁸.

1.A.3. Modification du branchement et diminution des complexes

L'irradiation provoque une importante modification de l'expression des gènes codant pour les enzymes responsables de la création des antennes : l'expression de Mgat4a est diminuée, tandis que celles de Mgat4c et Mgat5b sont augmentées. Cependant, les N-glycanes complexes marqués par les lectines PHA-L et UEA-1 (*article figure 3*) et identifiés par spectrométrie de masse (*article figure 2*) sont diminués après irradiation. La PHA-L reconnaît spécifiquement les antennes β 1-2 et β 1-6 pourvues d'un galactose en β 4 sur la branche α 6Man des N-glycanes. Quant à UEA-1, elle identifie indifféremment les fucoses des antennes des mannoses α 3 ou α 6. D'une part, l'antenne β 1-6 est susceptible d'être augmentée suite à la surexpression de Mgat5b. D'autre part, aucune diminution de Mgat1, qui code pour une enzyme qui permet l'ajout de l'antenne β 1-2, n'a été constatée. On aurait donc pu s'attendre une augmentation du marquage PHA-L. Aucun gène des enzymes de fucosylation n'est différenciellement exprimé, alors que le marquage UEA-1 diminue. De plus, l'augmentation de Mgat4c prédispose elle aussi à la création de structures complexes.

Deux mécanismes peuvent être avancés pour expliquer la diminution des motifs complexes. Premièrement, la chaîne de synthèse des N-glycanes est un processus en série. Nous avons vu que les enzymes responsables du *trimming* sont potentiellement diminuées, et que les glycanes oligomannosidiques sont augmentés. On peut penser que la chaîne de synthèse reste bloquée dans les premières étapes. Le blocage de la synthèse en amont, combinée à une potentielle augmentation de la dégradation, diminuerait les substrats disponibles pour la synthèse des N-glycanes complexes en aval. L'augmentation des N-glycanes hautement mannosylés aurait donc lieu au détriment de la synthèse des glycanes complexes. Deuxièmement, la variabilité importante des niveaux d'expression des GlcNAc-transférases est connue pour avoir des conséquences sur la poursuite de la chaîne de synthèse^{224,229}. En effet, le N-glycane bi-antenné obtenu après l'étape 14 (*Figure 30*) est au cœur d'une compétition importante entre les GlcNAc-transférases. L'ajout de l'antenne β 4 sur le α 3Man pourra être modulé par la transcription contradictoire des Mgat4a (augmentée) et Mgat4c (diminuée). Cependant, il semble que cette étape soit dominée par l'action de Mgat4a dont la diminution pourrait être déterminante^{379,380}. Les antennes β 1-4 et β 1-6 sur le α 6Man sont probablement augmentées suite à la surexpression de Mgat4c et Mgat5b, respectivement. Il ne semble pas y avoir de modification de l'expression de Mgat3, dont l'enzyme catalyse l'ajout d'une antenne sur le mannose central appelé *bisecting* GlcNAc, et peut bloquer l'ajout des autres branches (voir *partie III.A.2.a.i Synthèse des N-glycanes*).

Les N-glycanes complexes semblent sous-exprimés, cependant les gènes codant pour la création des antennes sont modulés par l'irradiation. La multiplication des branches est un facteur important dans la régulation des taux membranaires des glycoprotéines. Plus le branchement est important, plus les interactions extracellulaires, notamment avec les galectines, et l'expression membranaire sont prolongées. Le nombre de N-glycanes sur la protéine conditionne aussi son expression et sa dépendance vis-à-vis de la voie des hexosamines³⁸¹. La diminution de l'antennation, notamment celle ajoutée par la MGAT5, induit des phénomènes pro-inflammatoires^{353,382}. Cette diminution est impliquée dans l'auto-immunité des lymphocytes T dans la sclérose en plaque^{235,383,384}. Dans les leucocytes, l'activation du TCR dépend du branchement via MGAT5. La perte du branchement déclenche une hypersensibilité immune, reliée à des mécanismes auto-immuns²⁰⁰. A l'inverse, l'augmentation du branchement et la diminution des structures oligomannosidiques ont un effet protecteur vis à vis de l'inflammation et des phénomènes auto-immun^{235,353,385}. L'augmentation des antennes a pu être observée chez les HUVECs et dans une lignée immortalisée de cellules microvasculaires en réponse au TNF- α ²⁸⁵. D'autre part, cette antennation est retrouvée sur les cellules cancéreuses et notamment métastatiques³⁸⁶⁻³⁹⁰. Dans ce cas, l'antennation semble être un mécanisme important utilisé par les cellules cancéreuses dans la croissance et pour échapper aux cellules immunitaires^{200,391}.

Nos résultats montrent clairement que l'irradiation provoque un changement de la N-glycosylation endothéliale (*article figures 1-3*). Cette modification du N-glycome présente des points de ressemblance avec les phénotypes observés chez les CE en contexte inflammatoire. En condition physiologique, la plupart des N-glycanes présentent une structure complexe, ce qui participe à leur maintien membranaire par interaction avec les galectines^{230,231}. A l'inverse, la dysfonction de la synthèse des N-glycanes mène à de nombreuses pathologies de nature auto-immune^{353,361,383,392}. Dans notre étude, ces changements pourraient être dus à un déséquilibre de synthèse. Les N-glycanes de type oligomannose seraient préférentiellement synthétisés, et le branchement pourrait être modifié. Ces deux phénomènes sont clairement impliqués dans des phénomènes inflammatoires et auto-immuns. Ils pourraient influencer le recrutement des cellules circulantes.

I.B. Modification du O-glycome

I.B.1. Augmentation de la O-glycosylation

La O-glycosylation des HUVECs a été évaluée par analyse transcriptomique ciblée (*article figure 6*) et marquage lectinique (*article figure 7*). Les résultats montrent que l'irradiation provoque l'augmentation durable des O-glycanes. En effet, l'expression de gènes codant pour des GalNAc-transférases (Galnt2, Galnt9, Galnt12, Galnt14 Galnt11, Galnt16) responsables de l'addition du

premier GalNAc sur le résidu Ser/Thr est augmentée. Un marquage avec la lectine VVL, qui reconnaît spécifiquement cet épitope, n'a pas été concluant pour des raisons techniques (résultat non montré). Cependant, l'augmentation à partir de J14 du marquage à la jacaline, qui reconnaît spécifiquement les O-glycanes, est en accord avec les résultats d'expression des gènes. Si le marquage par cette lectine n'augmente pas à des temps plus précoces, cela ne signifie pas pour autant que l'augmentation de la O-glycosylation n'a pas lieu. En effet, seuls certains O-glycanes, notamment les cores 1 et 2, sont reconnus par la jacaline (voir [Figure 31](#)). On ne note pas d'augmentation particulière des transcrits codant pour les enzymes de synthèse des cores 1 ou 3. Cependant, une diminution de l'expression de *Gcnt1* pourrait être responsable d'une diminution de l'expression du core 6. Parmi les 3 gènes codant pour les enzymes responsables du passage des cores 1 aux cores 2 (n°9) ([Figure 31](#)), deux sont augmentés, dont *Gcnt 4* qui signe la plus forte augmentation de gène de l'étude (> 16 x) (voir [article figure supplémentaire 8](#)). D'après les données transcriptomiques, il semble donc que l'irradiation puisse influencer positivement la synthèse des cores 2, ce qui est cohérent avec l'augmentation du marquage par la jacaline. D'autre part, l'augmentation de l'expression de *Gcnt3* pourrait également augmenter l'expression des cores 4.

En contexte inflammatoire, le TNF- α induit rapidement l'expression des N-glycanes hautement mannosylés chez les HUVECs (dès 4 h). En revanche, la O-glycosylation, comme l'atteste des marquages par la VVL et la jacaline, ne semblent pas modifiée après 4 h²³⁶. Suite à 24 h d'exposition au TNF- α , les HUVECs surexpriment des O-glycanes, notamment les cores 1, mais sans augmentation des cores 2²¹². Dans une étude utilisant des CE de rétines exposées à du sérum de patients diabétiques, l'augmentation des cores 2 a été constatée. La présence de TNF- α dans le sérum augmente l'activité des GlcNAc-transférases par phosphorylation PKC β 2-dépendante. L'expression augmentée des cores 2 augmente l'adhésion de la lignée monocyttaire U936 sur les CE en condition statique³⁹³. De manière générale, les cores 1 et 2 sont classiquement augmentés en contexte inflammatoire *in vitro*³⁹⁴ et *in vivo*²⁹². En effet, les core 2 représentent les principaux supports du motif sLe^x. Ils sont notamment reconnus par les sélectines leucocytaires dans les veinules lymphatiques^{283,395}.

Les glycanes sialylés en α 2-3 et α 2-6 ont été marqués respectivement par Mal-II et SNA ([article figure 7](#)). Ces motifs sialylés augmentent après irradiation. Cette fois-ci, peu de données transcriptomiques viennent étayer cette augmentation. La sialylation intervient dans les processus de *capping* et est partagée par les N- et les O-glycanes. Cependant, on a vu précédemment qu'en réponse à l'irradiation, la synthèse des N-glycanes était orientée vers une surexpression des N-glycanes hautement mannosylés au détriment des glycanes complexes. Il existe donc peu de N-glycanes complexes possédant des branches susceptibles de subir une sialylation. D'autre part, l'irradiation

provoque une augmentation de l'expression des O-glycanes. Il existe donc plus de substrats O-glycaniques que de substrats N-glycaniques pouvant subir une sialylation. Comme la sialylation est elle aussi augmentée, on peut penser qu'elle est principalement portée par les O-glycanes. On peut donc supposer que l'irradiation provoque une augmentation de la O-glycosylation, notamment des cores 2, et que les O-glycanes produits portent des terminaisons sialylées.

I.C. Capping

I.C.1. Voie des polylactosamines

En ce qui concerne le *capping*, l'analyse transcriptomique semble montrer une orientation vers la voie des polylactosamines (*Figure 32*) via l'augmentation de l'expression de Gcnt3, Gcnt4 et B3gnt2 (*article figure 6*). Cependant, l'expression de B4galt5 est diminuée après irradiation. Le groupe des B4galt est plutôt connu pour sa surexpression dans les phénomènes inflammatoires. Par exemple, B4galt1, B4galt5, et B4galt6 sont augmentées chez les HUVECs après exposition au TNF- α ^{212,281,285}. L'augmentation de B4galt1 est permise par la stabilisation de ses ARNm²⁸¹. L'élongation par les β 1-4 Gal-transférases permet la synthèse d'épitopes portés notamment par ICAM-1 et ICAM-2, et reconnus par les leucocytes. En effet, la multiplication des motifs lactosaminiques fournit le squelette des structures multi-fucosylées et multi-sialylées. Ces dernières sont donc propices à la création de structures ramifiées portant plusieurs motifs Lewis X (type poly-Lewis X). Ces structures sont des ligands de la L-sélectine montrant une grande réactivité avec les leucocytes. Sous forme soluble, elles sont capables d'inhiber le *homing* leucocytaire dans des réponses immunitaires de type rejet de greffe^{396,397}.

I.C.2. Augmentation de la sialylation

I.C.2.a. α 2-3 sialylation et motifs Lewis X

Les structures issues de la voie polylactosamine peuvent être terminées par des sialylations en α 2-3 reconnues par Mal-II. Les motifs Lewis possèdent également cette terminaison. Les concernant, il est difficile de trancher : l'expression des gènes orientant leur synthèse est autant augmentée que diminuée. Il en est de même pour les marquages aux lectines : le marquage UEA-1, qui reconnaît la fucosylation en α 1-2, est diminué tandis que la sialylation en α 2-3, marquée par la Mal-II, est augmentée.

Dans l'endothélium irradié, plusieurs signaux sont capables d'influencer la sialylation et peuvent s'opposer. L'exposition au TNF- α peut induire une diminution de l' α 2-3 sialylation³⁹⁸. Cependant, d'autres études montrent d'une part une diminution de l'expression du gène St3Gal1, et paradoxalement une augmentation du marquage Mal-II associée à une franche augmentation des

motifs Lewis X²⁸⁵. Les signaux pro-angiogéniques comme le VEGF induisent quant à eux une augmentation de l'α2-3 sialylation²⁸⁵. Le TGF-β influence aussi la 2-3 sialylation mais les études sont contradictoires : en effet, elle semble augmenter dans les CE³⁹⁸, mais est diminuée dans les synoviocytes³⁹⁴.

La sialylation est particulièrement importante dans l'immunité car elle est nécessaire à la création du motif sLe^x, ligand des sélectines²⁰⁰. En contexte inflammatoire, les motifs Le^x sont augmentés sur les CE²⁹². Chez la souris, une déficience en ST3Gal4 affecte la synthèse des motifs et induit une diminution du recrutement leucocytaire³⁹⁹⁻⁴⁰¹. On peut penser que l'augmentation radio-induite de l'α2-3-sialylation pourrait agir dans le sens de la surexpression de motif sLe^x. Dans le cancer, la sialylation et notamment l'α2-3 sialylation²⁸⁷ est augmentée, tout comme la fucosylation³⁶⁵. Il est suggéré que dans le cas du cancer, un défaut de maturation normal des motifs sialylés pourrait entraîner l'apparition de motifs pathologiques⁴⁰² (voir [Figure 36](#)). Cela pourrait être une hypothèse intéressante dans le cas des CE irradiés.

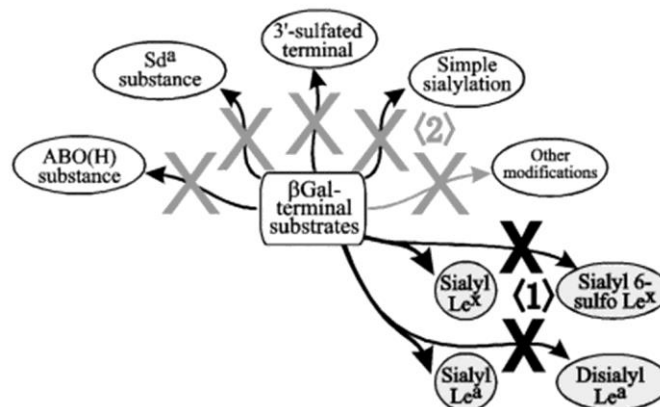


Figure 36 : illustration de mécanismes conduisant à une synthèse glycanique incomplète dans le cancer (d'après Kannagi et al.⁴⁰²).

I.C.2.b. Sialylation en α2-6

Chez les N-glycanes, la sialylation en α2-6 complète les antennes. Chez les O-glycanes, elle participe à l'élongation de l'antigène Tn des cores 1, 2, 3 et 4. Le marquage SNA montre clairement l'augmentation membranaire de ces motifs ([article figure 7](#)), mais est en contradiction avec les résultats de la transcriptomique, où on observe une diminution de St6galnac1 et St6gal1 ([article figure 6](#)).

La sialylation en α2-6 est augmentée en contexte inflammatoire⁴⁰³. Dans le sérum, elle est vraisemblablement due à une augmentation des α2-6 sialyltransférases hépatiques⁴⁰⁴⁻⁴⁰⁶. Chez la souris, des travaux précédemment menés au laboratoire ont montré que la lésion radique induit également une réaction hépatique conduisant notamment à une N-sialylation plus importante des

protéines du sérum³⁷². A l'échelle tissulaire, dans les synoviocytes bovins exposés au TNF- α , une augmentation de l'activité de l' α 2-6-sialyltransférase est observée, mais elle est diminuée par le TGF- β . L'augmentation de l' α 2-6 sialylation est observée sur les CE après exposition au TNF- α ^{212,285}, à l'IL-1 ou au LPS²⁸⁰. Elle provoque une augmentation de l'adhésion des lymphocytes B sur l'endothélium, par reconnaissance des motifs α 2-6 par le CD22 (Siglec 2) lymphocytaire²⁸⁰. Comme l'irradiation induit une augmentation de ces motifs, il pourrait exister des conséquences fonctionnelles sur le recrutement des leucocytes, voire des lymphocytes B.

I.C.2.c. Poly-sialylation

On remarque une modulation des gènes de la sialylation en α 2-8 (St8sia2,4,6) ([article figure 6 + Figure 32](#)). St8sia6, dont le gène est diminué, a pour substrat préférentiel les O-glycanes et les glycolipides. Tandis que ST8SIA2 et 4, dont les gènes sont respectivement augmenté et diminué, modifient préférentiellement les N-glycanes^{208,407-409}. En l'absence de marquage spécifique, la modulation de l'expression des extrémités sialylées en α 2-8 est difficile à interpréter. Un marquage avec un anticorps spécifique comme le mAb.2-4B⁴⁰⁴ pourrait permettre d'éclaircir ce résultat. La poly-sialylation est couramment observée dans les cancers et particulièrement dans les tumeurs avancées (*high grade*). La poly-sialylation de NCAM-1 est associée à des tumeurs agressives^{365,410,411}. En effet, elle bloque le recrutement leucocytaire, ce qui pourrait expliquer l'agressivité tumorale⁴¹². La polysialylation observée chez les HUVECs pourrait donc avoir un effet inhibiteur dans le recrutement leucocytaire. Cependant, contrairement à ce que suggèrent nos résultats, l'expression de la forme sialylée de NCAM est diminuée après une exposition de 2,5 Gy localisée au cerveau par ions lourds (⁵⁶Fe)⁴¹³.

I.C.3. O-glycanes non GalNAc

Concernant les O-glycanes dont le premier sucre n'est pas une GlcNAc (appelés O-glycanes non GalNAc), seuls 4 gènes sont modifiés (St6gal1, Mgat5b, Fut11 et Ogt) et aucune voie de synthèse ne semble particulièrement touchée suite à l'irradiation. On note tout de même la diminution du gène codant pour OGT (O-GalNAc-transférase) qui peut facilement avoir des conséquences, car cette enzyme agit en coopération ou en compétition avec des kinases pour la régulation de multiples mécanismes⁴¹⁴. Enfin, très peu de modifications affectent les gènes des voies de synthèse des glycolipides. Ces voies étant peu modifiées et étudiées seulement par RT-qPCR, on trouvera les voies de synthèse annotées dans la section [Annexes II.A O-glycanes de types non GalNAc](#).

I.D. Modification du glycocalyx

I.D.1. Quantification des GAGs

Nous avons dosé les GAGs présents chez les HUVECS grâce à une quantification de l'acide uronique par le carbazole ([article figure 4](#)). La tendance générale est une diminution de la quantité de GAGs après exposition, visible à partir de 2 jours et maintenue pendant toute la cinétique. Cette diminution est significative 4 et 7 jours après irradiation. Dans cette expérience, le TNF- α a été utilisé comme contrôle positif de dégradation des GAGs. Plusieurs études sur les CE ont démontré une diminution de la quantité de GAGs en réponse aux stimuli pro-inflammatoires IL-1 α , IL-1 β ou TNF- α , ou en présence de cellules inflammatoires comme les neutrophiles^{398,415,416}.

C'est à notre connaissance la première fois que la diminution de l'expression des GAGs endothéliaux est démontrée après irradiation. Ce résultat est cohérent avec le phénotype pro-inflammatoire radio-induit. La diminution des GAGs pourrait être le fait d'une diminution de la synthèse ou d'une augmentation de la dégradation. Le TGF- β , induit par les RI⁴¹⁷, pourrait jouer un rôle dans la régulation de la synthèse des GAGs⁴¹⁸, notamment dans les CE où il influence la synthèse en synergie avec le TNF- α ³⁹⁸. Nous avons mesuré l'expression des gènes codant pour les enzymes responsables de la synthèse des GAGs (voir la [partie Etude transcriptomique des gènes codant pour les enzymes impliqués dans la synthèse des GAGs](#) page 165). Les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des HS (Ndst1, Hs2st1, Hs3st1, Hs3st5) sont relativement augmentés et particulièrement aux temps tardifs après irradiation, sauf dans le cas de Hs6st1, qui lui est clairement diminué aux temps tardifs et précoces ([Figure 33](#)). Concernant les CS, on observe une diminution de l'expression des gènes assez marquée dans le temps pour Chst3 et Chst11, et un peu moins pour Chst14. Il y a donc une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des enzymes responsables de la synthèse des CS, à l'exception d'Ust qui semble relativement augmentée vers la fin du temps précoce, sans que le phénomène ne soit maintenu dans le temps. Au vu de ces résultats, la part relative des HS et CS pourrait varier après irradiation dans le sens d'une diminution des CS et d'une augmentation des HS. Nous avons effectivement tenté, en plus du dosage de GAGs, de doser les HS et CS, mais cette expérience n'a pas été concluante. En globalité, et malgré l'expression différentielle de certains gènes, on ne peut pas conclure à une diminution de la synthèse des GAGs.

I.D.2. Existence d'un shedding radio-induit ?

Si la synthèse n'est pas diminuée, il est alors possible que la dégradation soit augmentée. Un moyen de le vérifier est de mesurer dans le milieu de culture ou dans le sang des souris irradiées localement la présence d'enzymes de dégradation comme les kératanases, hyaluronidases, héparanases ou MMP. Un autre moyen consiste à mesurer la présence de GAGs dans le milieu de culture ou dans le

sang pour attester de leur dégradation⁴¹⁵. En raison de l'état pro-inflammatoire et pro-thrombotique des CE après irradiation, l'hypothèse d'une augmentation de la dégradation apparaît comme la plus crédible. On a vu en [partie IV.A.2](#) que le glycocalyx était très sensible aux stimuli inflammatoires⁴¹⁹. La diminution des GAGs pourrait être le résultat d'un *shedding* des protéoglycanes membranaires du glycocalyx. Plusieurs éléments du phénotype des CE nous poussent à poser cette hypothèse. Deux modes de dégradation des GAGs ou des protéoglycanes sont envisagés. D'une part, une dégradation non enzymatique due aux effets physico-chimiques de l'irradiation et au stress oxydant maintenus après irradiation. D'autre part, une dégradation enzymatique due à l'action de glycosidases ou de *sheddases* radio-induites.

La dégradation non enzymatique des GAGs est principalement due aux radicaux hydroxyles (OH^\bullet) et carbonate ($\text{CO}_3^{\bullet-}$)⁴²⁰. Des études biochimiques montrent d'ailleurs que l'irradiation de GAGs à très fortes dose (25-1000Gy) en milieu aqueux engendre une dégradation non enzymatique de l'héparine, de l'HA et des CS^{421,422}. On a vu que l'irradiation provoque une libération importante de ROS et de RNS tout d'abord par radiolyse de l'eau, puis par activation des cytokines inflammatoires (voir [partie IV.A.2.a](#)). Les radicaux libres produits peuvent induire la dégradation des GAGs. L' H_2O_2 par exemple peut induire la dégradation des HS et du glycocalyx *in vitro*³⁰¹. Les RI provoquent au niveau endothélial, une activation de iNOS⁴²³ et eNOS¹³⁴. Ces enzymes permettent une augmentation de la synthèse de NO^\bullet et $\text{O}_2^{\bullet-}$. Leur présence induit la synthèse d' OH^\bullet et de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ capables d'entraîner la dégradation ou la modification chimique des GAGs⁴²⁰.

La dégradation enzymatique des GAGs ou des protéoglycanes est une hypothèse particulièrement intéressante chez les CE irradiées. En effet, la coagulation et l'inflammation induisent des processus tous deux capables de provoquer le *shedding*. Les RI peuvent directement, ou indirectement via les cytokines⁴²⁴ (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8) et les ROS^{301,425}, induire une surproduction de MMP-1, MMP-2, et MMP-9⁴²⁶⁻⁴²⁹. Les MMPs font partie des *sheddases*³⁰² : ainsi MMP-2 et MMP-9 ont été directement reliées à une digestion des protéoglycanes portant des CS (syndécans 1 et 3), et MMP-1 à l'hydrolyse des syndécan-1-4 portant les HS⁴³⁰⁻⁴³². Le stockage vésiculaire de MMP-2 et MMP-9 ou de leurs formes proactives (pro-MMP) a été démontré dans les CE⁴³³, il permet un *shedding* rapide sans synthèse *de novo*. De précédents travaux du laboratoire ont démontré l'importance de PAI-1 dans l'endothélium après irradiation¹⁵⁴. PAI-1 contrôle la balance plasminogène/plasmine⁴³⁴. Or la plasmine agit sur la transformation des pro-MMP en MMP. Son rôle est connu dans la dégradation de la MEC endothéliale^{435,436}, notamment après irradiation¹⁰⁷. L'irradiation provoque une augmentation plasmatique et tissulaire (moelle osseuse) de la plasmine chez la souris⁴³⁷. Il est donc suggéré que la plasmine pourrait jouer un rôle dans le *shedding* du glycocalyx^{438,439} et dans notre cas dans le *shedding* radio-induit. PAI-1 est une N-glycoprotéine, son activité est modulée par les motifs

présents sur ces 3 sites de N-glycosylation⁴⁴⁰. L'irradiation pourrait moduler la glycosylation de PAI-1 et moduler la balance plasminogène/plasmine. D'autre part, l'irradiation provoque une diminution de la production endothéliale de thrombomoduline, ce qui augmente la formation endothéliale de thrombine^{152,441}. Or, la thrombine pourrait jouer un rôle de *shedase*^{438,439,442}. Son rôle est d'autant plus révélateur que plusieurs études ont montré un effet protecteur de l'antithrombine sur le *shedding* du glycocalyx^{419,443-445}. Cependant, la capacité des HS à porter l'antithrombine III pourrait expliquer son rôle protecteur vis à vis des *shedases*, ce qui remet en cause la dégradation par la thrombine⁴³⁹. Enfin, la libération des MMP est couramment accompagnée de l'expression de leurs inhibiteurs spécifiques : les TIMP (*Tissue inhibitor of metalloproteinase*). La mesure de la balance MMP-TIMP permet de rendre compte de la dégradation ou de la protection des matrices. Il serait donc intéressant d'étudier cet équilibre pour caractériser au mieux le *shedding*.

Dans la lésion radio-induite, la chronicité de l'état pro-inflammatoire et pro-thrombotique est maintenue par un cycle cytokine-ROS/RNS. Cette configuration est tout à fait propice au maintien du *shedding*. Le recrutement des cellules inflammatoires au niveau de l'endothélium exacerbe la réaction. En effet, les cellules immunitaires relarguent des cytokines, des MMPs telles que l'élastase⁴⁴⁶ et d'autres *shedases*, l'histamine²⁹⁵ et l'héparanase^{447,448}. Cette dernière semble être induite par les RT *in vivo*⁴⁴⁹. D'autre part, la libération de MPO (par les neutrophiles notamment), permet la synthèse de HOCl, un autre agent responsable du *shedding* non enzymatique des GAGs. Dans un tissu complet, l'hypoxie radio-induite est susceptible de provoquer des phénomènes similaires à ceux induits par l'ischémie-reperfusion où l'anoxie tissulaire promeut la génération des ROS⁴²⁰. Enfin, l'angiogenèse est par nature génératrice de MMPs. Comme l'irradiation induit des signaux pro-angiogéniques aux temps tardifs, les facteurs pro-angiogéniques, combinés à l'hypoxie et aux ROS, pourraient participer à la chronicité du *shedding*.

D'autre part, l'irradiation provoque la dégradation de la membrane basale^{106,450}, formée de protéoglycanes. La diminution de la quantité de GAGs pourrait aussi refléter cette diminution de la membrane basale.

I.D.3. Observation direct du shedding

Nous avons tenté de mettre en évidence une modification du glycocalyx par observation directe en microscopie électronique à transmission (MET) dans les modèles HUVECs et murin. Le marquage des sucres par le rouge de ruthénium ou le bleu alcian n'a pas permis d'observer clairement le glycocalyx autant chez les HUVECs que chez la souris (résultats non montrés). Comme nous l'avons évoqué en introduction, le glycocalyx est une structure extrêmement labile, ce qui peut expliquer les difficultés que nous rencontrons dans son observation. L'inflammation radio-induite, la mort des CE et le

recrutement des cellules circulantes sont principalement observés dans les micro-vaisseaux. Nous avons donc essayé d'observer le glycocalyx dans les vaisseaux de petit calibre. Cependant, le glycocalyx y est peu abondant²⁵⁷, ce qui peut expliquer pourquoi on nous n'avons pas réussi à le mettre en évidence. De manière similaire, *in vitro*, l'abondance du glycocalyx est faible²⁶¹ et peut rendre sa détection particulièrement difficile. Afin de réussir à observer le glycocalyx, nous aurions aussi pu recourir à des marquages observables en microscopie confocale, avec par exemple des anticorps anti-HS ou du dextran fluorescent^{259,451}, ou encore par microscopie « bi-photonique »^{258,452}.

I.E. Existence de modifications radio-induites de la glycosylation *in vivo*

I.E.1. Analyse de gènes chez la souris

L'analyse des gènes sur des sections d'intestin irradiés de souris montre plusieurs ressemblances marquantes avec les résultats obtenus *in vitro* chez les HUVECs (*article figure 8*). La comparaison des deux profils d'expression, même si elle est intéressante, doit être menée avec prudence. En effet, le tissu intestinal est autrement plus complexe que le modèle *in vitro*. Le tissu complet comprend un très grand nombre de types cellulaires, la part des CE étant nécessairement minoritaire. De plus, les processus subis par les tissus après irradiation sont bien plus complets que ceux mimés *in vitro*. Pour le moment, nos essais de marquages sur les tissus murins n'ont pas permis de rendre compte de modifications du glycome endothélial (voir *Résultats supplémentaires II Profil de glycosylation sur les tissus murins* page 166). Nous ne pouvons donc pas, relier l'analyse transcriptomique à des marquages membranaires comme nous l'avons fait dans le modèle HUVEC.

Concernant la synthèse des N-glycanes, seuls 3 gènes différentiellement exprimés sont les mêmes que chez les HUVECs (voir *Figure 43, Figure 44, Figure 45, Figure 46 en Annexes III*). Cependant, les groupes fonctionnels de gènes orientent la synthèse de manière similaire. La transformation des types oligomannosidiques en hybrides n'est pas encouragée (*Figure 43*). En effet, les gènes codant pour les mannosidases I (Man1a1, Man1c1 et Man1b1) sont modulés. La synthèse des structures Man9GlcNAc2 semble défavorisée par la surexpression du gène Ugcgl2. Par la suite, la sous-expression de Man1b1 risque de diminuer sa transformation dans le réticulum, la transformation Golgienne (Manea) ou cytoplasmique (Man1c1) pourrait être privilégiée ou. Comme chez les HUVECs, le profil transcriptomique pourrait favoriser l'accumulation des structures hautement mannosylées. L'expression du groupe de gènes B4galt5, B4galt2 et Man2a2 suggère que la formation des structures hybrides n'est pas favorisée. En effet, l'élongation de la 1^{ère} antenne pourrait être modulée (B4galt5, B4galt2) et la surexpression du gène de la mannosidase II (Man2a2) pourrait induire une transformation rapide des structures hybrides vers les structures complexes. Enfin, la formation des antennes pourrait être favorisée, car d'une part, le gène Mgat3, codant pour le

bisecting GlcNAc est diminué, et d'autre part, comme chez les HUVECs, la *Mgat4c* codant pour l'ajout d'antennes en β 1-4 est augmentée.

Comme chez les HUVEC, l'irradiation influence la synthèse des O-glycanes (*Figure 44*). Dans les tissus, cette expression pourrait être modulée, compte tenu des expressions augmentées de *Galnt3*, *Galnt2*, *Galnt10* et *Galnt6*. De nouveau, le transcriptome pourrait influencer positivement les transformations des cores 1 en cores 2, et des cores 3 en cores 4 (augmentation de *Gcnt1* et *Gcnt3*). Par contre, contrairement aux HUVECs, la création des cores 6 pourrait être augmentée. Les gènes impliqués dans les processus de *capping* et *decorating* montrent des expressions plus marquées (*Figure 45*). Comme chez les HUVECs, la polysialylation pourrait être positivement régulée (*St3gal* et *St8sia*) et la voie de polylactosamines pourrait être privilégiée (*B4galt2*, *St3gal1*, *St3gal2* et *Gcnt3*). Cette fois-ci, le transcriptome semble soutenir une augmentation de la sialylation en α 2-3, qui permettrait la création de structures sLe^x. Les gènes de synthèse des O-glycanes non-GalNAc sont modifiés de manière plus importante que chez les HUVECs (*Figure 46*). On retrouve une fois encore une diminution d'*Ogt*. On voit apparaître une surexpression de *Pofut2* responsable de la O-fucosylation de la thrombospondine⁴⁵³ et de *Pomgnt1* qui participe à la O-mannosylation.

I.E.2. Mise en évidence du phénomène in vivo

Afin de mettre en évidence l'existence de modifications de la glycosylation *in vivo*, des essais sur des coupes d'intestin grêle humain (pièces opératoires) et murin (modèle anse extériorisée) ont été effectués.

I.E.2.a. Marquage lectines sur des pièces humaines

La quantification du marquage sur les coupes humaines (voir la *partie Profil de glycosylation sur résection de patients traités par radiothérapie* page 168 et *Figure 35*) n'a pas pu être effectuée en totalité par manque de temps. Cependant, les premiers essais de quantification n'ont pas mis évidence de modification du marquage Con A au niveau endothélial.

I.E.2.b. Marquage lectines sur des échantillons de souris

Chez la souris C57BL/6, les lectines WGA liant les acides sialiques et Con A liant les N-glycanes hautement mannosylés ont été utilisées pour caractériser le glycome des CE (voir la *partie Profil de glycosylation sur les tissus murins* page 166 et *Figure 34*). La quantification de la fluorescence n'a pas permis de mettre en évidence une modification de la glycosylation en réponse à l'irradiation. Cette technique, délicate à mettre en œuvre, a entraîné une mortalité importante des animaux suite à l'injection des lectines. En effet, ces agglutinines ont des propriétés toxiques et provoquent la coagulation à trop forte concentration. Cette mortalité a réduit le nombre d'animaux dans l'essai. De

plus, le manque d'homogénéité du marquage dans les micro-vaisseaux a compliqué la quantification. Nous avons finalement abandonné cette technique.

De nouveaux essais ont été menés sur d'autres souris irradiées à 19 Gy (modèle anse extériorisée ; même protocole que chez les coupes humaines). Visuellement, nous n'avons pas observé de différence de marquage entre les coupes de souris traitées et non traitées (résultats non montrés).

I.E.2.c. La modification de la glycosylation est délicate à démontrer *in vivo*

Plusieurs éléments peuvent expliquer la difficulté de quantification des glycanes au niveau tissulaire. Dans nos essais, nous nous sommes efforcés de sélectionner des vaisseaux en zones lésées, mais nous les avons observés sans contrainte de type (artériel ou veineux) ou de taille. Or, il apparaît de plus en plus certain qu'en condition pro-inflammatoire, le type et la taille des vaisseaux fassent varier la glycosylation et ses modulations en réponse aux stimuli^{291,292}. La glycosylation différentielle des lits vasculaires serait donc en cause. De plus, nous aurions pu essayer de marquer les glycanes spécifiquement dans les artères lésées. En effet, dans l'étude menée par Scott *et al*, les auteurs identifient une augmentation des N-glycanes oligomannosidiques *in vivo* sur des coupes d'artères humaines, mais cette modification n'est visible qu'au niveau des lésions athérosclérotiques²³⁰. Enfin, pour lier les essais PCR *in vivo* et les marquages sur les coupes d'intestin, nous pourrions effectuer une quantification globale du marquage lectinique et la mettre en regard de la mesure des gènes, comme nous l'avons fait pour les HUVECs.

I.F. Réflexions critiques sur les modèles utilisés

I.F.1. HUVEC

I.F.1.a. Pertinence du modèle HUVEC

L'utilisation d'HUVEC comme modèle de CE présente plusieurs avantages et inconvénients.

Avantages :

- Ces cellules primaires (non cancéreuses et non immortalisées) sont proches de l'état physiologique concernant l'expression des gènes et du phénotype.
- Ce modèle est classiquement utilisé dans les études vasculaires : il existe donc une littérature importante sur ce modèle et l'effet des différents stimuli.

Avantages et inconvénients :

- Nous avons utilisé des lots de cellules provenant toujours du même groupe de donneur. Cela nous préserve de la variabilité interindividuelle et assure la reproductibilité. Cependant, nous devrions confirmer les résultats sur plusieurs lots.

- Issus de cordon ombilical, les HUVECs sont peu spécialisées, ce qui en fait un modèle assez généraliste dont les résultats sont souvent applicables aux autres types vasculaires. En revanche, elles ne permettent pas l'étude de certaines fonctions.
- La réaction au stimulus inflammatoire est souvent exacerbée chez les HUVECs : c'est avantageux pour observer des phénomènes faibles mais ils peuvent être caricaturaux²⁹¹.

Inconvénients :

Le fait de n'utiliser qu'un seul modèle de CE ne permet pas de prendre en compte la variabilité existante entre les différents lits vasculaires à l'état basal²⁵¹. Il ne permet pas non plus d'envisager les différences de réactions en fonction des différents lits vasculaires d'origine^{291,292}. Aussi, ce modèle de CE issues de gros vaisseaux ne permet pas de rendre compte des phénomènes qui ont lieu dans les microvaisseaux et qui pourtant sont impliqués dans la réponse tissulaire aux RI.

I.F.1.b. Problématique de la confluence dans le modèle HUVEC

Pour étudier les effets chroniques de l'irradiation, nous avons cultivé les cellules jusqu'à 21 jours post-confluence (voir [annexes Figure 47](#)). Aux temps tardifs, les cellules contrôles sont soumises à une inhibition de contact prolongée et pourraient exprimer des phénotypes proches de l'état confluent. Pour savoir si le temps post confluence pouvait influencer les résultats, nous avons effectué des marquages lectiniques sur des cellules fraîchement confluentes et confluentes depuis 14 ou 21 jours. Nous n'avons pas observé de différence entre ces deux états (résultats non montrés).

Un autre problème lié à ce modèle est que, aux temps tardifs, les cellules contrôles sont confluentes à l'excès alors que les cellules irradiées sont disparates en raison de la mort radio-induite au-delà de J4. Les HUVECs grossissent et sont très probablement sénescents. La question de l'influence de la confluence se pose dans nos essais. Pour y répondre, nous pourrions confirmer les résultats en mettant au point des tapis contrôles possédant une confluence comparable aux cellules irradiées le jour de l'essai. Il nous faudrait jouer sur la densité d'ensemencement. Cela aurait tout de même le désavantage de comparer des cellules irradiées quiescentes et des cellules témoins en cours de croissance, ce qui est probablement beaucoup plus impactant. Nous pourrions également effectuer une analyse statistique : idéalement l'équivalent non-paramétrique de l'ANOVA, c'est à dire le test de Kruskal-Wallis. En mesurant parallèlement la confluence et le traitement ou non par irradiation, nous pourrions connaître l'influence de ces 2 paramètres sur la fluorescence du marquage lectinique⁴⁵⁴

Pour nous affranchir de la différence de taille des cellules entre les populations à 0 Gy et à 20 Gy, nous avons fait le choix de mesurer la différence de fluorescence à l'échelle de la surface occupée par les cellules et non pas à l'échelle de la cellule. Nous avons donc quantifié la fluorescence du tapis complet et l'avons ramené à sa surface ([article figure supplémentaire 3](#)). Le résultat obtenu est une

densité de fluorescence. Ce paramètre est plus pertinent qu'une quantité de fluorescence par cellule, car il permet de comparer des cellules de tailles différentes. La densité de fluorescence rend compte pour une même surface de la quantité de sucres et par extension de la quantité de ligands présents pour les récepteurs des cellules circulantes. Parallèlement, nous avons effectué un marquage par la lectine Con A sur des cellules en suspension. Son analyse en cytométrie en flux a permis de confirmer les résultats en densité de fluorescence obtenus par microscopie ([article figure 1 et figure supplémentaire 4](#)).

I.F.2. Souris

I.F.2.a. Modèle dose unique

Pour l'étude *in vivo*, nous avons utilisé le modèle d'irradiation d'une anse intestinale extériorisée utilisé dans le laboratoire (voir [annexes VI Modèle murin Figure 48](#)). Ce modèle à l'avantage de permettre une irradiation localisée de l'intestin grêle. Le modèle et la dose utilisés permettent d'obtenir des lésions histologiquement proches de celles observées dans les tissus sains après radiothérapie. Le fait d'utiliser un protocole avec une dose unique est souvent critiqué, mais plusieurs paramètres contraignent et motivent notre choix. D'une part, aucune autre technique disponible à ce jour chez la souris ne permet une irradiation localisée de l'intestin grêle. Même les techniques de stéréotaxie (fractionnée ou non) chez le petit animal (SARRP) semblent difficiles à mettre en œuvre sur l'intestin car il s'agit d'un organe mobile. D'autre part, l'objectif de ce protocole n'est pas de mimer une irradiation fractionnée, mais avant tout d'obtenir des lésions précoces (inflammatoires) et tardives (fibrotiques) comparables à celles des patients traités par RT. En raison d'une radiosensibilité plus faible que chez l'Homme, la délivrance d'une forte dose aux tissus est nécessaire pour obtenir ces lésions chez la souris. Enfin, comme nous l'avons évoqué en introduction ([Etat de l'Art I.B.2 Protocoles et techniques](#)), l'évolution des protocoles de RT se dirige vers l'utilisation de doses plus fortes (hypofractionnement : par exemple 15-20 Gy par fraction / 3 fractions en RT stéréotaxique), ce qui rend notre modèle d'autant plus pertinent et actuel. Enfin, dans le cadre de l'accident (où la dose peut être unique et forte), notre modèle garde son intérêt.

I.G. Pour améliorer ces expériences

L'évaluation de la glycosylation effectuée par qPCR, microscopie, cytométrie en flux et spectrométrie de masse sur les HUVECs irradiées a permis de caractériser une partie de leur profil glycanique. Cependant, plusieurs points restent à éclaircir. Tout d'abord, nous avons pu constater une augmentation de la α 2-3 sialylation, de l'O-glycosylation et potentiellement des cores 2. Ces éléments laissent à penser que l'irradiation pourrait induire l'expression des motifs sLe^X. Pour le confirmer, il faudrait quantifier l'expression de la fucosylation en α 1-3 par des lectines comme LTL

(*Lotus Tetragonolobus Lectin*) et AAL (*Aleuria Aurantia Lectin*)^{455,456}. On pourra aussi, en parallèle, tester la présence effective des antigènes de Lewis grâce à des anticorps spécifiques, comme MECA-79 (core 1 étendu 1 6–sulfated lactosamine), 2F3⁴⁵⁷ ou HECA-452 (pour le sLe^x)^{292,314,395}, et anti-CD15 (pour le Le^x)²⁸⁵. Afin de faciliter l'analyse et le traitement des cartes glycaniques, nous pourrions recourir à une analyse par *lectin microarray*. Cette technique inspirée de la méthode ELISA permet d'identifier rapidement un grand nombre de motifs glycaniques sur des cellules en suspension ou des extraits cellulaires^{243,455}. Dans notre cas, un extrait membranaire serait le plus pertinent. L'avantage de cette technique est qu'elle permet de quantifier de grands nombres de structures en parallèle. Cela permet de compenser le manque de spécificité des lectines en effectuant des croisements et regroupements de données pour caractériser plus précisément les motifs⁴⁵⁸.

Concernant l'analyse par spectrométrie de masse, l'analyse des O-glycanes compléterait notre carte glycanique et pourrait apporter des réponses sur la présence des motifs Le^x. D'autre part, en ce qui concerne les N-glycanes, il serait intéressant d'acquérir des spectres plus riches pour intégrer dans l'analyse un plus grand nombre de structures (une quarantaine au lieu des 9 actuellement) pour affiner l'analyse. L'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) associée à une meilleure sensibilité pourrait permettre de préciser certaines structures. En acquérant ces spectres pour les N- et les O-glycanes, nous pourrions pousser l'analyse des chaînes de synthèse plus loin. En effet, des logiciels de créations de réseaux de glycanes comme *Glycosylation Network Analysis Toolbox* (GNAT) pourraient permettre d'identifier plus précisément la nature des régulations dans les chaînes de synthèse⁴⁵⁹.

II. La modification du glycome a des effets fonctionnels

II.A. Effet fonctionnel de la modification du glycome

II.A.1. Motifs hautement mannosylés

L'irradiation provoque entre autre, la surexpression des molécules d'adhésion responsables de l'augmentation du recrutement des CE et des thrombocytes^{112,159,160,162,164,170,173,183,460}. Justement, la glycosylation est une composante clé de la reconnaissance leucocyte–CE. Nous avons pu mettre en évidence une augmentation significative des N-glycanes hautement mannosylés après irradiation. Dans les phénomènes inflammatoires *in vitro* et *in vivo*, la surexpression des motifs hautement mannosylés est responsable d'une augmentation de l'adhésion des leucocytes sur les CE^{230,236,251,333}. Nous avons montré que la modification de la N-glycosylation radio-induite avait des effets comparables.

Deux tests d'adhésion de monocytes sur un tapis de CE ont été utilisés : le premier en condition statique et le second en condition dynamique. Le test en condition statique (résultats non montrés) a permis d'observer une augmentation de l'adhésion des leucocytes sur le tapis irradié, comme décrit dans la littérature⁴⁶¹. Mais nous n'avons pas mis en évidence une différence d'adhésion dépendante de la glycosylation. Ce résultat n'est pas surprenant : en effet, les travaux sur l'adhésion en contexte inflammatoire n'ont pas non plus montré de différence d'adhésion dépendante de la glycosylation en condition statique²³⁶.

En condition dynamique sous un flux laminaire ([article figure supplémentaire 6](#)), nous avons montré une différence significative de l'adhésion dépendante des motifs hautement mannosylés. En effet, la présence d' α -méthylmannose (un inhibiteur compétitif des motifs hautement mannosylés), rétablit en partie l'adhésion basale des cellules THP-1 sur le tapis d'HUVECs ([article figure 5](#)). Il est établi que l'irradiation provoque une surexpression des sélectines et des CAM (ICAM-1, VCAM-1 et PECAM-1). On pourrait penser que l'expression augmentée de ces glycoprotéines explique l'augmentation des motifs hautement mannosylés. Cependant, il a été démontré que la modification de la N-glycosylation est indépendante de l'expression des molécules d'adhésion dans un contexte pro-inflammatoire^{230,236}. Il serait intéressant de le vérifier dans notre analyse. D'autre part, notre expérience avec l' α -méthylmannose prouve bien que c'est le changement de glycosylation qui induit une augmentation de l'adhésion et pas seulement l'augmentation des CAM ou des sélectines.

Le flux laminaire utilisé lors de cette expérience privilégie les interactions médiées par les CAM (on a vu dans [l'Etat de l'Art partie II.A.3.d](#) que les interactions avec les sélectines sont sensibles au *catch bound* et sont favorisées en flux turbulent). On peut donc penser que des glycanes hautement

mannosylés sont portés par les CAMs. La VCAM-1 est N-glycosylée et exprime en contexte tumoral plusieurs glycoformes⁴⁶², ce qui soutient l'idée que sa glycosylation peut être modulée après irradiation. En contexte inflammatoire, VCAM-1 est proposée comme candidat potentiel pour porter les motifs hautement mannosylés responsables d'une augmentation de l'adhésion des monocytes²³⁰. Chez les HUVECs exposées au TNF- α , la part des ICAM-1 portant des motifs hautement mannosylés (forme HM-ICAM-1) est augmentée. La forme HM-ICAM-1 a aussi été identifiée *in vivo* sur les artères coronariennes humaines. Cette forme a été reliée à une augmentation de l'adhésion leucocytaire³³³. Dans l'athérosclérose et le diabète, des modifications du glycome liées à une diminution de l'activité des mannosidases sont observées. La N-glycosylation hautement mannosylée qui en résulte semble être impliquée dans le recrutement leucocytaire et pourrait participer à la chronicité de l'inflammation^{230,375,463}. On sait justement que les RT augmentent la probabilité de développement des maladies vasculaires^{103,195}, notamment par l'induction de lésion athérosclérotiques. L'irradiation de souris ApoE-/- induit une augmentation du nombre de plaques d'athéromes^{197,464}. Chez la même lignée de souris, la diminution de l'activité des mannosidases provoque la modification des N-glycanes. Il est suggéré que cette modification pourrait constituer le mécanisme entre réaction auto-immun et athérogenèse³⁶¹. Dans les lésions athérosclérotiques radio-induites, il serait intéressant d'évaluer le glycome afin de déterminer s'il influence le recrutement chronique.

Enfin, puisque l'inhibition de l'adhésion par le l' α -methylmannose ne supprime pas totalement l'adhésion radio-induite, cela signifie que les autres modifications de glycosylation identifiées, comme la sialylation, pourraient être impliquées. De plus, nous pourrions évaluer l'adhésion en flux turbulent, ce qui privilégierait les motifs reconnus par les sélectines et notamment le sLe^x.

II.A.2. Importance de la sialylation et de la O-glycosylation

II.A.2.a.Sialylation augmentée

L'augmentation de la sialylation pourrait aussi influencer le recrutement leucocytaire en fournissant des ligands pour les sélectines, intégrines et récepteurs leucocytaires.

II.A.2.b. α 2-3 sialylation et motifs Lewis X

Même si nous n'avons pas clairement identifié de motifs Le^x ou sLe^x sur les CE irradiées, la forte augmentation de l' α 2-3 sialylation laisse penser que les motifs Le^x, impliqués dans l'interaction avec les sélectines, pourraient être augmentés sur les CE après RI.

Le ligand PSGL-1 porte des motifs α 2-3 sialylés sur un O-glycane (core 2) : il est classiquement retrouvé sur les leucocytes. En condition physiologique, seule une petite partie de PSGL1 exprime le motif sLe^x et sert de ligand aux sélectines. Une augmentation de la part des motifs sLe^x augmente

l'adhésion^{230,367}. Une forme endothéliale (ePSGL-1) a été identifiée sur les HUVECs activées. Ces dernières surexpriment l'ePSGL-1 et le TNF- α agit sur sa glycosylation. Ce ligand participe à l'adhésion des monocytes³⁶⁰. L'ePSGL-1 est donc un bon candidat pour expliquer l'augmentation des motifs α 2-3 sialylés sur l'endothélium après irradiation. La L-sélectine pourrait notamment reconnaître des motifs sLe^X du ePSGL-1, comme elle le fait sur les PSGL-1 leucocytaires dans les interactions leucocytes-leucocytes sur les sites d'inflammation³⁰⁵. De plus, la présence de ce ligand sur l'endothélium et l'augmentation de la proportion de motifs α 2-3 sialylés pourraient influencer positivement le recrutement des thrombocytes.

D'autres molécules porteuses de ligands des sélectines ont été identifiées sur les CE et particulièrement dans les HEV. Le CD34 peut être un ligand de la L-sélectine s'il porte le 6-sulfo-sialyl-Lewis X en abondance³¹², ce qui serait le cas dans nos cellules irradiées. Madcam-1 porte également le sLe^X et est reconnu par la L-sélectine. Cette glycoprotéine est particulièrement exprimée sur les CE en contexte inflammatoire chronique. Au niveau intestinal, elle semble jouer un rôle dans la rectocolite hémorragique^{465,466}. MadCAM peut aussi interagir avec les intégrines VLA-4 et α 4 β 7⁴⁶⁷⁻⁴⁶⁹. GlyCAM-1 est un ligand O-glycosylé (core 2) portant le motif 6-sulfo-sialyl-Lewis X et identifié comme un des ligands de la L-sélectine des plus influents dans le *rolling* des leucocytes⁴⁷⁰⁻⁴⁷³. Parmi les autres glycoligands potentiels de la L-sélectine, on trouve la podocalyxine, l'endomucine et la nepmucine^{245,474}.

La chronicisation de l'inflammation pourrait conduire dans les lésions radio-induites à la formation d'organes lymphoïdes tertiaires. C'est par exemple le cas dans l'athérosclérose qui présente de ressemblances phénotypiques avec les vaisseaux irradiés⁴⁷⁵. Les vaisseaux irradiés pourraient porter des glycoprotéines présentes dans les HEV^{476,477}.

II.A.2.c.Sialylation en α 2-6

L' α 2-6 sialylation des glycoprotéines endothéliales a des fonctions contradictoires sur le recrutement des cellules circulantes. En contexte inflammatoire, l'augmentation de l'expression des cytokines (comme TNF- α et IL-1 β) par l'endothélium vasculaire se traduit par l'augmentation de l' α 2-6 sialylation^{212,478}. Ces motifs α 2-6 sialylés constituent des ligands pour le CD22 exprimé par les lymphocytes B et permet leur recrutement^{200,335,478,479}. A l'inverse, la forme majoritaire d'ICAM-1, porteuse de N-glycanes sialylés en α 2-6, est diminuée en contexte inflammatoire au profit de la forme hautement mannosylée qui induit le recrutement des monocytes³³³. De la même manière, l' α 2-6 sialylation de VCAM-1 inhibe l'adhésion en flux⁴⁸⁰.

La PECAM-1 endothéliale porte des motifs α 2-6 sialylés^{340,481} sur des N-glycanes biantennés⁴⁸². La sialylation semble réduire la transduction de stimuli apoptotiques³⁴⁰ (cela reste controversé⁴⁸³) et est

nécessaire à la formation des tubes durant l'angiogenèse⁴⁸¹. L'augmentation de la sialylation en α 2-6 permet la création d'un complexe entre le VEGFR, la VE-cadhéine et les PECAM-1 sialylés de deux CE voisines (voir [Figure 37](#)). Ce complexe aux propriétés mécano-transductrices induit des signaux de survie et de prolifération. A l'inverse, une baisse de la sialylation rompt le complexe en empêchant les interactions homologues avec les PECAM-1 des CE voisines et potentialisant les interactions avec les galectines 1.⁴⁸⁴

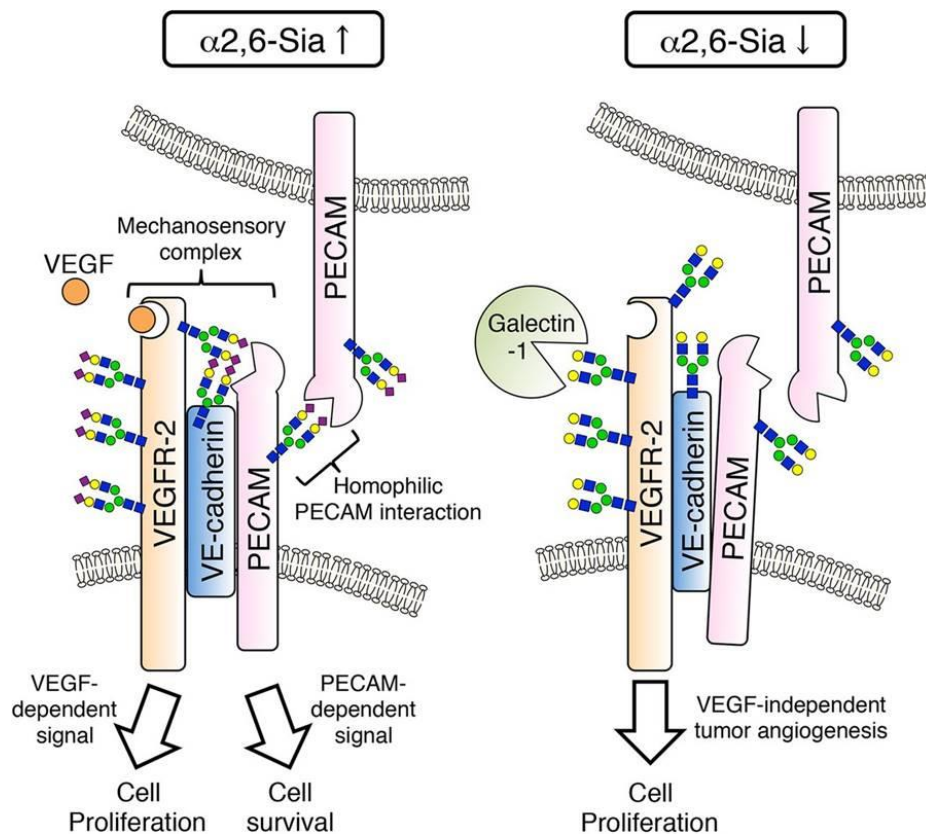


Figure 37 : le niveau d' α 2-6 sialylation régule l'angiogenèse (d'après Kitazume *et al.*⁴⁸⁴).

Dans nos expériences, il est difficile de trancher. D'une part, les N-glycanes hautement mannosylés (donc non sialylés) sont augmentés, ce qui privilégie la dissociation du complexe. Cela pourrait expliquer la réduction radio-induite de la formation des tubes⁴⁸⁵ et la diminution de la survie (même si les principaux facteurs de mortalité chez les CE restent les céramides et les dommages à l'ADN). A l'inverse, même si l'irradiation induit une baisse des formes complexes, la sialylation α 2-6 est clairement augmentée et le complexe pourrait exister : cela soutient l'existence de signaux pro-angiogéniques aux temps tardifs où la sialylation est la plus forte.

II.B. Synergie entre le *shedding* et la modification des glycanes

Il apparaît de plus en plus évident que le *shedding* contribue à l'état pro-inflammatoire en rendant plus accessible les molécules et protéines exprimées par les CE, ce qui facilite l'adhésion des leucocytes^{274,279,486,487}. Dans la cinétique post-irradiation, nous avons mis en évidence une diminution significative des GAGs à 4 et 7 jours post-irradiation. Cette potentielle diminution du glycocalyx intervient simultanément avec l'augmentation de motifs hautement mannosylés et sialylés. Il existe donc d'une part une meilleure accessibilité des ligands pour les récepteurs leucocytaires et d'autre part une augmentation des motifs (ligands) pro-adhésifs. Fonctionnellement, ce *timing* (4-7J) coïncide avec une augmentation radio-induite de l'adhésion glycanes-dépendante.

Parallèlement, l'irradiation des CE provoque une augmentation progressive et maintenue dans le temps de leur sialylation. Or, la sialylation augmente la charge négative des glycanes et de la membrane plasmique⁴⁸⁸ qui participe aux propriétés antiadhésives de l'endothélium^{488,489} et protège les glycoprotéines de leur dégradation^{489,490}. Dans l'endothélium pulmonaire, la sialylation α 2-3 et α 2-6 a été montrée comme déterminante dans le maintien de la barrière endothéliale⁴⁹¹. On a vu en introduction (*IV.B.1.d*) que la sialylation de la VE-cadhérine participe au maintien des jonctions cellulaires^{343,492,493}. Une sialylation forte s'oppose donc à la transmigration. Si l'irradiation permet un *shedding* favorisant l'adhésion, la sialylation en revanche pourrait bien diminuer la transmigration des leucocytes adhérents.

Le CD44 (HCAM) est une glycoprotéine dont le rôle illustre bien la complexité du signal glycanique radio-induit. Son extrémité extra-cellulaire HABD (*hyaluronan-binding Domain*) est N-glycosylée. L'irradiation des CE provoque sa surexpression^{460,494} corrélée à une augmentation de l'adhésion des monocytes et associée à un phénotype sénescence⁴⁶⁰. Nous avons également vu que l'irradiation induit une augmentation de la sialylation. Cette sialylation a deux facettes. D'une part, elle autorise la création de motifs Le^x qui explique l'augmentation de l'adhésion radio-induite. D'autre part, elle ajoute des charges négatives aux N-glycanes du HABD. Cela provoque une diminution de l'adhésion des HA et une désorganisation du glycocalyx propice au *shedding*⁴⁶².

Le *shedding* radio-induit pourrait être étudié plus en détail, notamment en prenant pour cible les MMP et les ROS. Des études *in vitro* en contexte inflammatoire ont déjà montré une réduction de l'adhésion des leucocytes par inhibition des MMPs³⁰⁴ et des ROS³⁰³.

II.C. Pour améliorer les résultats

II.C.1. Expérience en flux

Nous avons utilisé l'α-méthylmannose par facilité de mise en œuvre. Ce procédé sature les sites de reconnaissance du leucocyte pour les ligands hautement mannosylés. Pour confirmer les résultats obtenus, nous pourrions masquer les motifs hautement mannosylés sur les CE par la Con A ou la LCA (*Lens Culinaris Agglutinin*), deux lectines capables de reconnaître ces motifs. Ceci constituerait une preuve plus directe. De manière complémentaire, le traitement des tapis par l'endoglycosidase-H (qui hydrolyse les motifs N-glycanes hautement mannosylés) pourrait être utilisé pour supprimer l'adhésion oligomannose-dépendante. Nous pourrions aussi appliquer sur des tapis cellulaires contrôles des drogues inhibitrices de la mannosidase I comme la kifunensine, ou des mannosidases II comme la swainsonine, qui permettent d'obtenir des motifs hautement mannosylés. En comparant l'adhésion des monocytes sur les tapis traités avec celle sur les tapis irradiés, nous pourrions confirmer l'importance des motifs hautement mannosylés.

En plus des motifs hautement mannosylés, nous avons identifié une augmentation des O-glycanes et des motifs sialylés. Le masquage de ces motifs par les lectines complémentaires (Jacaline, UEA-1 et SNA) permettrait d'évaluer l'importance fonctionnelle de ces motifs dans l'adhésion. En complément pour la O-glycosylation, on pourrait traiter les CE avec la O-glycosidase et pour la sialylation, avec des neuraminidases ou une compétition par de l'acide neuraminique (acide sialique).

Comme on l'a évoqué, il serait intéressant de tester la variation du régime d'écoulement qui peut avoir une influence sur les interactions entre leucocytes et CE. D'autre part, les motifs glycaniques exprimés en réponse à un stimulus varient en fonctions des types cellulaires et ont une influence sur le recrutement leucocytaire^{291,495}. Nous pourrions donc faire varier les deux types cellulaires (leucocyte et CE). Enfin, nous pourrions utiliser du sang humain, ce qui se rapprocherait des conditions physiologiques en ajoutant au modèle les protéines du sérum. Cela permettant l'observation de l'interaction des leucocytes, thrombocytes et érythrocytes avec les CE mais aussi entre eux. Idéalement, nous pourrions utiliser du sang de patients ayant subi une RT et voir dans quelle mesure la modification des protéines du sérum et des cellules circulantes interagit avec l'endothélium sain ou irradié.

III. Hypothèses sur la modification radio-induite du glycome

III.A. Dommages à l'ADN

Les dommages radio-induits à l'ADN ont été directement reliés à la dispersion de l'appareil de Golgi dans le modèle HUVECs. Suite aux dommages à l'ADN, les processus de réparation induisent l'activation de la voie DNA-PK. Cette protéine kinase phosphoryle la GOLPH3 (*Golgi phosphoprotein 3*) qui interagit alors avec la MYO18A (myosine XVIII A). La MYO18A induit une tension sur l'appareil de Golgi via l'actine F et provoque sa dispersion. Ce phénomène apparaît 4 heures après exposition et peut être maintenu jusqu'à plusieurs semaines³⁷⁸, probablement via un petit nombre de dommages résiduels à l'ADN, capable d'entretenir la voie⁴⁹⁶. Ce phénomène ne compromet pas la co-localisation des compartiments Golgiens (cis, médian, trans) que l'on sait primordiale à la synthèse des glycanes²⁰⁶. Cependant, il est très probable que ce stress Golgien puisse avoir des conséquences sur la machinerie de glycosylation. La voie GOLPH3/MYO18A/actine F⁴⁹⁶ est induite indépendamment de tout phénomène apoptotique et ne fait pas appel à la dépolymérisation des microtubules. Ces deux mécanismes, connus pour induire la dispersion Golgienne, sont aussi déclenchés par les RI, et peuvent influencer le glycome^{497,498}.

III.B. Rôle des molécules radio-induites

Nous avons détaillé en introduction de quel manière les RI induisent l'expression des cytokines et des ROS/RNS^{41,57}. L'analyse des réseaux de signalisation effectuée avec le logiciel *Pathway Studio* montre que certains gènes de glycosylation identifiés chez l'Homme et la souris sont liés directement à un ou plusieurs acteurs classiquement radio-induits (*article figure 9*). Les cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ et les facteurs de transcription NF- κ B et P53 sont notamment identifiés comme pouvant induire les glycoprotéines identifiées en qPCR. Ces mêmes gènes sont majoritairement liés aux processus d'adhésion cellulaire. En effet, l'ensemble des résultats présentés et discutés auparavant ont bien montré que l'irradiation induit d'un part des modifications de la glycosylation et d'autre part que ces modifications ont des effets fonctionnels sur le recrutement des cellules circulantes.

III.B.1. Acteurs moléculaires et facteurs de transcription

Nous avons pu démontrer sur les HUVEC et la souris que l'irradiation induit une diminution du gène codant pour l'OGT. La sous-expression d'Ogt pourrait être provoquée par l'IL-1 α radio-induite⁴⁹⁹. Cette O-glycosylation particulière régule de très nombreuses protéines⁵⁰⁰. En effet de nombreux liens sont établis entre son expression et l'activité des cytokines et des facteurs de transcription radio-induits qui à leur tour modulent le glycome.

Le NF- κ B activé quelques minutes après irradiation et maintenu jusqu'à plusieurs années après la RT¹⁴² joue un rôle important dans l'expression des motifs glycaniques au niveau endothélial. La sous-

unité p65 (REL-A) a été reliée à la modulation glycanique inflammatoire²⁹¹. Mais elle induit également un rétrocontrôle anti-inflammatoire via l'expression des galectines-1⁵⁰¹. TP53 est connue pour induire directement une augmentation de l'expression de FUCA1^{502,503}. C'est ce que l'analyse transcriptomique sur les HUVECS suggère. D'autre part, en tant qu'acteurs centraux de la réponse radio-induite, NF- κ B⁵⁰⁴ et TP53⁵⁰³ induisent la transcription de nombreuses cytokines⁵⁰⁵ ayant directement un impact sur la glycosylation.

III.B.2. Cytokines et facteurs de croissance

Dans les réseaux de gènes, on remarque que le TNF- α est directement lié à une grande partie des gènes de glycosylation modifiés après irradiation. De nombreuses études citées auparavant dans ce mémoire ont démontré l'importance du TNF- α dans la régulation des gènes de glycosylation et l'expression des glycanes, lesquelles ont été reliées à des conséquences fonctionnelles sur le recrutement des cellules endothéliales. D'autres cytokines radio-induites comme IL-1 ont été reliées à des modifications glycaniques, notamment sur l'endothélium⁵⁰⁶.

Au-delà du rôle central joué par les cytokines, des facteurs de croissance radio-induits comme le TGF- β ou le VEGF peuvent aussi moduler la glycosylation. Le TGF- β radio-induit peut activer la voie des MAP kinases (ERK1/2) dont la régulation affecte la synthèse des glycanes dans l'endothélium²⁹¹. En synergie avec le TNF- α , il provoque la modification de l'expression des GAGs et de la sialylation³⁹⁸. Sur d'autres types cellulaires, comme les synoviocytes et les chondrocytes, l'association TGF- β + TNF- α modifie également la glycosylation en augmentant notamment l'expression des O-glycanes et particulièrement des cores 2^{394,507}. Le VEGF est exprimé dans les tumeurs résistantes aux RT, mais aussi aux temps tardifs dans les tissus irradiés par l'intermédiaire de HIF1 α ⁵⁰⁸⁻⁵¹⁰. Ce facteur de croissance a démontré au niveau endothélial des effets modulateurs sur la glycosylation membranaire. Il induit notamment l'augmentation de l' α 2-3 sialylation^{285,511}.

III.C. Effets sur les compartiments cellulaires

III.C.1. Réticulum endoplasmique

Le stress oxydant radio-induit provoque chez les CE un stress au RE⁵¹². Ce stress active la voie UPR (*unfolded protein response*) via sa branche PERK/eIF2 α /ATF4⁵¹³. La voie UPR participe à l'initiation de phénomènes inflammatoires et semble impliquée dans la pathogénèse des maladies inflammatoires chroniques comme le diabète ou l'athérosclérose⁵¹⁴⁻⁵¹⁶. Le déclenchement de cette voie est associé à des modifications de la glycosylation²³² et notamment la génération de N-glycanes hautement mannosylés⁵¹⁷, ce qui est aussi le cas dans notre étude. Les RI pourraient donc agir à travers la voie UPR, provoquant un stress au réticulum générateur de motifs hautement mannosylés. L'activation d'UPR augmente l'adressage des protéines mal repliées vers le système ERAD (*Endoplasmic-*

reticulum-associated protein degradation)^{232,517}, qui adresse les protéines au protéasome et les glycanes au lysosome⁵¹⁸. Suite à l'irradiation des HUVEC et des souris, on observe effectivement une augmentation des gènes codant pour des enzymes lysosomales. Cela soutient l'hypothèse d'un stress oxydant au RE. D'autre part chez la souris, nous relevons une augmentation de l'expression du gène Man2a2. La surexpression de son homologue Man2c1 est corrélée à l'accumulation de glycoprotéines incomplètes et au déclenchement de la voie ERAD. La dérégulation radio-induite de la Man2a2 pourrait participer à l'altération de la N-glycosylation²³⁸. La persistance du stress oxydant et de protéines mal repliées est initiatrice de mécanismes adaptatifs favorisant la survie cellulaire⁵¹⁴, mais il peuvent également mener à la sénescence^{517,519}.

III.C.2. Golgi

Le déclenchement de l'UPR peut également être induit par une modification de pH⁵¹⁹. Justement, l'irradiation induit des modulations persistantes du pH cellulaire⁴ et du microenvironnement tumoral⁵²⁰. Ces modulations sont maintenues par le stress oxydant et peuvent induire des modifications de la glycosylation. La glycosylation Golgienne est notamment connue pour sa grande sensibilité aux variations de pH^{227,521,522}.

Suite à l'irradiation, la dispersion Golgienne peut être maintenue dans le temps. La GOLPH3 reste donc phosphorylée. Son rôle pivot dans plusieurs processus apporte des pistes directes et indirectes quant à la régulation radio-induite du glycome. Le VSP74, homologue de la GOLPH3, a été décrit comme impliqué dans la rétention Golgienne des mannosyltransférases. Sa suppression induit l'hypoglycosylation des protéines⁵²³. De manière similaire, la GOLPH3 permet la rétention de GCNT1 dans le cis et le médian Golgi. Elle régule donc la production des O-glycanes core 2 et a donc une influence sur l'apparition des motifs de Lewis⁵²⁴. Cela pourrait expliquer l'augmentation radio-induite de la O-glycosylation, notamment core 2 ainsi que de la sialylation α 2-3. Enfin, la GOLPH3 agit sur les sialyl-transférases (ST6GAL1) et induit l' α 2-6 sialylation des N-glycanes. Elle permet la sialylation des protéines membranaires notamment les intégrines et les récepteurs à activité tyrosine kinases (RTK)⁵²⁵. Au niveau des intégrines, la sialylation induit une augmentation de la migration cellulaire. Au niveau des intégrines et des RTK, la sialylation pourrait agir sur le PIK3 induisant la voie PIK3/AKT/mTOR (voir [Figure 38](#)). En effet, GOLPH3 affecte la phosphorylation de AKT⁵²⁵ et mTOR⁵²⁶, et la voie GOLPH3/MYO18A/actine F favorise la survie cellulaire³⁷⁸. La phosphorylation de GOLPH3 pourrait être liée à l'augmentation radio-induite de l' α 2-6 sialylation et à la mise en place d'un phénotype endothélial sénescence.

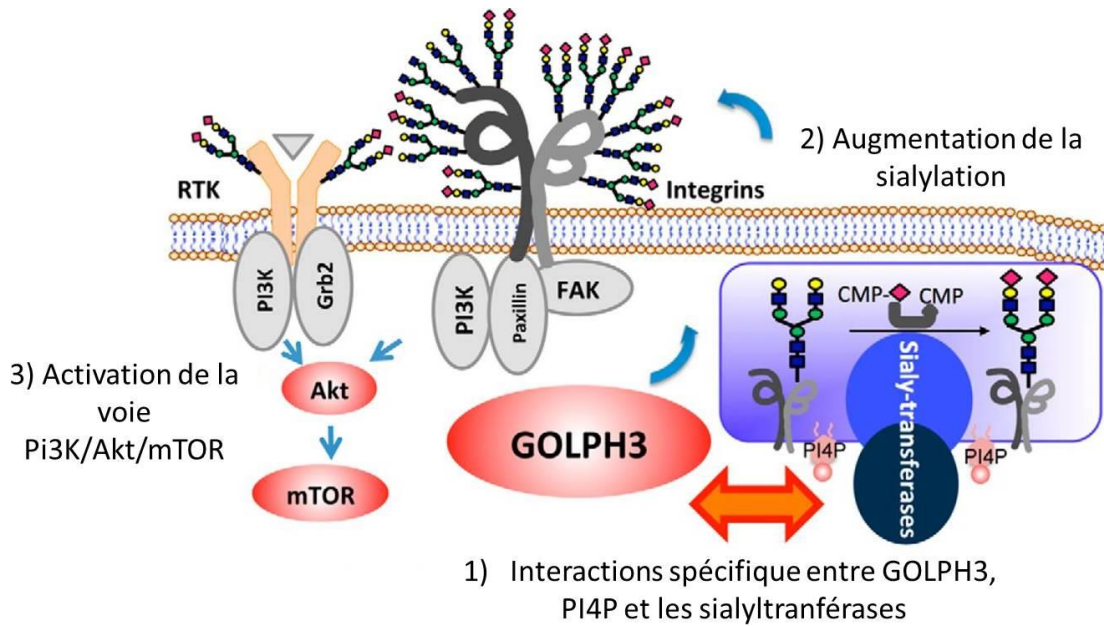


Figure 38 : proposition de mécanisme de régulation de la sialylation (d'après Isaji *et al.*⁵²⁵).

La GOLPH3, en agissant sur la localisation des glycosyltransférases induit des modifications glycaniques. Dans le cas de la O-glycosylation, il semble que certains stimuli, notamment cancéreux, puissent induire la relocalisation des GALNTs du Golgi vers le RE. Ce processus, nommé *GALA pathway*, reste mal compris. Cependant, il provoque comme l'irradiation une augmentation de l'initiation de la O-glycosylation. Il serait intéressant de mener des études sur l'existence de ce mécanisme après irradiation²³³.

Perspectives

I. Existence de modifications radio-induites du glycome *in vivo*. Conséquences et solution thérapeutiques

I.A.1. Eviter le recrutement par les CE ?

Les effets secondaires aux tissus sains sont intimement liés aux dommages subis par le réseau vasculaire, particulièrement au niveau des microvaisseaux et de l'endothélium. L'activation et l'inflammation endothéliales chroniques conduisent à des pathologies ou symptômes radio-induits comme la fibrose^{35,46} ou l'athérosclérose^{102,103,142}. Le recrutement continu des neutrophiles et mastocytes semble impliqué dans le maintien de cette inflammation radio-induite^{139,144}. En effet, la disparition rapide des infiltrats inflammatoires est corrélée à une diminution des dommages radio-induits¹⁰⁵. A travers le recrutement leucocytaire, les CE jouent donc un rôle central dans la propagation des lésions radio-induites. L'augmentation des sélectines et des molécules d'adhésion participe à ce phénomène. Cependant, l'adhésion leucocytaire a pu être observée sans augmentation des CAMs⁵²⁷. Nos travaux permettent d'apporter une réponse à ce phénomène. Nous avons montré la présence d'un glycome radio-induit propice au recrutement leucocytaire. Nous avons montré que la N-glycosylation hautement mannosylée radio-induite avait un effet sur le recrutement des monocytes. Le glycome endothélial radio-induit pourrait donc constituer une cible intéressante pour moduler le recrutement leucocytaire^{528,529}. La modulation du glycome radio-induit constitue donc une opportunité de réduire les dommages radio-induits aux tissus sains.

I.A.2. Existence de modifications du glycome *in vivo* et conséquences sur les lésions tardives ?

Le glycome endothélial a été caractérisé *in vitro*. A présent, il faudrait mettre en évidence de façon certaine une modification de la glycosylation *in vivo*. De plus, en caractérisant les effets fonctionnels résultants, nous aurions l'opportunité de moduler les interactions entre CE irradiées et cellules circulantes. Cette modulation pourrait permettre d'apporter des solutions thérapeutiques pour la prise en charge des effets secondaires. Nous avons déjà évoqué nos tentatives pour mettre en évidence les modifications de la glycosylation *in vivo*. Nous avons identifié les différents points à améliorer pour mettre en évidence des modifications des glycanes et du glycocalyx. Pour la poursuite du projet, il s'agira donc dans un premier temps de mettre en œuvre les solutions proposées dans ce mémoire. Afin de pleinement mettre en évidence l'importance du glycome dans la propagation radio-induite, d'autres expériences pourraient être envisagées.

Concernant le glycocalyx, nous pourrions tenter de mesurer sa modification à la manière des expériences menées par Nieuwdorp *et al.*²⁶⁷ évoquées dans le paragraphe *diabète en partie IV.B.3.* En mesurant l'intégration de traceurs solubles et non solubles (typiquement du dextran 40 ou 70 kDa) dans le glycocalyx, nous pourrions estimer le volume du glycocalyx *in vivo* en condition basale sur des souris. Par la suite, les souris seraient irradiées en TBI, afin d'obtenir une inflammation globale du système vasculaire. La mesure du glycocalyx par traceur pourrait alors être répétée et permettre de confirmer l'existence d'un *shedding* radio-induit. La mesure par traceur pourrait être répétée pour suivre les variations de synthèse ou de dégradation du glycocalyx dans le temps. S'il s'avère que le glycocalyx est atteint lors d'une irradiation TBI, nous pourrions alors essayer de protéger les animaux irradiés contre la dégradation du glycocalyx. Plusieurs drogues et molécules, comme par exemple la Metformine ou l'albumine, ont montrées des effets protecteurs vis-à-vis du *shedding* et ont été testées chez la souris²⁶⁸. Nous pourrions utiliser ces molécules et mesurer leurs effets protecteurs sur le *shedding* radio-induit. Enfin, nous pourrions mettre en place des expériences pour mesurer l'influence de la protection du glycocalyx dans la protection des tissus sains. Par microscopie intravitale, nous pourrions observer l'adhésion des leucocytes dans les artères de souris irradiées avec ou sans traitement protecteur du glycocalyx. Sur les tissus, on pourrait scorer les lésions et mesurer l'infiltrat de cellules inflammatoires. Enfin, nous pourrions simplement suivre la survie des souris irradiées, traitées ou non avec un protecteur du glycocalyx (courbes de survie).

Concernant la modification des motifs glycaniques à la surface des CE, plusieurs points doivent être abordés. La première étape consiste d'abord à identifier *in vivo* des modifications glycaniques afin de connaître les ligands potentiels des cellules circulantes exprimées par les CE. Une fois ces ligands identifiés, plusieurs solutions s'offrent à nous. En microscopie intravitale, sur notre modèle de souris irradiée (au niveau de l'anse intestinale), nous pourrions observer l'adhésion radio-induite. Cette adhésion pourrait être modulée en introduisant chez l'animal des lectines, pour masquer les motifs surexprimés ou bien des sucres compétiteurs comme nous l'avons fait *in vitro*. Nous pourrions également utiliser des chambres de flux *ex vivo*⁵³⁰. Les vaisseaux mésentériques irradiés pourraient être perfusés avec des monocytes ou du sang total et l'adhésion observée en vidéomicroscopie. Le masquage par des lectines ou la compétition par les sucres pourra aussi être utilisé pour attester des effets glycane-dépendants. Pour étudier de manière plus directe le rôle des glycanes dans l'inflammation radio-induite, on pourrait utiliser des souris KO pour les gènes de glycosylation surexprimés après irradiation et ayant un impact fonctionnel potentiel, comme par exemple les Gcnt² (Gcnt 1-3). La solution la plus élégante serait bien sûr la création de souris KO spécifiquement dans l'endothélium en utilisant la méthodologie Cre/LoxP par exemple¹⁵⁴. En supprimant un gène de

² Le Gcnt4 est un gène humain

glycosylation surexprimé après irradiation spécifiquement dans l'endothélium, nous pourrions attester de ses effets dans le recrutement leucocytaire. Comme dans le cas des souris traitées pour la protection du glycocalyx, nous pourrions aussi observer l'évolution des lésions et la survie des souris après irradiation. Si ces expériences aboutissent, nous pourrions proposer des solutions pour améliorer la prise en charge des patients atteints d'effets secondaires des RT. Quelques pistes *in vivo* existent d'ailleurs à ce sujet pour moduler le glycome vasculaire.

1.A.3. Moduler la glycosylation ?

D'un point de vue expérimental, le masquage des ligands glycaniques par un anticorps ou une lectine spécifique peut permettre de diminuer le recrutement leucocytaire. Cette solution a été envisagée et testée *in vivo*. Plusieurs équipes ont généré et testé des compétiteurs synthétiques désignés sous le terme de glycomimétiques. Beaucoup d'entre eux ciblent des motifs Le^x. Si les premiers glycomimétiques testés en clinique n'ont pas démontré d'effets, il suscitent encore aujourd'hui l'intérêt, notamment dans le traitement des cancers et des maladies inflammatoires chroniques^{528,531-533}. Le GMI-1271, un antagoniste de la E-sélectine utilisable dans le traitement de l'AML (*acute myeloid leukemia*) est d'ailleurs en cours d'essai clinique⁵³⁴. La modulation de l'expression des glycanes par action sur les glycosyltransférases apparaît elle aussi comme une solution intéressante^{535,536}. D'autre part, la découverte récente de miRNA modulant la traduction et la transcription des glycosyltransférases permet d'imaginer des thérapies modulatrices du glycome^{226,537}. Dans le cas des CDG ou des LAD (*Leukocyte Adhesion Deficiencies*), l'administration orale de glycanes peut permettre de rétablir des motifs glycaniques « sains »⁵³⁸⁻⁵⁴⁰. Dans le cas des CDG-1b, l'administration orale de mannose permet son augmentation sanguine et réduit les symptômes. Nous pourrions appliquer ce traitement *in vivo*, pour tenter d'obtenir comme dans l'expérience fonctionnelle *in vitro* une diminution de l'adhésion en présence de mannose. Cependant, cette solution pourrait parallèlement augmenter la synthèse endothéliale des N-glycanes hautement mannosylés aux effets délétères.

En contexte inflammatoire, la surexpression endothéliale des N-glycanes hautement mannosylés et l'adhésion leucocytaire résultante sont inhibées par la rosiglitazone, un agoniste de PPAR γ ²³⁶. La fixation de cet agoniste, active la transcription des gènes sous le contrôle de ce récepteur membranaire. Chez les CE, son activation peut être induite par les isoflavones^{345,346}, où elle induit une action anti-inflammatoire et pro-angiogénique^{541,542}. L'activation de PPAR γ permet ainsi la régulation de la signalisation redox par expression d'enzymes antioxydantes, la diminution de l'action de NF- κ B, et l'inhibition de la voie PIK3/AKT/Rac1 par PTEN⁵⁴³. Comme on a pu le voir, ces voies sont activées lors de phénomènes inflammatoires et dans l'endothélium irradié où elles participent à la modulation du glycome. Justement, en RT, les propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes des

ligands de PPAR γ ont été utilisées comme radioprotecteur⁵⁴⁴. Chez la souris en exposition TBI (12 Gy), la rosiglitazone a montré des effets radioprotecteurs sur l'intestin, sans affecter la capacité anticancéreuse des RT⁵⁴⁵. L'administration de rosiglitazone permet la diminution de l'infiltrat inflammatoire. Cela nous laisse penser que la N-glycosylation endothéliale radio-induite a pu être modulée, participant ainsi à l'effet radioprotecteur. De précédents travaux menés à l'IRSN ont montré une diminution du recrutement des macrophages chez le rat à 3 et 7 jours post-irradiation après stimulation de PPAR γ par le 5-ASA (*5-aminosalicylic acid*)⁵⁴⁶. Des marquages par lectines sur les lames utilisées dans cette étude pourraient permettre de déterminer si l'activation de PPAR γ a eu une influence sur la glycosylation endothéliale membranaire et si cette modification est corrélable au recrutement leucocytaire.

1.A.4. Cibler les galectines ?

Pour pleinement apprécier la modulation du glycome endothélial après irradiation et son influence sur le recrutement des cellules circulantes, il faut prendre en compte l'existence du feuillet de galectines à la surface des CE⁵⁴⁷⁻⁵⁴⁹. Les galectines sont un groupe de lectines reconnaissant les motifs β 1-4-N-acétyllactosamines sur les N- et O-glycanes. Elles sont impliquées dans de nombreux processus de signalisation cellulaire et notamment dans l'adaptation au stress. Exprimées par les leucocytes et les CE, ces lectines mono- ou multivalentes permettent des masquages de motifs mais aussi la création d'un lien entre deux glycanes⁵⁵⁰. Elles jouent un rôle important dans les interactions leucocyte-endothélium. La galectine-1 a un rôle anti-inflammatoire car elle participe à l'inhibition de l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium⁵⁵¹. Son expression est augmentée chez les HUVECs en réponse aux stimuli pro-inflammatoires⁵⁵² et après irradiation dans les CE⁵⁵³. Dans le microenvironnement vasculaire tumoral, après RT, la galectine-1 semble agir de concert avec HIF-1 α conduisant à la radiorésistance tumorale⁵⁵⁴. En condition physiologique, on pourrait croire que la surexpression de galectine-1 a un effet régulateur sur l'inflammation. Cependant, la sialylation en α 2-6 observée chez les HUVECs après irradiation provoque chez les leucocytes une diminution de l'adhésion liée à la galectine-1, supprimant l'effet anti-inflammatoire^{555,556}. La galectine-3, quant à elle, est catégorisée comme pro-inflammatoire. Elle favorise le *rolling* et l'adhésion des neutrophiles et des macrophages^{551,557}. Des essais sur des souris déficientes pour le gène *Mgat5* ont montré une diminution du *rolling* des éosinophiles dépendante de la galectine-3⁵⁵⁷. Cette expérience prouve que la modification des N-glycanes, notamment le branchement par la *MGAT5*, semble influencer le *rolling* et l'adhésion des leucocytes dépendante de la galectine-3. Dans le cas des CE irradiées, la diminution des N-glycanes complexes pourrait avoir un effet anti-inflammatoire par diminution de l'adhésion dépendante de cette galectine⁵⁵⁸. Par leur spécificité pour les glycanes et leur action régulatrice sur le recrutement leucocytaire, les galectines pourraient être impliquées dans l'adhésion

radio-induite. La modulation des galectines pourrait être une approche pour éviter le recrutement des leucocytes. Des drogues visant les galectines 1 et 3 sont déjà disponibles⁵⁵⁰ et pourraient être utilisées pour moduler les interactions glycaniques radio-induites.

II. Rôle du sang et des autres protéines circulantes

Si nous avons étudié les modifications du glycome endothélial sur l'adhésion des leucocytes, nous n'avons pas eu l'occasion de nous intéresser aux conséquences fonctionnelles sur les autres cellules circulantes et sur les composés du sang.

II.A. Rôle du sang et des cellules sanguines

Plusieurs travaux ont montré des conséquences des lésions radio-induites sur la modification des protéines du sérum. Des travaux du laboratoire ont mis en évidence des modifications de la glycosylation des protéines sériques chez la souris et chez l'Homme après une irradiation localisée à forte dose³⁷². Chez des patients traités par RT, les protéines du sérum subissent également des modifications de la glycosylation³⁷³. Ces modifications pourraient agir sur le recrutement des cellules circulantes au niveau de la lésion et constituer ainsi un rétro-contrôle⁵⁵⁹⁻⁵⁶¹. Comme dans certains phénomènes inflammatoires, ces modifications pourraient aussi influencer l'adhésion des cellules circulantes⁵⁶². Il faudrait donc compléter notre modèle en incluant le paramètre de la modification radio-induite du sérum. Par exemple, il serait intéressant de vérifier ces hypothèses en utilisant des sérums de patients irradiés dans des expériences d'adhésion leucocytes-endothélium *in vitro*.

In vivo, la modification sérique de la glycosylation en réponse à une irradiation localisée pourrait être attribuée à une réaction hépatique. Des médiateurs de l'inflammation comme IL-1, IL-6 et TNF- α pourraient déclencher une réaction hépatique qui en retour modifie le glycome des protéines sériques via des modifications d'expression de gènes^{372,560}. Le possible *shedding* radio-induit pourrait provoquer la libération des molécules et facteurs retenus par le maillage du glycocalyx. Cette libération soudaine pourrait participer à l'initiation de la réaction hépatique. D'autre part, certaines molécules comme le TFPI ou l'antithrombine III, impliquées dans la régulation de la coagulation, sont liées à l'endothélium par des HS^{79,563}. Le *shedding* radio-induit pourrait participer à la perte des fonctions thrombo-résistantes chez l'endothélium irradié.

II.B. Interactions CE - plaquette : thrombose

Après irradiation, l'endothélium présente un phénotype propice au recrutement des thrombocytes, qui devient donc pro-coagulant^{429,564}. En conséquence, l'augmentation radio-induite de l'adhésion des plaquettes a pu être observée *in vitro*¹⁸⁹ et chez la souris¹⁵⁹. La mort des CE^{106,131}, l'activation de la voie de la protéine C⁵⁶⁵ et la surexpression de PAI-1^{154,157} et de vWF¹⁵⁸ participent activement à ce phénotype pathologique. La persistance du phénotype pro-thrombotique a été reliée aux

complications des RT^{369,565,566}. Plusieurs travaux suggèrent son implication dans l'apparition de la fibrose radio-induite^{154,567}. D'autre part, plusieurs travaux montrent que la glycosylation endothéliale influence le recrutement des thrombocytes⁵⁶⁸. En effet, l'endothélium et les plaquettes expriment la P-sélectine et son ligand PSGL-1, porteur du sLe^X. L'endothélium irradié surexprime la P-sélectine, ce qui permet le recrutement des plaquettes¹⁸⁵. D'autre part, nous avons évoqué l'augmentation possible du motif sLe^X dans notre modèle HUVECs. Cette modification glycanique pourrait aussi participer à l'adhésion des plaquettes. Des travaux menés à l'IRSN ont montré l'importance de PECAM-1 dans l'adhésion radio-induite des plaquettes¹⁶⁰. Là encore, la glycosylation de PECAM-1, et notamment l'augmentation de sa sialylation en α 2-6, pourrait jouer un rôle dans la thrombose radio-induite. Le vWF est sécrété par les CE et les plaquettes. Sa glycosylation a démontré des effets sur la thrombose. Le vWF est exprimé sous plusieurs isoformes glycosylées. Les isoformes endothéliales fortement glycosylées ont un pouvoir coagulant plus important^{569,570}. L'activité de la machinerie de glycosylation pourrait donc moduler la coagulation. Sur la forme plaquettaire, la sialylation sur ses N-glycanes augmente la résistance du vWF à la protéolyse⁵⁷¹. Cela pourrait aussi être le cas sur la forme endothéliale, ce qui expliquerait un maintien de la coagulation.

Au vu de ces données et de la modulation de la glycosylation provoquée par l'irradiation, il serait intéressant d'évaluer l'influence de la glycosylation radio-induite sur la thrombose. Les résultats obtenus pourraient offrir de nouvelles cibles thérapeutiques pour moduler les effets secondaires de la radiothérapie.

III. Sénescence

III.A. Sénescence endothéliale radio-induite

L'irradiation des HUVECs à 20 Gy provoque la mort de 95 % des cellules du tapis irradié au bout de 2-3 semaines de culture. Les cellules qui subsistent présentent toutes les caractéristiques de cellules sénescents (augmentation de p21, p16, et de l'activité β -galactosidase, arrêt de la prolifération). La sénescence correspond à la perte définitive de la capacité proliférative des cellules. Elles restent viables et métaboliquement actives. Ce phénomène intervient naturellement au terme d'un certain nombre de divisions cellulaires (sénescence répllicative ou liée à l'âge). Il apparaît prématurément en réponse à un stimulus : sénescence prématurée induite par un stress (SIPS, *Stress-induced premature senescence*). Les stress inflammatoires et la modification de l'homéostasie des ROS sont particulièrement susceptibles d'induire la sénescence⁵⁷². La SIPS est un mécanisme cellulaire essentiel dans le contrôle de la tumorigenèse et des dommages tissulaires⁵⁷³. En effet le système immunitaire reconnaît et attaque les cellules sénescents pour éviter leur accumulation.

Plusieurs travaux récents décrivent l'existence d'une sénescence endothéliale radio-induite (SERI). La SERI a pu être observée *in vitro* sur les HUVECs⁵⁷⁴, les CE artérielles pulmonaires⁵¹², et les CE d'artères coronaires (HCAECs)⁴⁶⁰. *In vitro*, il semble que pour de fortes doses (>10 Gy), une grande partie des CE entre en apoptose (dépendante de la voie des céramides). Cependant, des doses plus faibles (0,5-10 Gy) induisent majoritairement la sénescence. Plusieurs voies de signalisation activées chez les CE en réponse aux RI sont capables d'induire la SERI. On note particulièrement les voies mTOR et ATM activatrices de p53, mais aussi le rôle des ROS et du TGF- β ¹⁰⁸ (voir *Figure 39*).

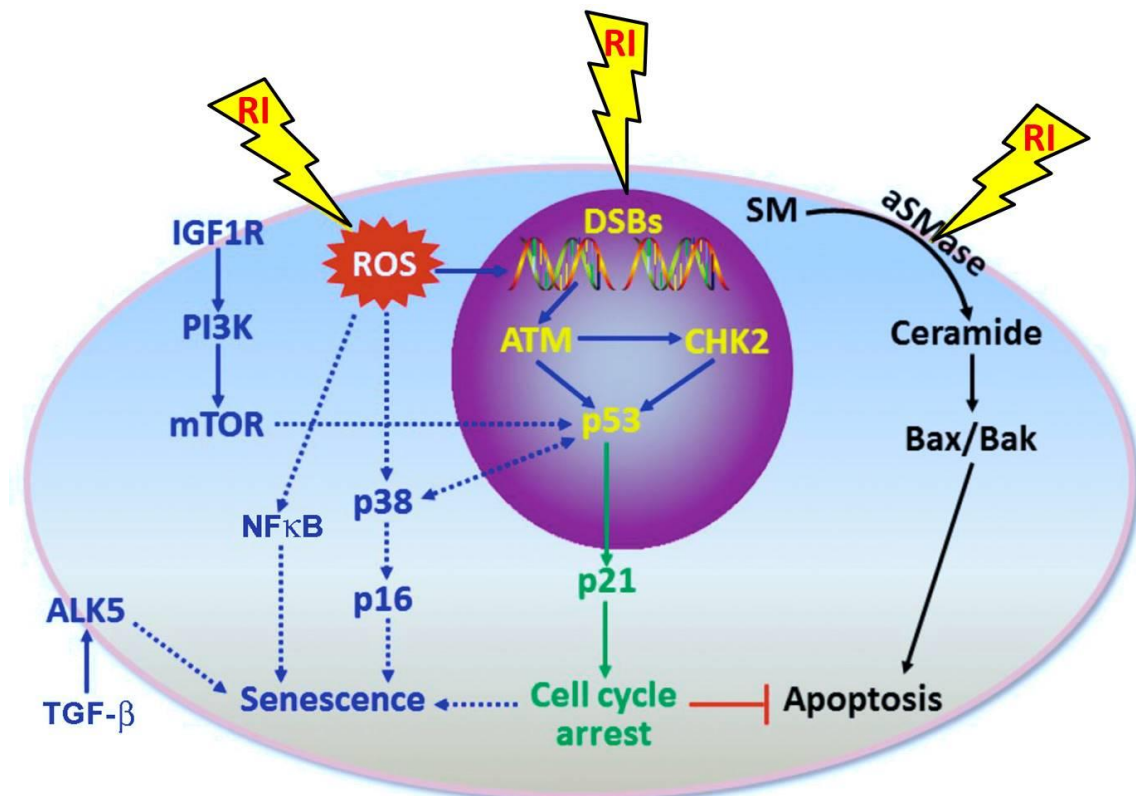


Figure 39 : principales voies d'induction de la sénescence endothéliale radio-induite (d'après Wang *et al.*¹⁰⁸).

ALK5 : TGF- β type 1 receptor kinase; ATM: ataxia-telangiectasia mutated protein kinase; CHK2: checkpoint kinase 2; DSBs: double cassure à l'ADN; IGF1R: insulin-like factor-1 receptor; mTOR: mammalian target of rapamycin; NF- κ B: nuclear factor κ B; p38: p38 mitogen-activated protein kinases; PI3K: Phosphoinositide-3-kinase; ROS: espèces réactives de l'oxygène; TGF- β : tumor growth factor β .

Aucune étude ne décrit à ce jour la présence de CE sénescents *in vivo*, ni les conséquences fonctionnelles de cette sénescence. Cependant, chez la souris, les cellules microvasculaires cardiaques présentent des caractéristiques moléculaires de SERI après irradiation⁵⁷⁵. La SERI pourrait induire une désactivation de la signalisation dépendante de l'insuline et inhiber les voies PI3K et MAPK. L'inhibition de la voie PI3K pourrait mener à la désactivation de eNOS. Quant à l'inhibition de la voie MAPK, elle induirait une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (voir *Figure 40*). Les mécanismes décrits dans la SERI, *in vivo* et *in vitro*, participent à la dysfonction du tonus vasculaire (vasodilatation due à diminution du NO), à la surexpression des ROS et des cytokines

pro-inflammatoires, et à la diminution de l'angiogénèse. La SERI pourrait donc être impliquée dans les effets secondaires des RT comme les maladies cardio-vasculaires^{108,575} ou encore la fibrose⁵⁷⁶.

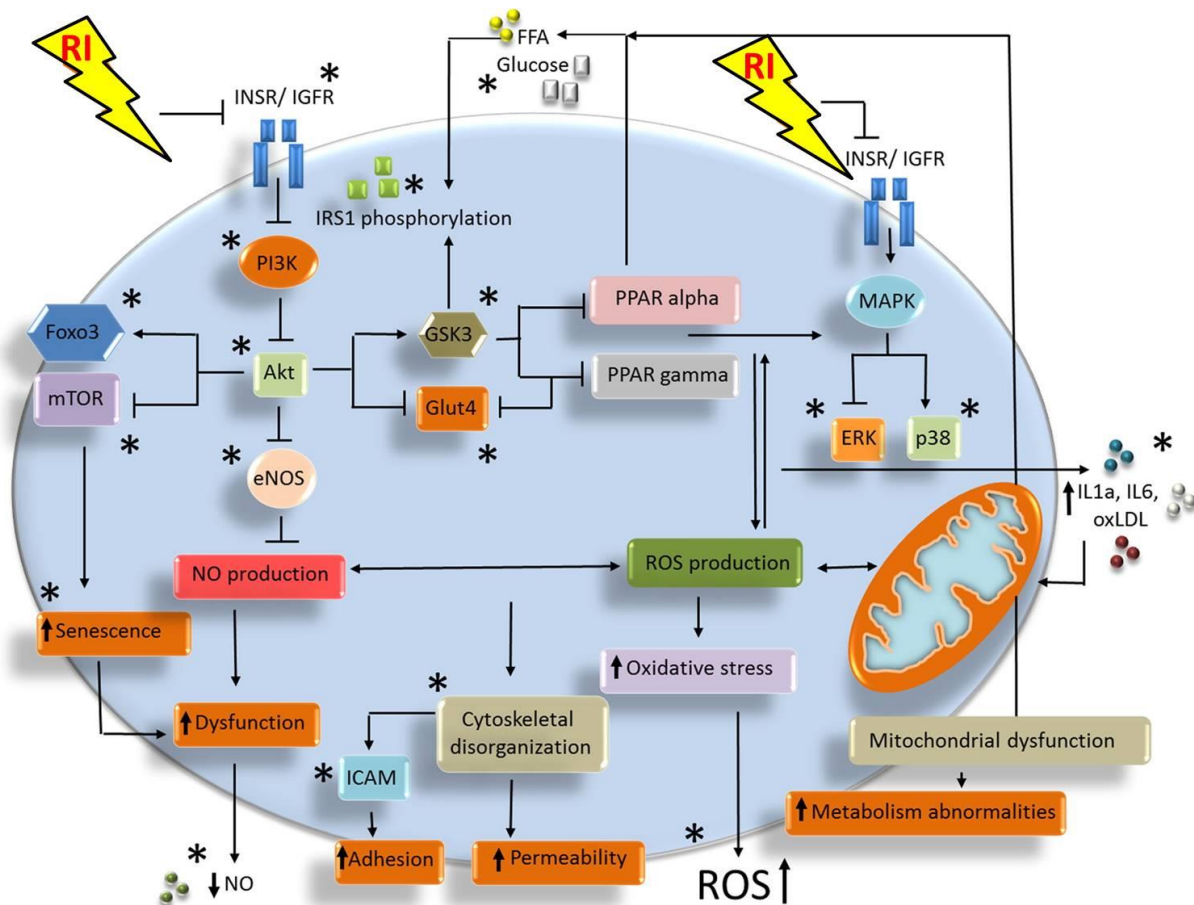


Figure 40 : mécanismes radio-induits participant à la SERI (d'après Azimzadeh *et al.*⁵⁷⁵).

La particularité des cellules sénescentes est d'adopter un phénotype sécrétoire particulier : le SASP (*senescence-associated secretory phenotype*) ou SMS (*Senescence Messaging Secretome*). Le SASP est majoritairement composé de cytokines (IL-1, IL-6), chimiokines (IL-8), de facteurs inflammatoires (IFN- γ), de facteurs de croissance (VEGF, FGF), de protéases et régulateurs de protéases (dont les MMP et le TIMP)^{573,577}. De par sa composition, le SASP est résolument pro-inflammatoire et promeut le recrutement des cellules immunitaires. Il impacte le microenvironnement cellulaire et peut compromettre le fonctionnement des cellules voisines. Il est ainsi mis en cause dans la tumorigénèse⁵⁷⁸ et dans les maladies cardio-vasculaires⁵⁷⁹. Ce phénotype sécrétoire participe à la transmission de phénotypes pathologiques entre les cellules irradiées sénescentes et les cellules saines adjacentes (effets *bystanders*). Ce mécanisme passe par des modifications du métabolisme des sucres⁵⁸⁰. Le SASP chez les CE irradiées pourrait donc activement participer à la propagation et au maintien de l'inflammation radio-induite.

III.B. Existence de modifications du glycome dues à la sénescence ?

Plusieurs études suggèrent que l'induction de la sénescence par l'âge ou par le stress a des conséquences sur la glycosylation. De manière générale, le glycome est considéré comme un marqueur intéressant dans le suivi du vieillissement, car sa modification est associée au processus de sénescence⁵⁸¹. Par exemple, les HUVECs sénescents sous-expriment le gène *Man1a1*⁵⁸², ce que nous avons aussi observé dans l'irradiation. Une récente étude *in vitro* sur un modèle de fibroblastes primaires révèle que la sénescence liée à l'âge modifie significativement la glycosylation. La sénescence induit une baisse de l' α 2-3 sialylation des O-glycanes. D'une manière générale, le vieillissement cellulaire induit une diminution de la sialylation⁵⁸³. La diminution du branchement et le raccourcissement des antennes des N-glycanes par la non-présence de galactose et de sialylation sont retrouvés au niveau sérique sur les IgG. Ce phénomène a été corrélé à l'âge et aux maladies inflammatoires chroniques⁵⁸⁴.

De manière similaire, la SERI induit un grand nombre de mécanismes que nous avons par ailleurs reliés à des modifications de la glycosylation. Nous avons notamment évoqué l'action de la GOLPH3. En réponse aux RI, elle promeut une dispersion Golgienne via la voie GOLPH3/MYO18A/F-actine et induit la survie cellulaire. D'autre part, cette même protéine participe à l' α 2-6 sialylation des intégrines et pourrait impliquer la voie PI3K/AKT/mTOR, qui est aussi impliquée dans la sénescence. Les rôles du TGF- β , du NF- κ B, des ROS et des récepteurs PPAR γ , tous induits par la SERI, ont été évoqués comme influençant le glycome.

Il est tentant d'envisager la modification du glycome comme une simple conséquence de la sénescence. Cependant, il semble que le lien entre sénescence et glycosylation soit plus complexe. Par exemple, la sous-unité ATP6V0A2 de l'ATPase vacuolaire participe à la balance acido-basique des organelles comme le Golgi, les lysosomes et l'endosome. Le défaut de cette sous-unité a été relié à des défauts de glycosylation. La diminution de l'ATP6V0A2 provoque un phénotype comparable à celui de cellules sénescents et influence la glycosylation. La sous-unité ATP6V0A2 semble contrôler en partie l'entrée en sénescence à travers le contrôle du pH Golgien et les modifications de glycosylation en résultant⁵⁸⁵. Au niveau du glycocalyx, la suppression des HS sur des CE jeunes élève les forces de traction intracellulaire et épaissit les filaments d'actine. Alors que, sur les CE âgées, l'addition de HS induit le résultat inverse. L'activité de la SIRT1 (sirtuin1), une désacétylase présente dans le glycocalyx, semble jouer un rôle déterminant dans la régulation des forces de traction⁵⁸⁶. La sénescence agit sur le glycome, mais l'inverse est aussi vrai.

III.C. Intérêt dans la modulation du recrutement des leucocytes

La sénescence des CE est depuis longtemps connue pour influencer positivement le recrutement leucocytaire⁵⁸⁷. La SERI induit elle aussi le recrutement des leucocytes. Elle est associée à l'adhésion des leucocytes préférentiellement sur les cellules sénescents (formation de *clusters*)⁴⁶⁰. La formulation pro-inflammatoire du SASP participe à cette augmentation de l'adhésion. Dans la SERI, l'augmentation de l'expression d'ICAM-1 et -2 a été démontrée⁵⁷⁵. Il apparaît que le système immunitaire cherche systématiquement à éliminer les cellules sénescents. Ce processus est dénommé immuno-modulation ou immunosurveillance^{588,589}. Les CE sénescents sont ainsi détectés par un large spectre de cellules immunitaires : leucocytes NK, phagocytes, cellules dendritiques lymphocytes B et lymphocytes T^{573,589}. Dans les maladies liées à l'âge, il semble que le système d'immunosurveillance devienne lui-même sénescents. Les cellules sénescents ne sont plus éliminées et leur part augmente dans les tissus, ce qui participe à l'inflammation chronique due au SASP et à l'apparition d'effets délétères.

Sur l'endothélium irradié, il a récemment été montré que la SERI induit une surexpression de CD44, provoquant une augmentation de l'adhésion des leucocytes⁴⁶⁰. CD44 peut porter les motifs sLe^x. La modulation de ses glycanes pourrait influencer l'adhésion aux sélectines. L'irradiation induit chez les CE la réorganisation de la membrane plasmique et notamment la fusion des radeaux lipidiques¹⁰⁶. Or le CD44 est justement concentré dans ces radeaux lipidiques²⁷⁶. Le rassemblement des CD44 membranaires dû à la fusion des radeaux lipidiques pourrait expliquer la présence de « clusters » d'adhésion chez les CE irradiées sénescents. De plus, CD44 est le support des HA, la répartition non homogène des CD44 sur la membrane des CE pourrait désorganiser le glycocalyx et participer au *shedding*.

Dans le cas des effets secondaires des RT, il serait intéressant d'évaluer l'importance de la SERI dans le recrutement des cellules immunitaires. Il faudrait également caractériser le glycome des CE sénescents et voir s'il influence le recrutement et/ou l'entrée en sénescence. Prendre spécifiquement pour cibles les CE sénescents offrirait l'opportunité de réduire les effets secondaires des RT.

Conclusion générale

Ce travail de thèse a contribué à parfaire la connaissance des effets de l'irradiation sur l'endothélium. Pour la première fois, la dimension glycanique a été intégrée. Nous avons identifié, *in vitro*, une signature glycanique radio-induite. Nous avons également mise en place des méthodes permettant la caractérisation glycanique chez l'Homme et la souris. Les modifications du glycome ont pu être reliées aux mécanismes radio-induits.

Nous avons lié les modifications glycaniques observées à une augmentation du recrutement des monocytes en condition dynamique. La modification de la glycosylation a donc des conséquences fonctionnelles et participe à l'établissement du phénotype pro-inflammatoire radio-induit. Les motifs glycaniques identifiés pourraient à l'avenir constituer des cibles thérapeutiques. Ainsi, la modulation du glycome pourrait constituer une solution pour éviter le recrutement chronique des cellules circulantes et limiter leurs effets délétères.

Cette thèse souligne l'importance de la glycosylation dans les processus radio-induits. Dans les travaux sur l'inflammation, le cancer et la sénescence, les modifications de la glycosylation et leurs effets occupent une place grandissante. En radiobiologie, l'intégration de la glycosylation dans le continuum d'évènements menant aux effets secondaires pourrait améliorer la compréhension des pathologies radio-induites. La prise en compte de l'information portée par le glycome pourrait éclaircir nos connaissances sur la genèse et l'évolution des dommages radio-induits, offrant ainsi la possibilité de mieux soigner les patients.

Références

I. Bibliographie

1. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire. *Exposition de la population française aux rayonnements ionisants Rapport IRSN/2015-00001*. **V1**, (2015).
2. IRSN. *Les accidents dus aux rayonnements ionisants - Rapport IRSN-2007/79-FR*. (2007).
3. Nénot, J.-C. Radiation accidents over the last 60 years. *J. Radiol. Prot. J. Radiol. Prot* **29**, 301–320 (2009).
4. Azzam, E. I., Jay-Gerin, J.-P. & Pain, D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.* **327**, 48–60 (2012).
5. Hall, E. J. & Giaccia, A. J. *Radiobiology for the Radiologist*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2012).
6. Dobretsov, G. E., Borschevskaya, T. A., Petrov, V. A. & Vladimirov, Y. A. The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation. *FEBS Lett.* **84**, 125–128 (1977).
7. Reisz, J. A., Bansal, N., Qian, J., Zhao, W. & Furdul, C. M. Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 260–92 (2014).
8. Jackson, S. P. & Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071–8 (2009).
9. Turesson, I. *et al.* Biological response to radiation therapy. *Acta Oncol.* **42**, 92–106 (2003).
10. Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J. & Wang, H. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* **22**, 5834–5847 (2003).
11. Verheij, M. & Bartelink, H. Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res.* **301**, 133–42 (2000).
12. Galluzzi, L. *et al.* Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* **14**, 1237–1243 (2007).
13. Vignard, J., Mirey, G. & Salles, B. Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: A direct and indirect lighting up. *Radiother. Oncol.* **108**, 362–369 (2013).
14. Santivasi, W. L. & Xia, F. Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 251–9 (2014).
15. Paris, F. *et al.* Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* **293**, 293–7 (2001).
16. François, A., Milliat, F., Vozenin-Brotons, M. C., Mathe, D. & Griffiths, N. M. 'In-field' and 'out-of-field' functional impairment during subacute and chronic phases of experimental radiation enteropathy in the rat. *Int. J. Radiat. Biol.* **79**, 437–50 (2003).
17. Strom, D. J. *Health Impacts from Acute Radiation Exposure*. (2003).
18. WHO. Fact sheet N°297 : Cancer. (2015). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. (Accessed: 27th April 2015)
19. Institut National du Cancer. Les cancers en France en 2015 - L'essentiel des faits et chiffres. (2015).
20. Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C. & Barton, M. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer* **104**, 1129–37 (2005).
21. Institut national du cancer (INCa). LES DONNÉES LES CANCERS EN FRANCE - Édition 2015. 240 (2016).
22. Ortholan, C., Estivalet, S. & Barillot, I. Guide des procédures de radiothérapie externe 2007. *Société Française de Radiothérapie Oncologique* (2007).
23. Brizel, D. M. Pharmacologic Approaches to Radiation Protection. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4084–4089 (2007).
24. Burnet, N. G., Thomas, S. J., Burton, K. E. & Jefferies, S. J. Defining the tumour and target volumes for radiotherapy. *Cancer Imaging* **4**, 153–61 (2004).
25. Cosset, J.-M. [Side effects of ionizing radiation on healthy tissues and organs at risk]. *Cancer Radiother.* **14**, 228–31 (2010).
26. Shrieve, D. C. & Loeffler, J. *Human Radiation Injury*. (Wolters Kluwer, 2010).
27. Hennequin, C. & Dubray, B. Le rapport alpha/bêta revisité à l'heure de l'hypofractionnement. *Cancer/Radiothérapie* **17**, 344–348 (2013).

28. Cosset, J.-M., Mornex, F. & Eschwège, F. Hypofractionnement en radiothérapie : l'éternel retour. *Cancer/Radiothérapie* **17**, 355–362 (2013).
29. Shibamoto, Y. *et al.* Radiobiological evaluation of the radiation dose as used in high-precision radiotherapy: effect of prolonged delivery time and applicability of the linear-quadratic model. *J. Radiat. Res.* **53**, 1–9 (2012).
30. INCA. Techniques de Radiothérapies. (2016). Available at: <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Se-faire-soigner/Traitements/Radiotherapie/Techniques>. (Accessed: 19th July 2016)
31. Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R. & Yeoh, K.-W. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *Int. J. Med. Sci.* **9**, 193–199 (2012).
32. Favaudon, V. *et al.* Ultrahigh dose-rate FLASH irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice. *Sci. Transl. Med.* **6**, 245ra93-245ra93 (2014).
33. Orecchia, R. *et al.* Particle beam therapy (hadrontherapy): basis for interest and clinical experience. *Eur. J. Cancer* **34**, 459–68 (1998).
34. Puck, T. T. & Marcus, P. I. Action of x-rays on mammalian cells. *J. Exp. Med.* **103**, 653–66 (1956).
35. Bentzen, S. M. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 702–13 (2006).
36. Denham, J. W., Hauer-Jensen, M. & Peters, L. J. Is it time for a new formalism to categorize normal tissue radiation injury? *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* **50**, 1105–1106 (2001).
37. Han, D., Ybanez, M. D., Ahmadi, S., Yeh, K. & Kaplowitz, N. Redox regulation of tumor necrosis factor signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 2245–63 (2009).
38. Yamamoto, T., Eckes, B., Mauch, C., Hartmann, K. & Krieg, T. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 alpha loop. *J. Immunol.* **164**, 6174–9 (2000).
39. Yuan, H. *et al.* Radiation-induced permeability and leukocyte adhesion in the rat blood–brain barrier: modulation with anti-ICAM-1 antibodies. *Brain Res.* **969**, 59–69 (2003).
40. Sitko, J. C. *et al.* SOCS3 regulates p21 expression and cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cell. Signal.* **20**, 2221–30 (2008).
41. Schaeue, D., Kachikwu, E. E. L. & McBride, W. H. W. Cytokines in radiobiological responses: a review. *Radiat. Res.* **178**, 505–23 (2012).
42. Zhao, W. & Robbins, M. E. C. Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: therapeutic implications. *Curr. Med. Chem.* **16**, 130–43 (2009).
43. Szumiel, I. International Journal of Radiation Biology Ionizing radiation-induced oxidative stress, epigenetic changes and genomic instability: The pivotal role of mitochondria. *Int. J. Radiat. Biol.* **911**, 1–12 (2015).
44. Jackson, I. L. *et al.* Temporal expression of hypoxia-regulated genes is associated with early changes in redox status in irradiated lung. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 337–46 (2012).
45. Vaupel, P., Mayer, A., Briest, S. & Höckel, M. Hypoxia in breast cancer: Role of blood flow, oxygen diffusion distances, and anemia in the development of oxygen depletion. *Adv. Exp. Med. Biol.* **566**, 333–342 (2005).
46. Williams, J. P. *et al.* Addressing the Symptoms or Fixing the Problem? Developing Countermeasures against Normal Tissue Radiation Injury. *Radiat. Res.* **186**, 1–16 (2016).
47. Anscher, M. Hypoxia-Mediated Chronic Normal Tissue Injury. *Late Eff. Cancer Treat. Norm. Tissues* **2**, 433–4, 437 (2008).
48. Bubici, C., Papa, S., Dean, K. & Franzoso, G. Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance. *Oncogene* **25**, 6731–48 (2006).
49. Fujino, G., Noguchi, T., Takeda, K. & Ichijo, H. Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. *Semin. Cancer Biol.* **16**, 427–35 (2006).
50. Shakibaei, M., Schulze-Tanzil, G., Takada, Y. & Aggarwal, B. B. Redox regulation of apoptosis by members of the TNF superfamily. *Antioxid. Redox Signal.* **7**, 482–96 (2005).
51. Chiang, C. S. & McBride, W. H. Radiation enhances tumor necrosis factor alpha production by murine brain cells. *Brain Res.* **566**, 265–9 (1991).
52. Johnston, C. J., Williams, J. P., Okunieff, P. & Finkelstein, J. N. Radiation-induced pulmonary fibrosis: examination of chemokine and chemokine receptor families. *Radiat. Res.* **157**, 256–65 (2002).

53. Westbrook, A. M. *et al.* The role of tumour necrosis factor- α and tumour necrosis factor receptor signalling in inflammation-associated systemic genotoxicity. *Mutagenesis* **27**, 77–86 (2012).
54. Kriegs, M. *et al.* The epidermal growth factor receptor modulates DNA double-strand break repair by regulating non-homologous end-joining. *DNA Repair (Amst)*. **9**, 889–97 (2010).
55. Ohshima, Y. *et al.* gamma-Irradiation induces P2X(7) receptor-dependent ATP release from B16 melanoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1800**, 40–6 (2010).
56. Miller, Y. I. *et al.* Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circ. Res.* **108**, 235–48 (2011).
57. Schaue, D. *et al.* Radiation and Inflammation. *Semin. Radiat. Oncol.* **25**, 4–10 (2015).
58. Rodemann, H. P. & Blaese, M. a. Responses of normal cells to ionizing radiation. *Semin. Radiat. Oncol.* **17**, 81–8 (2007).
59. Hekim, N., Cetin, Z., Nikitaki, Z., Cort, A. & Saygili, E. I. Radiation triggering immune response and inflammation. *Cancer Lett.* **368**, 156–163 (2015).
60. Schaue, D. & McBride, W. Links between innate immunity and normal tissue radiobiology. *Radiat. Res.* **173**, 406–17 (2010).
61. Ehrhart, E. J., Segarini, P., Tsang, M. L., Carroll, A. G. & Barcellos-Hoff, M. H. Latent transforming growth factor beta1 activation in situ: quantitative and functional evidence after low-dose gamma-irradiation. *FASEB J.* **11**, 991–1002 (1997).
62. McBride, W. H. *et al.* A sense of danger from radiation. *Radiat. Res.* **162**, 1–19 (2004).
63. Reth, M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat. Immunol.* **3**, 1129–1134 (2002).
64. Wirsdörfer, F. *et al.* Thorax irradiation triggers a local and systemic accumulation of immunosuppressive CD4+ FoxP3+ regulatory T cells. *Radiat. Oncol.* **9**, 98 (2014).
65. Scheithauer, H. *et al.* Immunological aspects of radiotherapy. *Radiat. Oncol.* **9**, 185 (2014).
66. Chiang, C.-S. *et al.* Compartmental responses after thoracic irradiation of mice: strain differences. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **62**, 862–71 (2005).
67. Kachikwu, E. L. *et al.* Radiation enhances regulatory T cell representation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **81**, 1128–35 (2011).
68. François, A., Milliat, F., Guipaud, O. & Benderitter, M. Inflammation and immunity in radiation damage to the gut mucosa. *Biomed Res. Int.* **2013**, 123241 (2013).
69. Hojan, K. & Milecki, P. Opportunities for rehabilitation of patients with radiation fibrosis syndrome. *Reports Pract. Oncol. Radiother. J. Gt. Cancer Cent. Pozn. Polish Soc. Radiat. Oncol.* **19**, 1–6 (2014).
70. Pohlers, D. *et al.* TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 746–56 (2009).
71. Lawrence, D. A. Latent-TGF-beta: an overview. *Mol. Cell. Biochem.* **219**, 163–70 (2001).
72. Kinnula, V. L. & Crapo, J. D. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**, 1600–19 (2003).
73. Denham, J. W. & Hauer-Jensen, M. The radiotherapeutic injury – a complex ‘wound’. *Radiother. Oncol.* **63**, 129–145 (2002).
74. Adair, T. H. & Montani, J.-P. in *Angiogenesis*. (Morgan & Claypool Life Sciences, 2010).
75. Yuan, S. & Rigor, R. in *Regulation of Endothelial Barrier Function* (Morgan & Claypool Life Sciences, 2010).
76. Félétoù, M. *The Endothelium Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators* (Morgan & Claypool Life Sciences, 2011).
77. Sandoo, A., van Zanten, J. J. C. S. V., Metsios, G. S., Carroll, D. & Kitas, G. D. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc. Med. J.* **4**, 302–12 (2010).
78. Michiels, C. Endothelial cell functions. *J. Cell. Physiol.* **196**, 430–443 (2003).
79. Pober, J. S. & Sessa, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* **7**, 803–815 (2007).

80. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 678–89 (2007).
81. Nourshargh, S. & Alon, R. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity* **41**, 694–707 (2014).
82. Kansas, G. S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* **88**, 3259–87 (1996).
83. Granger, D. N. & Senchenkova, E. Leukocyte–Endothelial Cell Adhesion. *Inflamm. Microcirc.* (2010).
84. Zarbock, A., Ley, K., McEver, R. P. & Hidalgo, A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* **118**, 6743–51 (2011).
85. Herter, J. & Zarbock, A. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. *J Immunol* **190**, 4451–4457 (2013).
86. Shaw, S. K., Bamba, P. S., Perkins, B. N. & Lusciuskas, F. W. Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J. Immunol.* **167**, 2323–30 (2001).
87. Muller, W. A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* **24**, 327–34 (2003).
88. Nourshargh, S., Krombach, F. & Dejana, E. The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 714–8 (2006).
89. Hordijk, P. L. Recent insights into endothelial control of leukocyte extravasation. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 1591–1608 (2016).
90. DiStasi, M. R. & Ley, K. Opening the flood-gates: how neutrophil-endothelial interactions regulate permeability. *Trends Immunol.* **30**, 547–56 (2009).
91. Muller, W. A. Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet. Pathol.* **50**, 7–22 (2013).
92. Thomas, W. Catch bonds in adhesion. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **10**, 39–57 (2008).
93. Liao, J. K. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *J. Clin. Invest.* **123**, 540–1 (2013).
94. Sun, L. & Ye, R. D. Role of G protein-coupled receptors in inflammation. *Acta Pharmacol. Sin.* **33**, 342–350 (2012).
95. Mai, J., Virtue, A., Shen, J., Wang, H. & Yang, X.-F. An evolving new paradigm: endothelial cells--conditional innate immune cells. *J. Hematol. Oncol.* **6**, 61 (2013).
96. Shiao, S. L., McNiff, J. M. & Pober, J. S. Memory T cells and their costimulators in human allograft injury. *J. Immunol.* **175**, 4886–96 (2005).
97. Costa, C., Incio, J. & Soares, R. Angiogenesis and chronic inflammation: Cause or consequence? *Angiogenesis* **10**, 149–166 (2007).
98. Naldini, A. & Carraro, F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy* **4**, 3–8 (2005).
99. Steyers, C. M., Miller, F. J., Miller, F. J. & Jr. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 11324–49 (2014).
100. Puissant, C. *et al.* La fonction endothéliale : rôle, méthodes d'évaluation et limites. *J. Mal. Vasc.* **39**, 47–56 (2014).
101. Fajardo, L. F. The pathology of ionizing radiation as defined by morphologic patterns. *Acta Oncol.* **44**, 13–22 (2005).
102. Borghini, A., Luca Gianicolo, E. A., Picano, E. & Andreassi, M. G. Ionizing radiation and atherosclerosis: Current knowledge and future challenges. *Atherosclerosis* **230**, 40–47 (2013).
103. Weintraub, N. L., Jones, W. K. & Manka, D. Understanding Radiation-Induced Vascular Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **55**, 1237–1239 (2010).
104. Gaugler, M.-H. A unifying system: does the vascular endothelium have a role to play in multi-organ failure following radiation exposure? *Br. J. Radiol. Supplement*, 100–105 (2005).
105. Korpela, E. & Liu, S. K. Endothelial perturbations and therapeutic strategies in normal tissue radiation damage. *Radiat. Oncol.* **9**, 266 (2014).
106. Corre, I., Guillonneau, M. & Paris, F. Membrane signaling induced by high doses of ionizing radiation in the endothelial compartment. Relevance in radiation toxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 22678–22696 (2013).
107. Milliat, F., François, a, Tamarat, R. & Benderitter, M. [Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages]. *Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris)*. **57**, 139–48 (2008).
108. Wang, Y., Boerma, M. & Zhou, D. Ionizing Radiation-Induced Endothelial Cell Senescence and Cardiovascular Diseases. *Radiat. Res.* **186**, 153–161 (2016).

109. Milliat, F. *et al.* Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation: implication in radiation-induced vascular damages. *Am. J. Pathol.* **169**, 1484–95 (2006).
110. Wang, J., Zheng, H., Ou, X., Fink, L. M. & Hauer-Jensen, M. Deficiency of microvascular thrombomodulin and up-regulation of protease-activated receptor-1 in irradiated rat intestine: possible link between endothelial dysfunction and chronic radiation fibrosis. *Am. J. Pathol.* **160**, 2063–72 (2002).
111. Richter, K. K. *et al.* Differential effect of radiation on endothelial cell function in rectal cancer and normal rectum. *Am. J. Surg.* **176**, 642–7 (1998).
112. Gaugler, M. H. *et al.* 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**, 201–9 (1997).
113. Peña, L. A., Fuks, Z. & Kolesnick, R. N. Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency. *Cancer Res.* **60**, 321–7 (2000).
114. Qiu, J., Li, J. & He, T.-C. Endothelial cell damage induces a blood-alveolus barrier breakdown in the development of radiation-induced lung injury. *Asia. Pac. J. Clin. Oncol.* **7**, 392–8 (2011).
115. Fuks, Z., Alfieri, A., Haimovitz-Friedman, A., Seddon, A. & Cordon-Cardo, C. Intravenous basic fibroblast growth factor protects the lung but not mediastinal organs against radiation-induced apoptosis in vivo. *Cancer J. Sci. Am.* **1**, 62–72
116. Haimovitz-Friedman, A. *et al.* Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J. Exp. Med.* **180**, 525–35 (1994).
117. Milhas, D., Clarke, C. J. & Hannun, Y. A. Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: implications for bioactive sphingolipids. *FEBS Lett.* **584**, 1887–94 (2010).
118. Kolesnick, R. N., Goñi, F. M. & Alonso, A. Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J. Cell. Physiol.* **184**, 285–300 (2000).
119. Rotolo, J. *et al.* Anti-ceramide antibody prevents the radiation gastrointestinal syndrome in mice. *J. Clin. Invest.* **122**, 1786–1790 (2012).
120. Liao, W. C. *et al.* Ataxia telangiectasia-mutated gene product inhibits DNA damage-induced apoptosis via ceramide synthase. *J. Biol. Chem.* **274**, 17908–17 (1999).
121. Ch'ang, H.-J. *et al.* ATM regulates target switching to escalating doses of radiation in the intestines. *Nat. Med.* **11**, 484–90 (2005).
122. Garcia-Barros, M. *et al.* Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* **300**, 1155–9 (2003).
123. Supiot, S. & Paris, F. [Radiobiology dedicated to endothelium]. *Cancer radiothérapie J. la Société Fr. radiothérapie Oncol.* **16**, 11–5 (2012).
124. Schuller, B. W. *et al.* Selective irradiation of the vascular endothelium has no effect on the survival of murine intestinal crypt stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 3787–3792 (2006).
125. Schuller, B. W. *et al.* No significant endothelial apoptosis in the radiation-induced gastrointestinal syndrome. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **68**, 205–10 (2007).
126. Hendry, J. H., Dörr, W., Hill, R. P. & Potten, C. S. No Apoptotic Endothelial Cells in Irradiated Intestine: Regarding Schuller et al. (*Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;68:205–210). *Int. J. Radiat. Oncol.* **70**, 801–802 (2008).
127. Gudkov, A. V. & Gleiberman, A. In Regard to Schuller et al. (*Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;68:205–210). *Int. J. Radiat. Oncol.* **70**, 800–801 (2008).
128. Brown, M. What causes the radiation gastrointestinal syndrome?: overview. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **70**, 799–800 (2008).
129. François, A. & Milliat, F. Syndrome gastro-intestinal radio-induit : à qui la faute ? *médecine/sciences* **26**, 449–452 (2010).
130. Kirsch, D. G. *et al.* p53 controls radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice independent of apoptosis. *Science* **327**, 593–6 (2010).
131. Corre, I., Niaudet, C. & Paris, F. Plasma membrane signaling induced by ionizing radiation. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **704**, 61–67 (2010).
132. Rousseau, M. *et al.* RhoA GTPase regulates radiation-induced alterations in endothelial cell adhesion and migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **414**, (2011).

133. Zhang, X.-H. *et al.* Normalization by edaravone, a free radical scavenger, of irradiation-reduced endothelial nitric oxide synthase expression. *Eur. J. Pharmacol.* **476**, 131–137 (2003).
134. Sakata, K. *et al.* Roles of ROS and PKC- β II in ionizing radiation-induced eNOS activation in human vascular endothelial cells. *Vascul. Pharmacol.* (2015). doi:10.1016/j.vph.2015.03.016
135. Hong, C.-W. *et al.* Involvement of inducible nitric oxide synthase in radiation-induced vascular endothelial damage. *J. Radiat. Res.* **54**, 1036–42 (2013).
136. Rabender, C., Alam, A. & Mikkelsen, R. Ionizing Radiation Induced Nitric Oxide Signaling. *Austin J. Nucl. Med. Radiother.* **1**, 1–5 (2014).
137. Riquier, H. *et al.* Comparison of X-ray and alpha particle effects on a human cancer and endothelial cells: Survival curves and gene expression profiles. *Radiother. Oncol.* **106**, 397–403 (2013).
138. Meeren, A. V, Bertho, J. M., Vandamme, M. & Gaugler, M. H. Ionizing radiation enhances IL-6 and IL-8 production by human endothelial cells. *Mediators Inflamm.* **6**, 185–93 (1997).
139. Blirando, K. *et al.* Mast cells and ionizing radiation induce a synergistic expression of inflammatory genes in endothelial cells by a mechanism involving p38 α MAP kinase and (p65) NF- κ B activation. *Radiat. Res.* **178**, 556–67 (2012).
140. Haubner, F. *et al.* Effects of radiation on the expression of adhesion molecules and cytokines in a static model of human dermal microvascular endothelial cells. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **54**, 371–9 (2013).
141. Chang, C. C. *et al.* Dose-dependent effect of radiation on angiogenic and angiostatic CXC chemokine expression in human endothelial cells. *Cytokine* **48**, 295–302 (2009).
142. Halle, M. *et al.* Sustained Inflammation Due to Nuclear Factor-Kappa B Activation in Irradiated Human Arteries. *J. Am. Coll. Cardiol.* **55**, 1227–1236 (2010).
143. Linard, C. *et al.* Acute induction of inflammatory cytokine expression after γ -irradiation in the rat: Effect of an NF- κ B inhibitor. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **58**, 427–434 (2004).
144. Blirando, K. *et al.* Mast cells are an essential component of human radiation proctitis and contribute to experimental colorectal damage in mice. *Am. J. Pathol.* **178**, 640–51 (2011).
145. Verheij, M., Dewit, L. G. & van Mourik, J. A. The effect of ionizing radiation on endothelial tissue factor activity and its cellular localization. *Thromb. Haemost.* **73**, 894–5 (1995).
146. Verheij, M. *et al.* Radiation-induced von Willebrand factor release. *Blood* **90**, 2109–10 (1997).
147. Rubin, D. B., Drab, E. A., Ts'ao, C. H., Gardner, D. & Ward, W. F. Prostacyclin synthesis in irradiated endothelial cells cultured from bovine aorta. *J. Appl. Physiol.* **58**, 592–7 (1985).
148. Zhou, Q., Zhao, Y., Li, P., Bai, X. & Ruan, C. Thrombomodulin as a marker of radiation-induced endothelial cell injury. *Radiat. Res.* **131**, 285–9 (1992).
149. Huang, L. *et al.* Thrombin promotes fibroblast proliferation during the early stages of experimental radiation pneumonitis. *Radiat. Res.* **156**, 45–52 (2001).
150. Wang, J., Zheng, H., Ou, X., Fink, L. M. & Hauer-Jensen, M. Deficiency of microvascular thrombomodulin and up-regulation of protease-activated receptor-1 in irradiated rat intestine: possible link between endothelial dysfunction and chronic radiation fibrosis. *Am. J. Pathol.* **160**, 2063–72 (2002).
151. Richter, K. K., Fink, L. M., Hughes, B. M., Sung, C. C. & Hauer-Jensen, M. Is the loss of endothelial thrombomodulin involved in the mechanism of chronicity in late radiation enteropathy? *Radiother. Oncol.* **44**, 65–71 (1997).
152. Ross, C. C. *et al.* Inactivation of thrombomodulin by ionizing radiation in a cell-free system: possible implications for radiation responses in vascular endothelium. *Radiat. Res.* **169**, 408–16 (2008).
153. Yau, J. W. *et al.* Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovasc. Disord.* **15**, 130 (2015).
154. Rannou, E. *et al.* In vivo evidence for an endothelium-dependent mechanism in radiation-induced normal tissue injury. *Sci. Rep.* **5**, 15738 (2015).
155. Abderrahmani, R. *et al.* Effects of pharmacological inhibition and genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 in radiation-induced intestinal injury. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **74**, 942–8 (2009).
156. Abderrahmani, R. *et al.* PAI-1-dependent endothelial cell death determines severity of radiation-induced intestinal injury. *PLoS One* **7**, e35740 (2012).
157. Milliat, F. *et al.* Essential role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation enteropathy. *Am. J. Pathol.* **172**, 691–701 (2008).

158. Verheij, M., Dewit, L. G., Boomgaard, M. N., Brinkman, H. J. & van Mourik, J. A. Ionizing radiation enhances platelet adhesion to the extracellular matrix of human endothelial cells by an increase in the release of von Willebrand factor. *Radiat. Res.* **137**, 202–7 (1994).
159. Mouthon, M.-A., Vereycken-Holler, V., Van der Meeren, A. & Gaugler, M.-H. Irradiation increases the interactions of platelets with the endothelium in vivo: analysis by intravital microscopy. *Radiat. Res.* **160**, 593–9 (2003).
160. Gaugler, M. H., Vereycken-Holler, V., Squiban, C. & Aigueperse, J. PECAM-1 (CD31) is required for interactions of platelets with endothelial cells after irradiation. *J. Thromb. Haemost.* **2**, 2020–2026 (2004).
161. Hallahan, D., Kuchibhotla, J. & Wyble, C. Cell adhesion molecules mediate radiation-induced leukocyte adhesion to the vascular endothelium. *Cancer Res.* **56**, 5150–5 (1996).
162. Baluna, R. G., Eng, T. Y. & Thomas, C. R. Adhesion molecules in radiotherapy. *Radiat. Res.* **166**, 819–31 (2006).
163. Quarmby, S., Hunter, R. D. & Kumar, S. Irradiation induced expression of CD31, ICAM-1 and VCAM-1 in human microvascular endothelial cells. *Anticancer Res.* **20**, 3375–81
164. Mollà, M. *et al.* Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation. *Int. J. Radiat. Oncol.* **57**, 264–273 (2003).
165. Hallahan, D. E. & Virudachalam, S. Intercellular adhesion molecule 1 knockout abrogates radiation induced pulmonary inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 6432–7 (1997).
166. Epperly, M. W., Guo, H., Shields, D., Zhang, X. & Greenberger, J. S. Correlation of ionizing irradiation-induced late pulmonary fibrosis with long-term bone marrow culture fibroblast progenitor cell biology in mice homozygous deletion recombinant negative for endothelial cell adhesion molecules. *In Vivo* **18**, 1–14
167. Hallahan, D. E. & Virudachalam, S. Ionizing radiation mediates expression of cell adhesion molecules in distinct histological patterns within the lung. *Cancer Res.* **57**, 2096–9 (1997).
168. Hallahan, D. E., Geng, L. & Shyr, Y. Effects of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) null mutation on radiation-induced pulmonary fibrosis and respiratory insufficiency in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 733–41 (2002).
169. Kachnic, L. A. & Powell, S. N. Can ICAM modulation prevent lung injury from ionizing radiation? *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 704–5 (2002).
170. Mollà, M. *et al.* Role of P-selectin in radiation-induced intestinal inflammatory damage. *Int. J. Cancer* **96**, 99–109 (2001).
171. Mollà, M. *et al.* Protective effect of superoxide dismutase in radiation-induced intestinal inflammation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **61**, 1159–66 (2005).
172. Ikeda, Y. *et al.* Expression of ICAM-1 and acute inflammatory cell infiltration in the early phase of radiation colitis in rats. *J. Radiat. Res.* **41**, 279–91 (2000).
173. Molla, M. *et al.* Influence of dose-rate on inflammatory damage and adhesion molecule expression after abdominal radiation in the rat. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **45**, 1011–1018 (1999).
174. Denham, J. W. Influence of dose-rate on inflammatory damage and adhesion molecule expression after abdominal radiation in the rat. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **47**, 1460–1 (2000).
175. Nathan, C. & Ding, A. Snapshot: Reactive Oxygen Intermediates (ROI). *Cell* **140**, 951–951.e2 (2010).
176. Collins, T. *et al.* Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* **9**, 899–909 (1995).
177. Heckmann, M., Douwes, K., Peter, R. & Degitz, K. Vascular activation of adhesion molecule mRNA and cell surface expression by ionizing radiation. *Exp. Cell Res.* **238**, 148–54 (1998).
178. Walther, W., Kaffenberger, D., Van Be, M. Influence of clinically used antioxidants on radiation-induced expression of intercellular cell adhesion molecule-1 on HUVEC. *Int. J. Radiat. Biol.* **75**, 1317–1325 (1999).
179. Baeuml, H. *et al.* Ionizing Radiation Induces, via Generation of Reactive Oxygen Intermediates, Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) Gene Transcription and NFkB-like Binding Activity in the ICAM-1 Transcriptional Regulatory Region. *Free Radic. Res.* **27**, 127–142 (1997).
180. Panés, J. *et al.* Tepoxalin inhibits inflammation and microvascular dysfunction induced by abdominal irradiation in rats. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **14**, 841–50 (2000).
181. Hadad, N., Tuval, L., Elgazar-Carmom, V., Levy, R. & Levy, R. Endothelial ICAM-1 protein induction is regulated by cytosolic phospholipase A2 α via both NF-kB and CREB transcription factors. *J. Immunol.* **186**, 1816–27 (2011).
182. Baeuml, H. *et al.* Ionizing radiation induces, via generation of reactive oxygen intermediates, intercellular adhesion

- molecule-1 (ICAM-1) gene transcription and NF kappa B-like binding activity in the ICAM-1 transcriptional regulatory region. *Free Radic. Res.* **27**, 127–42 (1997).
183. Mollà, M. & Panés, J. Radiation-induced intestinal inflammation. *World J. Gastroenterol.* **13**, 3043–3046 (2007).
 184. Lakshminarayanan, V., Drab-Weiss, E. A. & Roebuck, K. A. H₂O₂ and tumor necrosis factor-alpha induce differential binding of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB to the interleukin-8 promoter in endothelial and epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 32670–8 (1998).
 185. Hallahan, D. E., Staba-Hogan, M. J., Virudachalam, S. & Kolchinsky, A. X-ray-induced P-selectin localization to the lumen of tumor blood vessels. *Cancer Res.* **58**, 5216–20 (1998).
 186. Hong, J. H. *et al.* Induction of acute phase gene expression by brain irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **33**, 619–26 (1995).
 187. Quarmby, S., Kumar, P. & Kumar, S. Radiation-induced normal tissue injury: role of adhesion molecules in leukocyte-endothelial cell interactions. *Int. J. Cancer* **82**, 385–395 (1999).
 188. Wu, N. Z. *et al.* Differences in leucocyte-endothelium interactions between normal and adenocarcinoma bearing tissues in response to radiation. *Br. J. Cancer* **69**, 883–9 (1994).
 189. Vereycken-Holler, V., Aigueperse, J. & Gaugler, M.-H. Radiation effects on circulating and endothelial cell interactions studied by quantitative real-time videomicroscopy. *Int. J. Radiat. Biol.* **78**, 923–930 (2002).
 190. Gaber, M. W. *et al.* Differences in ICAM-1 and TNF-alpha expression between large single fraction and fractionated irradiation in mouse brain. *Int. J. Radiat. Biol.* **79**, 359–66 (2003).
 191. Panés, J., Anderson, D. C., Miyasaka, M. & Neil Granger, D. Role of leukocyte-endothelial cell adhesion in radiation-induced microvascular dysfunction in rats. *Gastroenterology* **108**, 1761–1769 (1995).
 192. Scharpfenecker, M., Floom, B., Korlaar, R., Russell, N. S. & Stewart, F. A. ALK1 heterozygosity delays development of late normal tissue damage in the irradiated mouse kidney. *Radiother. Oncol.* **99**, 349–355 (2011).
 193. Handschel, J. *et al.* Irradiation induces increase of adhesion molecules and accumulation of beta2-integrin-expressing cells in humans. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **45**, 475–81 (1999).
 194. Baeten, C. I. M. *et al.* Effects of radiotherapy and chemotherapy on angiogenesis and leukocyte infiltration in rectal cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **66**, 1219–27 (2006).
 195. Milliat, F., Benderitter, M. & Gaugler, M.-H. Les effets des rayonnements ionisants sur le système cardiovasculaire. *Radioprotection* **46**, 493–510 (2011).
 196. Bhattacharya, S. & Asaithamby, A. Ionizing radiation and heart risks. *Semin. Cell Dev. Biol.* (2016). doi:10.1016/j.semcdb.2016.01.045
 197. Stewart, F. A. *et al.* Ionizing radiation accelerates the development of atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice and predisposes to an inflammatory plaque phenotype prone to hemorrhage. *Am. J. Pathol.* **168**, 649–58 (2006).
 198. Raman, R., Raguram, S., Venkataraman, G., Paulson, J. C. & Sasisekharan, R. Glycomics: an integrated systems approach to structure-function relationships of glycans. *Nat. Methods* **2**, 817–824 (2005).
 199. Ohtsubo, K. & Marth, J. D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* **126**, 855–67 (2006).
 200. Marth, J. D. & Grewal, P. K. Mammalian glycosylation in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 874–87 (2008).
 201. Bertozzi, C. R. & Sasisekharan, R. *Glycomics. Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
 202. Bertozzi, C. R. & Rabuka, D. *Structural Basis of Glycan Diversity. Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
 203. Cummings, R. D. The repertoire of glycan determinants in the human glycome. *Mol. Biosyst.* **5**, 1087–104 (2009).
 204. Nairn, A. & Moremen, K. in *Handbook of Glycomics* 95–135 (2010). doi:10.1016/B978-0-12-373600-0.00005-6
 205. Nairn, A. V *et al.* Regulation of glycan structures in animal tissues: transcript profiling of glycan-related genes. *J. Biol. Chem.* **283**, 17298–313 (2008).
 206. Moremen, K. W., Tiemeyer, M. & Nairn, A. V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 448–62 (2012).
 207. Aarnoudse, C. A., Garcia Vallejo, J. J., Saeland, E. & van Kooyk, Y. Recognition of tumor glycans by antigen-presenting cells. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 105–11 (2006).
 208. Nairn, A. V *et al.* Regulation of glycan structures in murine embryonic stem cells: combined transcript profiling of glycan-related genes and glycan structural analysis. *J. Biol. Chem.* **287**, 37835–56 (2012).

209. Varki, A. & Sharon, N. *Historical Background and Overview. Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
210. Faid, V. Approches de glycomique appliquées à l'étude des pathologies métaboliques des glycoprotéines. (2008).
211. Stanley, P., Schachter, H. & Taniguchi, N. *N-Glycans. Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
212. García-Vallejo, J. J. *et al.* Activation of human endothelial cells by tumor necrosis factor- α results in profound changes in the expression of glycosylation-related genes. *J. Cell. Physiol.* **206**, 203–210 (2006).
213. Brockhausen, I., Schachter, H. & Stanley, P. *O-GalNAc Glycans. Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
214. Wells, L. in *Handbook of Glycomics* 45–57 (2010). doi:10.1016/B978-0-12-373600-0.00002-0
215. Stanley, P. & Cummings, R. D. *Structures Common to Different Glycans. Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
216. Esko, J. D., Kimata, K. & Lindahl, U. *Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
217. Hascall, V. & Esko, J. D. *Hyaluronan. Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
218. Mikami, T. & Kitagawa, H. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 4719–4733 (2013).
219. Parish, C. R. Heparan sulfate and inflammation. *Nat. Immunol.* **6**, 861–2 (2005).
220. Izumikawa, T. *et al.* Identification of chondroitin sulfate glucuronyltransferase as chondroitin synthase-3 involved in chondroitin polymerization: chondroitin polymerization is achieved by multiple enzyme complexes consisting of chondroitin synthase family members. *J. Biol. Chem.* **283**, 11396–406 (2008).
221. Sugahara, K. *et al.* Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 612–20 (2003).
222. Häcker, U., Nybakken, K. & Perrimon, N. Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 530–541 (2005).
223. Stanley, P. Golgi glycosylation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).
224. Kim, P. J., Lee, D. Y. & Jeong, H. Centralized modularity of N-linked glycosylation pathways in mammalian cells. *PLoS One* **4**, (2009).
225. Comelli, E. M. *et al.* A focused microarray approach to functional glycomics: Transcriptional regulation of the glycome. *Glycobiology* **16**, 117–131 (2006).
226. Kasper, B. T., Koppolu, S. & Mahal, L. K. Insights into miRNA regulation of the human glycome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **445**, 774–9 (2014).
227. Stanley, P. Golgi Glycosylation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a005199–a005199 (2011).
228. Breitling, J. & Aebi, M. N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a013359 (2013).
229. Hossler, P., Mulukutla, B. C. & Hu, W.-S. Systems Analysis of N-Glycan Processing in Mammalian Cells. *PLoS One* **2**, e713 (2007).
230. Scott, D. W. *et al.* Role of endothelial N-glycan mannose residues in monocyte recruitment during atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, e51-9 (2012).
231. Dennis, J. W., Nabi, I. R. & Demetriou, M. Metabolism, cell surface organization, and disease. *Cell* **139**, 1229–41 (2009).
232. Gerlach, J. Q., Sharma, S. & Leister, K. J. Endoplasmic Reticulum Stress in Health and Disease. 23–40 (2012). doi:10.1007/978-94-007-4351-9
233. Bard, F. & Chia, J. Cracking the Glycome Encoder: Signaling, Trafficking, and Glycosylation. *Trends Cell Biol.* **26**, 379–388 (2016).
234. Chia, J., Goh, G. & Bard, F. Short O-GalNAc glycans: regulation and role in tumor development and clinical perspectives. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1860**, 1623–1639 (2016).
235. Mkhikian, H. *et al.* Genetics and the environment converge to dysregulate N-glycosylation in multiple sclerosis. *Nat. Commun.* **2**, 334 (2011).

236. Chacko, B. K., Scott, D. W., Chandler, R. T. & Patel, R. P. Endothelial surface N-glycans mediate monocyte adhesion and are targets for anti-inflammatory effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands. *J. Biol. Chem.* **286**, 38738–47 (2011).
237. Potapenko, I. O. *et al.* Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Mol. Oncol.* **4**, 98–118 (2010).
238. Bernon, C. *et al.* Overexpression of Man2C1 leads to protein underglycosylation and upregulation of endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. *Glycobiology* **21**, 363–75 (2011).
239. Defaus, S., Gupta, P., Andreu, D. & Gutiérrez-Gallego, R. Mammalian protein glycosylation--structure versus function. *Analyst* **139**, 2944–67 (2014).
240. Dennis, J. W., Lau, K. S., Demetriou, M. & Nabi, I. R. Adaptive regulation at the cell surface by N-glycosylation. *Traffic* **10**, 1569–78 (2009).
241. Kollmann, K. *et al.* Mannose phosphorylation in health and disease. *Eur. J. Cell Biol.* **89**, 117–123 (2010).
242. Varki, A., Etzler, M. E., Cummings, R. D. & Esko, J. D. *Discovery and Classification of Glycan-Binding Proteins. Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
243. Hirabayashi, J., Yamada, M., Kuno, A. & Tateno, H. Lectin microarrays: concept, principle and applications. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 4443–58 (2013).
244. Cummings, R. D. & Etzler, M. E. in *Essentials of Glycobiology. 2nd edition.* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
245. Cummings, R. D. & McEver, R. P. *C-type Lectins. Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
246. Lowe, J. B. Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 531–538 (2003).
247. Julien, S. *et al.* Selectin Ligand Sialyl-Lewis x Antigen Drives Metastasis of Hormone-Dependent Breast Cancers. *Cancer Res.* **71**, (2011).
248. Yano, K. *et al.* Phenotypic heterogeneity is an evolutionarily conserved feature of the endothelium. *Blood* **109**, (2007).
249. Smolkova, O., Zavadka, A., Bankston, P. & Lutsyk, A. Cellular heterogeneity of rat vascular endothelium as detected by HPA and GS I lectin-gold probes. **7**, 659–668 (2001).
250. Selective binding of lectins to embryonic chicken vasculature.
251. Scott, D. W. & Patel, R. P. Endothelial heterogeneity and adhesion molecules N-glycosylation: Implications in leukocyte trafficking in inflammation. *Glycobiology* **23**, 622–633 (2013).
252. Xia, L. *et al.* Defective angiogenesis and fatal embryonic hemorrhage in mice lacking core 1-derived O-glycans. *J. Cell Biol.* **164**, 451–9 (2004).
253. Fu, J. *et al.* Endothelial cell O-glycan deficiency causes blood/lymphatic misconnections and consequent fatty liver disease in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 3725–37 (2008).
254. Herzog, B. H. *et al.* Podoplanin maintains high endothelial venule integrity by interacting with platelet CLEC-2. *Nature* **502**, 105–109 (2013).
255. Harfouche, R. *et al.* Glycome and transcriptome regulation of vasculogenesis. *Circulation* **120**, 1883–92 (2009).
256. Pries, A. R., Secomb, T. W. & Gaehtgens, P. The endothelial surface layer. *Pflügers Arch.* **440**, 653–666 (2000).
257. Reitsma, S., Slaaf, D. W., Vink, H., van Zandvoort, M. A. M. J. & oude Egbrink, M. G. A. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **454**, 345–59 (2007).
258. Megens, R. T. A. *et al.* Two-photon microscopy of vital murine elastic and muscular arteries. Combined structural and functional imaging with subcellular resolution. *J. Vasc. Res.* **44**, 87–98 (2007).
259. van Haaren, P. M. a, VanBavel, E., Vink, H. & Spaan, J. a E. Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H2848-56 (2003).
260. Smith, M. L., Long, D. S., Damiano, E. R. & Ley, K. Near-wall micro-PIV reveals a hydrodynamically relevant endothelial surface layer in venules in vivo. *Biophys. J.* **85**, 637–45 (2003).
261. Chappell, D. *et al.* The glycocalyx of the human umbilical vein endothelial cell: an impressive structure ex vivo but not in culture. *Circ. Res.* **104**, 1313–7 (2009).

262. Mulivor, A. & Lipowsky, H. Inflammation-and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *Am. J. Physiol. ...* **286**, H1672-80 (2004).
263. Yoneda, A. & Couchman, J. R. Regulation of cytoskeletal organization by syndecan transmembrane proteoglycans. *Matrix Biol.* **22**, 25–33 (2003).
264. Rosenberg, R. D., Shworak, N. W., Liu, J., Schwartz, J. J. & Zhang, L. Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated? *J. Clin. Invest.* **99**, 2062–70 (1997).
265. Fransson, L.-A. *et al.* Novel aspects of glypican glycobiochemistry. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 1016–24 (2004).
266. Weinbaum, S., Tarbell, J. M. & Damiano, E. R. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **9**, 121–167 (2007).
267. Nieuwdorp, M. *et al.* Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. *Diabetes* **55**, 480–6 (2006).
268. Schött, U. *et al.* The endothelial glycocalyx and its disruption, protection and regeneration: a narrative review. *Scand. J. Trauma. Resusc. Emerg. Med.* **24**, 48 (2016).
269. Bansch, P., Nelson, A., Ohlsson, T. & Bentzer, P. Effect of charge on microvascular permeability in early experimental sepsis in the rat. *Microvasc. Res.* **82**, 339–45 (2011).
270. Lipowsky, H. H. The endothelial glycocalyx as a barrier to leukocyte adhesion and its mediation by extracellular proteases. *Ann. Biomed. Eng.* **40**, 840–8 (2012).
271. Kolářová, H., Ambrůzová, B., Sviháková Šindlerová, L., Klinke, A. & Kubala, L. Modulation of Endothelial Glycocalyx Structure under Inflammatory Conditions. *Mediators Inflamm.* **2014**, 694312 (2014).
272. van den Berg, B. & Vink, H. Glycocalyx perturbation: cause or consequence of damage to the vasculature? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**, H2174-5 (2006).
273. van den Berg, B. M., Nieuwdorp, M., Stroes, E. S. G. & Vink, H. Glycocalyx and endothelial (dys) function: from mice to men. *Pharmacol. Rep.* **58 Suppl**, 75–80 (2006).
274. Mulivor, a W. & Lipowsky, H. H. Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, H1282-91 (2002).
275. Constantinescu, A. A., Vink, H. & Spaan, J. A. E. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1541–7 (2003).
276. Tarbell, J. M. & Pahakis, M. Y. Mechanotransduction and the glycocalyx. *J. Intern. Med.* **259**, 339–50 (2006).
277. Broekhuizen, L. L. N. *et al.* Endothelial glycocalyx as potential diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* **20**, 57–62 (2009).
278. Nieuwdorp, M. *et al.* The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* **16**, 507–11 (2005).
279. Gouverneur, M., Berg, B., Nieuwdorp, M., Stroes, E. & Vink, H. Vasculoprotective properties of the endothelial glycocalyx: effects of fluid shear stress. *J. Intern. Med.* **259**, 393–400 (2006).
280. Hanasaki, K., Varki, A., Stamenkovic, I. & Bevilacqua, M. P. Cytokine-induced beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase in human endothelial cells mediates alpha 2,6-sialylation of adhesion molecules and CD22 ligands. *J. Biol. Chem.* **269**, 10637–43 (1994).
281. García-Vallejo, J. J., van Dijk, W., van Die, I. & Gringhuis, S. I. Tumor necrosis factor-alpha up-regulates the expression of beta1,4-galactosyltransferase I in primary human endothelial cells by mRNA stabilization. *J. Biol. Chem.* **280**, 12676–82 (2005).
282. Moehler, T. M. *et al.* Involvement of alpha1-2-fucosyltransferase I (FUT1) and surface-expressed Lewisy (CD174) in first endothelial cell-cell contacts during angiogenesis. *J. Cell. Physiol.* **215**, 27–36 (2008).
283. Sperandio, M., Gleissner, C. A. & Ley, K. Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunol. Rev.* **230**, 97–113 (2009).
284. Müthing, J. *et al.* Isolation and structural characterization of glycosphingolipids of in vitro propagated human umbilical vein endothelial cells. *Glycobiology* **9**, 459–68 (1999).
285. Willhauck-Fleckenstein, M. *et al.* Transcriptional regulation of the vascular endothelial glycome by angiogenic and inflammatory signalling. *Angiogenesis* **13**, 25–42 (2010).
286. Lowe, J. B. Glycosylation in the control of selectin counter-receptor structure and function. *Immunol. Rev.* **186**, 19–36 (2002).

287. Peng, Y., Li, J. & Geng, M. The glycan profile of endothelial cells in the present of tumor-conditioned medium and potential roles of beta-1,6-GlcNAc branching on HUVEC conformation. *Mol. Cell. Biochem.* **340**, 143–52 (2010).
288. Diamond, M. S., Staunton, D. E., Marlin, S. D. & Springer, T. A. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* **65**, 961–971 (1991).
289. Sellak, H. *et al.* Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation. *Blood* **83**, 2669–2677 (1994).
290. Hahn, C. & Schwartz, M. A. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 53–62 (2009).
291. Scott, D. W., Vallejo, M. O. & Patel, R. P. Heterogenic endothelial responses to inflammation: role for differential N-glycosylation and vascular bed of origin. *J. Am. Heart Assoc.* **2**, e000263 (2013).
292. Renkonen, J., Tynnenen, O., Häyry, P., Paavonen, T. & Renkonen, R. Glycosylation might provide endothelial zip codes for organ-specific leukocyte traffic into inflammatory sites. *Am. J. Pathol.* **161**, 543–50 (2002).
293. Sgambati, E. *et al.* Lectin binding in the umbilical cord in altered glycemia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **130**, 30–41 (2007).
294. Sgambati, E., Brizzi, E., Marini, M., Gheri Bryk, S. & Gheri, G. Lectin binding in the human umbilical cord from normally grown pregnancies and from pregnancies complicated by intra-uterine growth retardation with absent or reversed diastolic flow. *Biol. Neonate* **84**, 119–34 (2003).
295. Becker, B. F., Chappell, D., Bruegger, D., Annecke, T. & Jacob, M. Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovasc. Res.* **87**, 300–10 (2010).
296. Becker, B. F., Chappell, D. & Jacob, M. Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: the fringe benefit. *Basic Res. Cardiol.* **105**, 687–701 (2010).
297. Chappell, D., Westphal, M. & Jacob, M. The impact of the glycocalyx on microcirculatory oxygen distribution in critical illness. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* **22**, 155–62 (2009).
298. Dane, M. J. C. *et al.* A microscopic view on the renal endothelial glycocalyx. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **308**, F956–F966 (2015).
299. van Golen, R. F., van Gulik, T. M. & Heger, M. Mechanistic overview of reactive species-induced degradation of the endothelial glycocalyx during hepatic ischemia/reperfusion injury. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 1382–402 (2012).
300. Chappell, D. *et al.* Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx. *Biol. Chem.* **389**, 79–82 (2008).
301. Singh, A. *et al.* Reactive Oxygen Species Modulate the Barrier Function of the Human Glomerular Endothelial Glycocalyx. *PLoS One* **8**, e55852 (2013).
302. Lipowsky, H. H. Protease activity and the role of the endothelial glycocalyx in inflammation. *Drug Discov. Today Dis. Model.* **8**, 57–62 (2011).
303. Lipowsky, H. H. & Lescanic, A. The effect of doxycycline on shedding of the glycocalyx due to reactive oxygen species. *Microvasc. Res.* **90**, 80–5 (2013).
304. Mulivor, A. & Lipowsky, H. Inhibition of Glycan Shedding and Leukocyte-Endothelial Adhesion in Postcapillary Venules by Suppression of Matrixmetalloprotease Activity with Doxycycline. *Microcirculation* 1–10 (2009). doi:10.1080/10739680903133714
305. McEver, R. P. & Cummings, R. D. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest.* **100**, 485–91 (1997).
306. Martinez, M. *et al.* Regulation of PSGL-1 interactions with L-selectin, P-selectin, and E-selectin: role of human fucosyltransferase-IV and -VII. *J. Biol. Chem.* **280**, 5378–90 (2005).
307. Sperandio, M. *et al.* P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *J. Exp. Med.* **197**, 1355–63 (2003).
308. Hidalgo, A., Peired, A. J., Wild, M. K., Vestweber, D. & Frenette, P. S. Complete Identification of E-Selectin Ligands on Neutrophils Reveals Distinct Functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity* **26**, 477–489 (2007).
309. Zhuo, L. *et al.* SHAP potentiates the CD44-mediated leukocyte adhesion to the hyaluronan substratum. *J. Biol. Chem.* **281**, 20303–14 (2006).
310. Pålsson, P., Strindhall, J., Srinivas, U. & Lundblad, A. Role of N-linked glycosylation in expression of E-selectin on human endothelial cells. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2452–9 (1995).

311. Ghoshal, P., Rajendran, M., Odo, N. & Ikuta, T. Glycosylation inhibitors efficiently inhibit P-selectin-mediated cell adhesion to endothelial cells. *PLoS One* **9**, e99363 (2014).
312. Hernandez Mir, G. *et al.* Glycoforms of human endothelial CD34 that bind L-selectin carry sulfated sialyl Lewis x capped O- and N-glycans. *Blood* **114**, 733–41 (2009).
313. Rosen, S. D. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 129–56 (2004).
314. Arata-Kawai, H. *et al.* Functional contributions of N- and O-glycans to L-selectin ligands in murine and human lymphoid organs. *Am. J. Pathol.* **178**, 423–433 (2011).
315. Gauguet, J.-M., Rosen, S. D., Marth, J. D. & von Andrian, U. H. Core 2 branching beta1,6-N-acetylglucosaminyltransferase and high endothelial cell N-acetylglucosamine-6-sulfotransferase exert differential control over B- and T-lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *Blood* **104**, 4104–12 (2004).
316. Sperandio, M. *et al.* Severe impairment of leukocyte rolling in venules of core 2 glucosaminyltransferase-deficient mice. *Blood* **97**, 3812–9 (2001).
317. Ellies, L. G. *et al.* Core 2 oligosaccharide biosynthesis distinguishes between selectin ligands essential for leukocyte homing and inflammation. *Immunity* **9**, 881–90 (1998).
318. Sperandio, M. *et al.* Differential requirements for core2 glucosaminyltransferase for endothelial L-selectin ligand function in vivo. *J. Immunol.* **167**, 2268–74 (2001).
319. Yeh, J. C. *et al.* Novel sulfated lymphocyte homing receptors and their control by a Core1 extension beta 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase. *Cell* **105**, 957–69 (2001).
320. Mori, R., Kondo, T., Nishie, T., Ohshima, T. & Asano, M. Impairment of skin wound healing in beta-1,4-galactosyltransferase-deficient mice with reduced leukocyte recruitment. *Am. J. Pathol.* **164**, 1303–14 (2004).
321. Wang, L., Fuster, M., Sriramarao, P. & Esko, J. D. Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nat. Immunol.* **6**, 902–10 (2005).
322. Celie, J. W. A. M., Beelen, R. H. J. & van den Born, J. Heparan sulfate proteoglycans in extravasation: assisting leukocyte guidance. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **14**, 4932–49 (2009).
323. Kumar, A. V., Katakam, S. K., Urbanowitz, A.-K. & Gotte, M. Heparan sulphate as a regulator of leukocyte recruitment in inflammation. *Curr. Protein Pept. Sci.* **16**, 77–86 (2015).
324. Wang, L., Brown, J. R., Varki, A. & Esko, J. D. Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins. *J. Clin. Invest.* **110**, 127–36 (2002).
325. Sarrazin, S., Lamanna, W. C. & Esko, J. D. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).
326. Smits, N. C. *et al.* The heparan sulfate motif (GlcNS6S-IdoA2S)₃, common in heparin, has a strict topography and is involved in cell behavior and disease. *J. Biol. Chem.* **285**, 41143–51 (2010).
327. Martinez, P. *et al.* Over-sulfated glycosaminoglycans are alternative selectin ligands: insights into molecular interactions and possible role in breast cancer metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **30**, 919–31 (2013).
328. Cooney, C. A. *et al.* Chondroitin sulfates play a major role in breast cancer metastasis: a role for CSPG4 and CHST11 gene expression in forming surface P-selectin ligands in aggressive breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* **13**, R58 (2011).
329. Wright, R. D. & Cooper, D. Glycobiology of leukocyte trafficking in inflammation. *Glycobiology* **24**, 1242–51 (2014).
330. Bloom, J. W., Madanat, M. S. & Ray, M. K. Cell line and site specific comparative analysis of the N-linked oligosaccharides on human ICAM-1des454-532 by electrospray ionization mass spectrometry. *Biochemistry* **35**, 1856–64 (1996).
331. He, P., Ng, B. G., Losfeld, M.-E., Zhu, W. & Freeze, H. H. Identification of intercellular cell adhesion molecule 1 (ICAM-1) as a hypoglycosylation marker in congenital disorders of glycosylation cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 18210–7 (2012).
332. He, P., Srikrishna, G. & Freeze, H. H. N-glycosylation deficiency reduces ICAM-1 induction and impairs inflammatory response. *Glycobiology* **24**, 392–398 (2014).
333. Scott, D. W., Dunn, T. S., Ballestas, M. E., Litovsky, S. H. & Patel, R. P. 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**, C228-37 (2013).
334. Sriramarao, P., Berger, E., Chambers, J. D., Arfors, K. E. & Gehlsen, K. R. High mannose type N-linked oligosaccharides on endothelial cells may influence beta 2 integrin mediated neutrophil adherence in vitro. *J. Cell. Biochem.* **51**, 360–8 (1993).

335. Hanasaki, K., Varki, A. & Powell, L. D. CD22-mediated cell adhesion to cytokine-activated human endothelial cells. Positive and negative regulation by alpha 2-6-sialylation of cellular glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 7533–42 (1995).
336. Middleton, J., Patterson, A. M., Gardner, L., Schmutz, C. & Ashton, B. A. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* **100**, 3853–60 (2002).
337. Murdoch, C., Monk, P. N. & Finn, A. Cxc chemokine receptor expression on human endothelial cells. *Cytokine* **11**, 704–712 (1999).
338. Zhou, H. & Tai, H. H. Characterization of recombinant human CXCR4 in insect cells: role of extracellular domains and N-glycosylation in ligand binding. *Arch. Biochem. Biophys.* **369**, 267–76 (1999).
339. Woodfin, A., Voisin, M.-B. & Nourshargh, S. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr. Opin. Hematol.* **17**, 9–17 (2010).
340. Kitazume, S. *et al.* Alpha2,6-sialic acid on platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) regulates its homophilic interactions and downstream antiapoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* **285**, 6515–21 (2010).
341. Geyer, H., Geyer, R., Odenthal-Schnittler, M. & Schnittler, H. J. Characterization of human vascular endothelial cadherin glycans. *Glycobiology* **9**, 915–25 (1999).
342. Vestweber, D. VE-Cadherin: The Major Endothelial Adhesion Molecule Controlling Cellular Junctions and Blood Vessel Formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 223–232 (2007).
343. Brasch, J. *et al.* Structure and binding mechanism of vascular endothelial cadherin: a divergent classical cadherin. *J. Mol. Biol.* **408**, 57–73 (2011).
344. Mitoma, J. *et al.* Critical functions of N-glycans in L-selectin-mediated lymphocyte homing and recruitment. *Nat. Immunol.* **8**, 409–418 (2007).
345. Chacko, B. & Chandler, R. Anti-inflammatory effects of isoflavones are dependent on flow and human endothelial cell PPAR γ . *J. ...* 351–356 (2007).
346. Chacko, B. K. *et al.* Revealing anti-inflammatory mechanisms of soy isoflavones by flow: modulation of leukocyte-endothelial cell interactions. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **289**, H908-15 (2005).
347. Ramos, C. L. *et al.* Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Circ. Res.* **84**, 1237–44 (1999).
348. Sumagin, R. & Sarelius, I. H. A role for ICAM-1 in maintenance of leukocyte-endothelial cell rolling interactions in inflamed arterioles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H2786-98 (2007).
349. Johnson, N. A. *et al.* Endothelial cells preparing to die by apoptosis initiate a program of transcriptome and glycome regulation. *FASEB J.* **18**, 188–90 (2004).
350. Affara, M. *et al.* Understanding endothelial cell apoptosis: what can the transcriptome, glycome and proteome reveal? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **362**, 1469–1487 (2007).
351. Croci, D. O., Cerliani, J. P., Pinto, N. A., GMorosi, L. & Rabinovich, G. A. Regulatory role of glycans in the control of hypoxia-driven angiogenesis and sensitivity to anti-angiogenic treatment. *Glycobiology* **24**, 1283–1290 (2014).
352. Varki, A. & Freeze, H. H. *Glycans in Acquired Human Diseases. Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
353. Green, R. S. *et al.* Mammalian N-Glycan Branching Protects against Innate Immune Self-Recognition and Inflammation in Autoimmune Disease Pathogenesis. *Immunity* **27**, 308–320 (2007).
354. Angiari, S. Selectin-mediated leukocyte trafficking during the development of autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.* **14**, 984–95 (2015).
355. Nieuwdorp, M. *et al.* Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes* **55**, 1127–32 (2006).
356. Biddle, C. Like a slippery fish, a little slime is a good thing: the glycocalyx revealed. *AANA J.* **81**, 473–80 (2013).
357. Lennon, F. E. & Singleton, P. A. Hyaluronan regulation of vascular integrity. *Am. J. Cardiovasc. Dis.* **1**, 200–13 (2011).
358. Theodoratou, E. *et al.* The role of glycosylation in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 588–600 (2014).
359. Kobayashi, M. *et al.* Two distinct lymphocyte homing systems involved in the pathogenesis of chronic inflammatory gastrointestinal diseases. *Semin. Immunopathol.* **34**, 401–413 (2012).
360. da Costa Martins, P. *et al.* P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte

- adhesion to activated endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 1023–9 (2007).
361. Scott, D. W., Black, L. L., Vallejo, M. O., Kabarowski, J. H. & Patel, R. P. Increased sensitivity of Apolipoprotein E knockout mice to swainsonine dependent immunomodulation. *Immunobiology* **219**, 497–502 (2014).
 362. Vink, H., Constantinescu, A. A. & Spaan, J. A. Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer : implications for platelet-endothelial cell adhesion. *Circulation* **101**, 1500–2 (2000).
 363. van den Berg, B. M., Spaan, J. A. E., Rolf, T. M. & Vink, H. Atherogenic region and diet diminish glycocalyx dimension and increase intima-to-media ratios at murine carotid artery bifurcation. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **290**, (2006).
 364. Pinho, S. S. *et al.* Modulation of E-cadherin function and dysfunction by N-glycosylation. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 1011–20 (2011).
 365. Pinho, S. S. & Reis, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* **15**, 540–555 (2015).
 366. Croci, D. O. *et al.* Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors. *Cell* **156**, 744–58 (2014).
 367. Varki, A. Selectin ligands: will the real ones please stand up? *J. Clin. Invest.* **99**, 158–62 (1997).
 368. Rachmilewitz, J. Glycosylation: an intrinsic sign of 'Danger'. *Self. Nonself.* **1**, 250–254 (2010).
 369. Hauer-Jensen, M., Denham, J. W. & Andreyev, H. J. N. Radiation enteropathy--pathogenesis, treatment and prevention. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 470–9 (2014).
 370. Andreyev, H. J. N., Davidson, S. E., Gillespie, C., Allum, W. H. & Swarbrick, E. Practice guidance on the management of acute and chronic gastrointestinal problems arising as a result of treatment for cancer. *Gut* **61**, 179–92 (2012).
 371. Andreyev, H. J. N., Wotherspoon, A., Denham, J. W. & Hauer-Jensen, M. 'Pelvic radiation disease': new understanding and new solutions for a new disease in the era of cancer survivorship. *Scand. J. Gastroenterol.* **46**, 389–97 (2011).
 372. Chaze, T. *et al.* Alteration of the serum N-glycome of mice locally exposed to high doses of ionizing radiation. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 283–301 (2013).
 373. Tóth, E. *et al.* Changes of protein glycosylation in the course of radiotherapy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **118**, 380–386 (2016).
 374. Zheng, H., Wang, J., Koteliensky, V. E., Gotwals, P. J. & Hauer-Jensen, M. Recombinant soluble transforming growth factor beta type II receptor ameliorates radiation enteropathy in mice. *Gastroenterology* **119**, 1286–96 (2000).
 375. Wolinsky, H. *et al.* Hydrolase activities in the rat aorta. I. Effects of diabetes mellitus and insulin treatment. *Circ. Res.* **42**, 821–31 (1978).
 376. Velho, R. V. *et al.* Analyses of disease-related GNPTAB mutations define a novel GlcNAc-1-phosphotransferase interaction domain and an alternative site-1 protease cleavage site. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 3497–505 (2015).
 377. Kubaszova, T. The effect of ionizing radiation on the function of the Golgi-complex. (1977).
 378. Farber-Katz, S. E. *et al.* DNA damage triggers Golgi dispersal via DNA-PK and GOLPH3. *Cell* **156**, 413–27 (2014).
 379. Kizuka, Y. & Taniguchi, N. Enzymes for N-Glycan Branching and Their Genetic and Nongenetic Regulation in Cancer. *Biomolecules* **6**, 25 (2016).
 380. Taniguchi, N., Kizuka, Y. & Glycobiology, S. Glycoscience: Biology and Medicine. 2–8 (2014). doi:10.1007/978-4-431-54836-2
 381. Lau, K. S. *et al.* Complex N-Glycan Number and Degree of Branching Cooperate to Regulate Cell Proliferation and Differentiation. *Cell* **129**, 123–134 (2007).
 382. Lee, S.-U. *et al.* N-glycan processing deficiency promotes spontaneous inflammatory demyelination and neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* **282**, 33725–34 (2007).
 383. Demetriou, M., Granovsky, M., Quaggin, S. & Dennis, J. W. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* **409**, 733–9 (2001).
 384. Grigorian, A. & Demetriou, M. Mgat5 deficiency in T cells and experimental autoimmune encephalomyelitis. *ISRN Neurol.* **2011**, 374314 (2011).
 385. Lee, S.-U. *et al.* N-glycan processing deficiency promotes spontaneous inflammatory demyelination and neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* **282**, 33725–34 (2007).

386. Christiansen, M. N. *et al.* Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics* **14**, 525–46 (2014).
387. Varki, A., Kannagi, R. & Toole, B. P. *Glycosylation Changes in Cancer. Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
388. Partridge, E. A. Regulation of Cytokine Receptors by Golgi N-Glycan Processing and Endocytosis. *Science* (80-.). **306**, 120–124 (2004).
389. Abbott, K. L. *et al.* Targeted Glycoproteomic Identification of Biomarkers for Human Breast Carcinoma research articles. 1470–1480 (2008).
390. Dennis, J. W., Laferté, S., Waghorne, C., Breitman, M. L. & Kerbel, R. S. Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science* **236**, 582–5 (1987).
391. Li, D. *et al.* Knockdown of Mgat5 inhibits breast cancer cell growth with activation of CD4+ T cells and macrophages. *J. Immunol.* **180**, 3158–65 (2008).
392. Chui, D. *et al.* Genetic remodeling of protein glycosylation in vivo induces autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 1142–7 (2001).
393. Ben-Mahmud, B. M. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha in diabetic plasma increases the activity of core 2 GlcNAc-T and adherence of human leukocytes to retinal endothelial cells: significance of core 2 GlcNAc-T in diabetic retinopathy. *Diabetes* **53**, 2968–76 (2004).
394. Yang, X., Lehotay, M., Anastasiades, T., Harrison, M. & Brockhausen, I. The effect of TNF-alpha on glycosylation pathways in bovine synoviocytes. *Biochem. Cell Biol.* **82**, 559–68 (2004).
395. Kobayashi, M. *et al.* Prominent expression of sialyl Lewis X-capped core 2-branched O-glycans on high endothelial venule-like vessels in gastric MALT lymphoma. *J. Pathol.* **224**, 67–77 (2011).
396. Toppila, S. *et al.* Enzymatic synthesis of alpha3'sialylated and multiply alpha3fucosylated biantennary polylectosamines. A bivalent [sialyl diLex]-saccharide inhibited lymphocyte-endothelium adhesion organ-selectively. *Eur. J. Biochem.* **261**, 208–215 (1999).
397. Seppo, A. *et al.* Synthesis of a tetravalent sialyl Lewis x glycan, a high-affinity inhibitor of L-selectin-mediated lymphocyte binding to endothelium. *Glycobiology* **6**, 65–71 (1996).
398. Doiron, A. L., Kirkpatrick, A. P. & Rinker, K. D. TGF-beta and TNF-a affect cell surface proteoglycan and sialic acid expression on vascular endothelial cells. *Biomed. Sci. Instrum.* **40**, 331–6 (2004).
399. Ellies, L. G. *et al.* Sialyltransferase specificity in selectin ligand formation. *Blood* **100**, 3618–25 (2002).
400. Sperandio, M. The expanding role of α 2-3 sialylation for leukocyte trafficking in vivo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1253**, 201–5 (2012).
401. Frommhold, D. *et al.* Sialyltransferase ST3Gal-IV controls CXCR2-mediated firm leukocyte arrest during inflammation. *J. Exp. Med.* **205**, 1435–46 (2008).
402. Kannagi, R., Yin, J., Miyazaki, K. & Izawa, M. Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants--Hakomori's concepts revisited. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 525–31 (2008).
403. Crespo, H. J., Lau, J. T. Y. & Videira, P. A. Dendritic cells: a spot on sialic Acid. *Front. Immunol.* **4**, 491 (2013).
404. Yasukawa, Z., Sato, C. & Kitajima, K. Inflammation-dependent changes in alpha2,3-, alpha2,6-, and alpha2,8-sialic acid glycotopes on serum glycoproteins in mice. *Glycobiology* **15**, 827–37 (2005).
405. Kaplan, H. A., Woloski, B. M., Hellman, M. & Jamieson, J. C. Studies on the effect of inflammation on rat liver and serum sialyltransferase. Evidence that inflammation causes release of Gal beta 1 leads to 4GlcNAc alpha 2 leads to 6 sialyltransferase from liver. *J. Biol. Chem.* **258**, 11505–9 (1983).
406. Jamieson, J. C., Lammers, G., Janzen, R. & Woloski, B. M. The acute phase response to inflammation: the role of monokines in changes in liver glycoproteins and enzymes of glycoprotein metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **87**, 11–5 (1987).
407. Harduin-Lepers, A. *et al.* The human sialyltransferase family. *Biochimie* **83**, 727–37 (2001).
408. Colley, K. J. Structure and Function of the Neural Cell Adhesion Molecule NCAM. **663**, 111–126 (2010).
409. Harduin-Lepers, A., Mollicone, R., Delannoy, P. & Oriol, R. The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. *Glycobiology* **15**, 805–17 (2005).
410. Falconer, R. A., Errington, R. J., Shnyder, S. D., Smith, P. J. & Patterson, L. H. Polysialyltransferase: a new target in metastatic cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* **12**, 925–39 (2012).

411. Tanaka, F. *et al.* Prognostic significance of polysialic acid expression in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **61**, 1666–70 (2001).
412. Curatola, A.-M., Huang, K. & Naftolin, F. Dehydroepiandrosterone (DHEA) inhibition of monocyte binding by vascular endothelium is associated with sialylation of neural cell adhesion molecule. *Reprod. Sci.* **19**, 86–91 (2012).
413. Casadesus, G. *et al.* Hippocampal neurogenesis and PSA-NCAM expression following exposure to 56Fe particles mimics that seen during aging in rats. *Exp. Gerontol.* **40**, 249–54 (2005).
414. Kamemura, K. & Hart, G. W. Dynamic Interplay between O-Glycosylation and O-Phosphorylation of Nucleocytoplasmic Proteins: A New Paradigm for Metabolic Control of Signal Transduction and Transcription. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **73**, 107–136 (2003).
415. Klein, N. J., Shennan, G. I., Heyderman, R. S. & Levin, M. Alteration in glycosaminoglycan metabolism and surface charge on human umbilical vein endothelial cells induced by cytokines, endotoxin and neutrophils. *J. Cell Sci.* 821–32 (1992).
416. Ramasamy, S., Lipke, D. W., McClain, C. J. & Hennig, B. Tumor necrosis factor reduces proteoglycan synthesis in cultured endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* **162**, 119–126 (1995).
417. Kiyohara, H. *et al.* Radiation-induced ICAM-1 expression via TGF- β 1 pathway on human umbilical vein endothelial cells; comparison between X-ray and carbon-ion beam irradiation. *Journal of radiation research* **52**, 287–292 (2011).
418. Nishikawa, H. *et al.* Sulfated glycosaminoglycan synthesis and its regulation by transforming growth factor-beta in rat clonal dental pulp cells. *J. Endod.* **26**, 169–71 (2000).
419. Chappell, D. *et al.* TNF-alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Res. Cardiol.* **104**, 78–89 (2009).
420. van Golen, R. F. *et al.* The mechanisms and physiological relevance of glycocalyx degradation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 1098–118 (2014).
421. Kennett, E. C. & Davies, M. J. Glycosaminoglycans are fragmented by hydroxyl, carbonate, and nitrogen dioxide radicals in a site-selective manner: implications for peroxynitrite-mediated damage at sites of inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 389–400 (2009).
422. Sibanda, S. *et al.* Efficiencies of fragmentation of glycosaminoglycan chloramides of the extracellular matrix by oxidizing and reducing radicals: Potential site-specific targets in inflammation? *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 280–290 (2013).
423. Yakovlev, V. A. Role of nitric oxide in the radiation-induced bystander effect. *Redox Biol.* **6**, 396–400 (2015).
424. Sprague, A. H. & Khalil, R. A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* **78**, 539–52 (2009).
425. Martinez, P. IMPORTANCE DES GLYCOSAMINOGLYCANES DE SURFACE DANS LES PHENOMENES INFLAMMATOIRES LIES AU CANCER. (2014).
426. Annabi, B. & Lee, Y.-T. Radiation Induced-Tubulogenesis in Endothelial Cells is Antagonized by the Antiangiogenic Properties of Green Tea Polyphenol (-) Epigallocatechin-3-Gallate. *Cancer Biol. Ther.* **2**, 640–647 (2003).
427. Jadhav, U. & Mohanam, S. Response of neuroblastoma cells to ionizing radiation: modulation of in vitro invasiveness and angiogenesis of human microvascular endothelial cells. *Int. J. Oncol.* **29**, 1525–31 (2006).
428. Nirmala, C. *et al.* Effects of radiation on the levels of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 during morphogenic glial-endothelial cell interactions. *Int. J. Cancer* **88**, 766–771 (2000).
429. Gaugler, M.-H. *et al.* Pravastatin limits endothelial activation after irradiation and decreases the resulting inflammatory and thrombotic responses. *Radiat. Res.* **163**, 479–87 (2005).
430. Endo, K. *et al.* Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *J. Biol. Chem.* **278**, 40764–70 (2003).
431. Gronski, T. J. *et al.* Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. *J. Biol. Chem.* **272**, 12189–94 (1997).
432. Manon-Jensen, T., Multhaupt, H. A. B. & Couchman, J. R. Mapping of matrix metalloproteinase cleavage sites on syndecan-1 and syndecan-4 ectodomains. *FEBS J.* **280**, 2320–2331 (2013).
433. Taraboletti, G. *et al.* Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **160**, 673–80 (2002).
434. Rau, J. C., Beaulieu, L. M., Huntington, J. A. & Church, F. C. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J.*

- Thromb. Haemost.* **5 Suppl 1**, 102–15 (2007).
435. Ghajar, C. M., George, S. C. & Putnam, A. J. Matrix metalloproteinase control of capillary morphogenesis. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **18**, 251–78 (2008).
 436. Visse, R. & Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* **92**, 827–39 (2003).
 437. Ibrahim, A. A. *et al.* Inhibition of Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 Activity Enhances Rapid and Sustainable Hematopoietic Regeneration. *Stem Cells* **32**, 946–958 (2014).
 438. Schmidt, A., Echtermeyer, F., Alozie, A., Brands, K. & Buddecke, E. Plasmin- and thrombin-accelerated shedding of syndecan-4 ectodomain generates cleavage sites at Lys(114)-Arg(115) and Lys(129)-Val(130) bonds. *J. Biol. Chem.* **280**, 34441–6 (2005).
 439. Becker, B. F., Jacob, M., Leipert, S., Salmon, A. H. J. & Chappell, D. Degradation of the endothelial glycocalyx in clinical settings: searching for the sheddases. *Br. J. Clin. Pharmacol.* n/a-n/a (2015). doi:10.1111/bcp.12629
 440. Gils, A. *et al.* Biochemical importance of glycosylation of plasminogen activator inhibitor-1. *Thromb. Haemost.* **90**, 206–217 (2003).
 441. Pathak, R. *et al.* Thrombomodulin contributes to gamma tocotrienol-mediated lethality protection and hematopoietic cell recovery in irradiated mice. *PLoS One* **10**, e0122511 (2015).
 442. Subramanian, S. V., Fitzgerald, M. L. & Bernfield, M. Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J. Biol. Chem.* **272**, 14713–14720 (1997).
 443. Chappell, D. *et al.* Glycocalyx protection reduces leukocyte adhesion after ischemia/reperfusion. *Shock* **34**, 133–9 (2010).
 444. Chappell, D. *et al.* Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **83**, 388–96 (2009).
 445. Wang, J. *et al.* Antithrombin is protective against myocardial ischemia and reperfusion injury. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 1020–8 (2013).
 446. Chung, M.-C., Jorgensen, S. C., Popova, T. G., Bailey, C. L. & Popov, S. G. Neutrophil elastase and syndecan shedding contribute to antithrombin depletion in murine anthrax. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **54**, 309–318 (2008).
 447. Vlodavsky, I. *et al.* Significance of heparanase in cancer and inflammation. *Cancer Microenviron.* **5**, 115–32 (2012).
 448. Alphonsus, C. S. & Rodseth, R. N. The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier. *Anaesthesia* **69**, 777–84 (2014).
 449. Meirovitz, A. *et al.* Role of Heparanase in Radiation-Enhanced Invasiveness of Pancreatic Carcinoma. *Cancer Res.* **71**, 2772–2780 (2011).
 450. Oh, C. W., Bump, E. a, Kim, J. S., Janigro, D. & Mayberg, M. R. Induction of a senescence-like phenotype in bovine aortic endothelial cells by ionizing radiation. *Radiat. Res.* **156**, 232–240 (2001).
 451. Yen, W., Cai, B., Zeng, M., Tarbell, J. & Fu, B. Quantification of the endothelial surface glycocalyx on rat and mouse blood vessels. *Microvasc. Res.* **83**, 337–46 (2012).
 452. Reitsma, S. *et al.* Endothelial glycocalyx structure in the intact carotid artery: a two-photon laser scanning microscopy study. *J. Vasc. Res.* **48**, 297–306 (2011).
 453. Chen, C.-I. *et al.* Structure of human POFUT2: insights into thrombospondin type 1 repeat fold and O-fucosylation. *EMBO J.* **31**, 3183–97 (2012).
 454. Shlush, L. I. *et al.* Quantitative digital in situ senescence-associated β -galactosidase assay. *BMC Cell Biol.* **12**, 16 (2011).
 455. Li, X. *et al.* Quantitative analysis of glycans, related genes, and proteins in two human bone marrow stromal cell lines using an integrated strategy. *Exp. Hematol.* **43**, 760–769 (2015).
 456. Wang, Y.-C. *et al.* Specific lectin biomarkers for isolation of human pluripotent stem cells identified through array-based glycomic analysis. *Cell Res.* **21**, 1551–63 (2011).
 457. Ohmori, K. *et al.* A distinct type of sialyl Lewis X antigen defined by a novel monoclonal antibody is selectively expressed on helper memory T cells. *Blood* **82**, 2797–805 (1993).
 458. Tateno, H. *et al.* A novel strategy for mammalian cell surface glycome profiling using lectin microarray. **17**, 1138–1146 (2007).
 459. Liu, G. & Neelamegham, S. A computational framework for the automated construction of glycosylation reaction

- networks. *PLoS One* **9**, e100939 (2014).
460. Lowe, D. & Raj, K. Premature aging induced by radiation exhibits pro-atherosclerotic effects mediated by epigenetic activation of CD44 expression. *Aging Cell* **13**, 900–10 (2014).
 461. Hildebrandt, G. *et al.* Mononuclear cell adhesion and cell adhesion molecule liberation after X-irradiation of activated endothelial cells in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* **78**, 315–25 (2002).
 462. Kawasaki, H. & Kretsinger, R. Structural differences among subfamilies of EF-hand proteins -- A view from the pseudo-two fold symmetry axis. *Proteins Struct. Funct. ...* 1–33 (2014). doi:10.1002/prot.
 463. Higai, K., Azuma, Y., Aoki, Y. & Matsumoto, K. Altered glycosylation of alpha1-acid glycoprotein in patients with inflammation and diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta.* **329**, 117–25 (2003).
 464. Hoving, S. *et al.* Single-dose and fractionated irradiation promote initiation and progression of atherosclerosis and induce an inflammatory plaque phenotype in ApoE(-/-) mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **71**, 848–57 (2008).
 465. Cromer, W. E., Mathis, J. M., Granger, D. N., Chaitanya, G. V & Alexander, J. S. Role of the endothelium in inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* **17**, 578–93 (2011).
 466. Kobayashi, M. *et al.* GlcNAc6ST-1-mediated decoration of MAdCAM-1 protein with L-selectin ligand carbohydrates directs disease activity of ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 697–706 (2009).
 467. Rivera-Nieves, J. *et al.* L-selectin, alpha 4 beta 1, and alpha 4 beta 7 integrins participate in CD4+ T cell recruitment to chronically inflamed small intestine. *J. Immunol.* **174**, 2343–52 (2005).
 468. Burgio, V. L., Fais, S., Boirivant, M., Perrone, A. & Pallone, F. Peripheral monocyte and naive T-cell recruitment and activation in Crohn's disease. *Gastroenterology* **109**, 1029–38 (1995).
 469. Briskin, M. *et al.* Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *Am. J. Pathol.* **151**, 97–110 (1997).
 470. Hemmerich, S., Leffler, H. & Rosen, S. D. Structure of the O-glycans in GlyCAM-1, an endothelial-derived ligand for L-selectin. *J. Biol. Chem.* **270**, 12035–47 (1995).
 471. Koenig, A. *et al.* Selectin inhibition: synthesis and evaluation of novel sialylated, sulfated and fucosylated oligosaccharides, including the major capping group of GlyCAM-1. *Glycobiology* **7**, 79–93 (1997).
 472. Dwir, O. *et al.* GlyCAM-1 supports leukocyte rolling in flow: evidence for a greater dynamic stability of L-selectin rolling of lymphocytes than of neutrophils. *Cell Adhes. Commun.* **6**, 349–70 (1998).
 473. Imai, Y., Lasky, L. A. & Rosen, S. D. Sulphation requirement for GlyCAM-1, an endothelial ligand for L-selectin. *Nature* **361**, 555–7 (1993).
 474. Uchimura, K. & Rosen, S. D. Sulfated L-selectin ligands as a therapeutic target in chronic inflammation. *Trends Immunol.* **27**, 559–565 (2006).
 475. Mohanta, S. K. *et al.* Artery Tertiary Lymphoid Organs Contribute to Innate and Adaptive Immune Responses in Advanced Mouse Atherosclerosis. *Circ. Res.* **114**, (2014).
 476. Huang, Y. *et al.* Identification of Novel Genes Associated with Renal Tertiary Lymphoid Organ Formation in Aging Mice. *PLoS One* **9**, e91850 (2014).
 477. Ruddle, N. H. *et al.* Lymphatic vessels and tertiary lymphoid organs. *J. Clin. Invest.* **124**, 953–959 (2014).
 478. Hanasaki, K., Varki, A., Stamenkovic, I. & Bevilacqua, M. P. Cytokine-induced beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase in human endothelial cells mediates alpha 2,6-sialylation of adhesion molecules and CD22 ligands. *J. Biol. Chem.* **269**, 10637–43 (1994).
 479. Nitschke, L., Floyd, H., Ferguson, D. J. & Crocker, P. R. Identification of CD22 ligands on bone marrow sinusoidal endothelium implicated in CD22-dependent homing of recirculating B cells. *J. Exp. Med.* **189**, 1513–8 (1999).
 480. Abe, Y. *et al.* Endothelial alpha 2,6-linked sialic acid inhibits VCAM-1-dependent adhesion under flow conditions. *J. Immunol.* **163**, 2867–76 (1999).
 481. Lee, C. *et al.* NEU1 sialidase regulates the sialylation state of CD31 and disrupts CD31-driven capillary-like tube formation in human lung microvascular endothelia. *J. Biol. Chem.* **289**, 9121–35 (2014).
 482. Kitazume, S. *et al.* Interaction of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) with α 2,6-sialylated glycan regulates its cell surface residency and anti-apoptotic role. *J. Biol. Chem.* **289**, 27604–13 (2014).
 483. Park, S., DiMaio, T. A., Scheef, E. A., Sorenson, C. M. & Sheibani, N. PECAM-1 regulates proangiogenic properties of endothelial cells through modulation of cell-cell and cell-matrix interactions. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **299**, (2010).

484. Kitazume, S., Imamaki, R., Ogawa, K. & Taniguchi, N. Sweet role of platelet endothelial cell adhesion molecule in understanding angiogenesis. *Glycobiology* **24**, 1260–4 (2014).
485. Grabham, P. *et al.* Two distinct types of the inhibition of vasculogenesis by different species of charged particles. *Vasc. Cell* **5**, 16 (2013).
486. Potter, D. R., Jiang, J. & Damiano, E. R. The recovery time course of the endothelial cell glycocalyx in vivo and its implications in vitro. *Circ. Res.* **104**, 1318–25 (2009).
487. Henry, C. B. & Duling, B. R. TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **279**, H2815-23 (2000).
488. Varki, A. Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* **2**, 25–40 (1992).
489. Schauer, R. Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **40**, 131–234 (1982).
490. Varki, A. & Schauer, R. *Sialic Acids. Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
491. Cioffi, D. L., Pandey, S., Alvarez, D. F. & Cioffi, E. A. Terminal sialic acids are an important determinant of pulmonary endothelial barrier integrity. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **302**, (2012).
492. Legrand, P. *et al.* Self-assembly of the vascular endothelial cadherin ectodomain in a Ca²⁺-dependent hexameric structure. *J. Biol. Chem.* **276**, 3581–8 (2001).
493. Bibert, S. *et al.* Synergy between Extracellular Modules of Vascular Endothelial Cadherin Promotes Homotypic Hexameric Interactions. *J. Biol. Chem.* **277**, 12790–12801 (2002).
494. Sievert, W. *et al.* Late proliferating and inflammatory effects on murine microvascular heart and lung endothelial cells after irradiation. *Radiother. Oncol.* (2015). doi:10.1016/j.radonc.2015.07.029
495. Delannoy, C. P. *et al.* Glycosylation changes triggered by the differentiation of monocytic THP-1 cell line into macrophages. *J. Proteome Res. Just Accept. Manuscr.* (2016). doi:10.1021/acs.jproteome.6b00161
496. van Vugt, M. A. T. M. & Yaffe, M. B. Cell cycle re-entry mechanisms after DNA damage checkpoints: giving it some gas to shut off the breaks! *Cell Cycle* **9**, 2097–101 (2010).
497. Rohrer Bley, C. *et al.* Microtubule stabilising agents and ionising radiation: Multiple exploitable mechanisms for combined treatment. *Eur. J. Cancer* **49**, 245–253 (2013).
498. Zaremba, T. G. & Irwin, R. D. Effects of ionizing radiation on the polymerization of microtubules in vitro. *Biochemistry* **20**, 1323–32 (1981).
499. Pisters, M. F., Veenhof, C., van Dijk, G. M., Dekker, J. & CARPA Study Group, R. Avoidance of activity and limitations in activities in patients with osteoarthritis of the hip or knee: a 5 year follow-up study on the mediating role of reduced muscle strength. *Osteoarthr. Cartil.* **22**, 171–7 (2014).
500. Hart, G. W. & Akimoto, Y. *The O-GlcNAc Modification. Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
501. Toscano, M. A. *et al.* Nuclear factor (NF)-κB controls expression of the immunoregulatory glycan-binding protein galectin-1. *Mol. Immunol.* **48**, 1940–9 (2011).
502. Ezawa, I. *et al.* Novel p53 target gene *FUCA1* encodes a fucosidase and regulates growth and survival of cancer cells. *Cancer Sci.* **107**, 734–745 (2016).
503. Rashi-Elkeles, S. *et al.* Transcriptional modulation induced by ionizing radiation: p53 remains a central player. *Mol. Oncol.* **5**, 336–48 (2011).
504. Yu, H. Typical cell signaling response to ionizing radiation: DNA damage and extranuclear damage. *Chin. J. Cancer Res.* **24**, 83–9 (2012).
505. Gudkov, A. V, Gurova, K. V & Komarova, E. A. Inflammation and p53: A Tale of Two Stresses. *Genes Cancer* **2**, 503–16 (2011).
506. Pålsson, P., Strindhall, J., Srinivas, U. & Lundblad, A. Role of N-linked glycosylation in expression of E-selectin on human endothelial cells. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2452–9 (1995).
507. Yang, X., Yip, J., Anastassiades, T., Harrison, M. & Brockhausen, I. The action of TNFα and TGFβ include specific alterations of the glycosylation of bovine and human chondrocytes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1773**, 264–272 (2007).
508. Choi, S.-H. *et al.* A Hypoxia-Induced Vascular Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Development of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis. *Clin. Cancer Res.* 1–12 (2015). doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-3193

509. Wachsberger, P., Burd, R. & Dicker, A. Tumor Response to Ionizing Radiation Combined with Antiangiogenesis or Vascular Targeting Agents Exploring Mechanisms of Interaction. *Clin. Cancer Res.* **9**, 1957–71 (2003).
510. Grabham, P. & Sharma, P. The effects of radiation on angiogenesis. *Vasc. Cell* **5**, 19 (2013).
511. Sasaki, N., Toyoda, M., Sasaki, N. & Toyoda, M. Glycoconjugates and related molecules in human vascular endothelial cells. *Int. J. Vasc. Med.* **2013**, 963596 (2013).
512. Panganiban, R. A. M., Mungunsukh, O. & Day, R. M. X-irradiation induces ER stress, apoptosis, and senescence in pulmonary artery endothelial cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **3002**, 1–12 (2012).
513. Kim, E. J., Lee, Y.-J., Kang, S. & Lim, Y.-B. Ionizing radiation activates PERK/eIF2 α /ATF4 signaling via ER stress-independent pathway in human vascular endothelial cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **90**, 306–12 (2014).
514. Malhotra, J. D. & Kaufman, R. J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 2277–93 (2007).
515. Zhang, K. & Kaufman, R. J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* **454**, 455–62 (2008).
516. Wang, M. & Kaufman, R. J. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 581–97 (2014).
517. Termine, D. J., Moremen, K. W. & Sifers, R. N. The mammalian UPR boosts glycoprotein ERAD by suppressing the proteolytic downregulation of ER mannosidase I. *J. Cell Sci.* **122**, 976–84 (2009).
518. Elfrink, H. L., Zwart, R., Baas, F. & Scheper, W. Inhibition of endoplasmic reticulum associated degradation reduces endoplasmic reticulum stress and alters lysosomal morphology and distribution. *Mol. Cells* **35**, 291–7 (2013).
519. Fulda, S. *et al.* Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int. J. Cell Biol.* **2010**, 214074 (2010).
520. Kim, S.-R. & Kim, E.-H. Effect of acidic environment on the response of endothelial cells to irradiation: implications for microbeam radiation therapy. *Int. J. Radiat. Biol.* **90**, 325–33 (2014).
521. Rivinoja, A., Hassinen, A., Kokkonen, N., Kauppila, A. & Kellokumpu, S. Elevated Golgi pH impairs terminal N-glycosylation by inducing mislocalization of Golgi glycosyltransferases. *J. Cell. Physiol.* **220**, 144–54 (2009).
522. Maeda, Y. & Kinoshita, T. in *Methods in Enzymology* **480**, 495–510 (2010).
523. Tu, L., Tai, W. C. S., Chen, L. & Banfield, D. K. Signal-mediated dynamic retention of glycosyltransferases in the Golgi. *Science* **321**, 404–7 (2008).
524. Ali, M. F., Chachadi, V. B., Petrosyan, A. & Cheng, P.-W. Golgi phosphoprotein 3 determines cell binding properties under dynamic flow by controlling Golgi localization of core 2 N-acetylglucosaminyltransferase 1. *J. Biol. Chem.* **287**, 39564–77 (2012).
525. Isaji, T. *et al.* An oncogenic protein Golgi phosphoprotein 3 up-regulates cell migration via sialylation. *J. Biol. Chem.* **289**, 20694–705 (2014).
526. Scott, K. L. *et al.* GOLPH3 modulates mTOR signalling and rapamycin sensitivity in cancer. *Nature* **459**, 1085–90 (2009).
527. Khaled, S., Gupta, K. B. & Kucik, D. F. Ionizing Radiation Increases Adhesiveness of Human Aortic Endothelial Cells via a Chemokine-Dependent Mechanism. *Radiat. Res.* **177**, 594–601 (2012).
528. Impellizzeri, D. & Cuzzocrea, S. Targeting selectins for the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opin. Ther. Targets* **18**, 55–67 (2014).
529. Luster, A. D., Alon, R. & von Andrian, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat. Immunol.* **6**, 1182–90 (2005).
530. Pruenster, M. *et al.* Extracellular MRP8/14 is a regulator of β 2 integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion. *Nat. Commun.* **6**, 6915 (2015).
531. Bertozzi, C. R., Freeze, H. H., Varki, A. & Esko, J. D. *Glycans in Biotechnology and the Pharmaceutical Industry. Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
532. Natoni, A., Macauley, M. S. & O'Dwyer, M. E. Targeting Selectins and Their Ligands in Cancer. *Front. Oncol.* **6**, 93 (2016).
533. Schön, M. P. Inhibitors of selectin functions in the treatment of inflammatory skin disorders. *Ther. Clin. Risk Manag.* **1**, 201–8 (2005).
534. GlycoMimetics, inc. GlycoMimetics Initiates First Clinical Trial of GMI-1271 as Potential Treatment for Blood-Related Cancers (NASDAQ:GLYC). (2014). Available at:

<http://ir.glycomimetics.com/releasedetail.cfm?releaseid=855602>.

535. Long Sun, X.-. Glycosyltransferases as Potential Drug Targets. *Med. Chem. (Los. Angeles)*. **3**, 1–2 (2013).
536. Vasconcelos-Dos-Santos, A. *et al.* Biosynthetic Machinery Involved in Aberrant Glycosylation: Promising Targets for Developing of Drugs Against Cancer. *Front. Oncol.* **5**, 138 (2015).
537. Agrawal, P. *et al.* Mapping posttranscriptional regulation of the human glycome uncovers microRNA defining the glycode. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 4338–43 (2014).
538. Hanna, S. & Etzioni, a. Leukocyte adhesion deficiencies. **1250**, 50–55 (2012).
539. de Lonlay, P. & Seta, N. The clinical spectrum of phosphomannose isomerase deficiency, with an evaluation of mannose treatment for CDG-Ib. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1792**, 841–843 (2009).
540. Alton, G., Kjaergaard, S., Etchison, J. R., Skovby, F. & Freeze, H. H. Oral ingestion of mannose elevates blood mannose levels: a first step toward a potential therapy for carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Biochem. Mol. Med.* **60**, 127–33 (1997).
541. Kotlinowski, J. & Jozkowicz, A. PPARgamma and angiogenesis – endothelial cells perspective. *J. Diabetes Res.* (2016).
542. Reddy, A. T. *et al.* Endothelial Cell Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Reduces Endotoxemic Pulmonary Inflammation and Injury. *J. Immunol.* **189**, 5411–5420 (2012).
543. Kim, T. & Yang, Q. Peroxisome-proliferator-activated receptors regulate redox signaling in the cardiovascular system. *World J. Cardiol.* **5**, 164–74 (2013).
544. Linard, C. & Souidi, M. PPARs in Irradiation-Induced Gastrointestinal Toxicity. *PPAR Res.* **2010**, 1–12 (2010).
545. Mangoni, M. *et al.* A PPAR-gamma agonist protects from radiation-induced intestinal toxicity. *United Eur. Gastroenterol. J.* (2016). doi:10.1177/2050640616640443
546. Linard, C., Grémy, O. & Benderitter, M. Reduction of peroxisome proliferation-activated receptor gamma expression by gamma-irradiation as a mechanism contributing to inflammatory response in rat colon: modulation by the 5-aminosalicylic acid agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **324**, 911–20 (2008).
547. Nabi, I. R., Shankar, J. & Dennis, J. W. The galectin lattice at a glance. *J. Cell Sci.* **128**, (2015).
548. Thiemann, S. & Baum, L. G. The road less traveled: regulation of leukocyte migration across vascular and lymphatic endothelium by galectins. *J. Clin. Immunol.* **31**, 2–9 (2011).
549. Grigorian, A. & Demetriou, M. in *Methods in Enzymology* **480**, 245–266 (2010).
550. Advedissian, T., Deshayes, F., Poirier, F., Grandjean, C. & Viguier, M. Les galectines Des lectines pas comme les autres. *Medecine/Sciences* **31**, 499–505 (2015).
551. Liu, F. T. & Rabinovich, G. A. Galectins: Regulators of acute and chronic inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1183**, 158–182 (2010).
552. Baum, L. G. *et al.* Synthesis of an endogeneous lectin, galectin-1, by human endothelial cells is up-regulated by endothelial cell activation. *Glycoconj. J.* **12**, 63–68 (1995).
553. Upreti, M. *et al.* Radiation-induced galectin-1 by endothelial cells: a promising molecular target for preferential drug delivery to the tumor vasculature. *J. Mol. Med. (Berl)*. **91**, 497–506 (2013).
554. Kuo, P. & Le, Q.-T. Galectin-1 links tumor hypoxia and radiotherapy. *Glycobiology* **24**, 921–5 (2014).
555. Toscano, M. A. *et al.* Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat. Immunol.* **8**, 825–34 (2007).
556. Amano, M., Galvan, M., He, J. & Baum, L. G. The ST6Gal I sialyltransferase selectively modifies N-glycans on CD45 to negatively regulate galectin-1-induced CD45 clustering, phosphatase modulation, and T cell death. *J. Biol. Chem.* **278**, 7469–75 (2003).
557. Rao, S. P. *et al.* Galectin-3 functions as an adhesion molecule to support eosinophil rolling and adhesion under conditions of flow. *J. Immunol.* **179**, 7800–7 (2007).
558. Bahaie, N. S. *et al.* N-Glycans differentially regulate eosinophil and neutrophil recruitment during allergic airway inflammation. *J. Biol. Chem.* **286**, 38231–41 (2011).
559. Phillips, M. L. *et al.* ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science* **250**, 1130–2 (1990).
560. De Graaf, T. W., Van der Stelt, M. E., Anbergen, M. G. & van Dijk, W. Inflammation-induced expression of sialyl

- Lewis X-containing glycan structures on alpha 1-acid glycoprotein (orosomucoid) in human sera. *J. Exp. Med.* **177**, 657–66 (1993).
561. Walz, G., Aruffo, A., Kolanus, W., Bevilacqua, M. & Seed, B. Recognition by ELAM-1 of the Sia1yl-LeX Determinant on Myeloid and Tumor Cells. **14**, 2–5 (1990).
562. Flood-Nichols, S. K. *et al.* Aberrant glycosylation of plasma proteins in severe preeclampsia promotes monocyte adhesion. *Reprod. Sci.* **21**, 204–14 (2014).
563. Noone, R. B. *Management of Sepsis: The PIRO Approach. Current Therapy in Colon and Rectal Surgery* (Springer Berlin Heidelberg, 2009). doi:10.1007/978-3-642-00479-7
564. Halle, M., Ekström, M., Farnebo, F. & Tornvall, P. Endothelial activation with prothrombotic response in irradiated microvascular recipient veins. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.* **63**, 1910–1916 (2010).
565. Geiger, H. *et al.* Pharmacological targeting of the thrombomodulin-activated protein C pathway mitigates radiation toxicity. *Nat. Med.* **18**, 1123–9 (2012).
566. Rezvani, M., Hopewell, J. W. & Robbins, M. E. Initiation of non-neoplastic late effects: the role of endothelium and connective tissue. *Stem Cells* **13 Suppl 1**, 248–56 (1995).
567. Wang, J., Zheng, H., Ou, X., Fink, L. M. & Hauer-Jensen, M. Deficiency of microvascular thrombomodulin and up-regulation of protease-activated receptor-1 in irradiated rat intestine: possible link between endothelial dysfunction and chronic radiation fibrosis. *Am. J. Pathol.* **160**, 2063–72 (2002).
568. Etulain, J. & Schattner, M. Glycobiology of platelet-endothelial cell interactions. *Glycobiology* **24**, 1252–9 (2014).
569. McGrath, R. T., McRae, E., Smith, O. P. & O'Donnell, J. S. Platelet von Willebrand factor - Structure, function and biological importance. *Br. J. Haematol.* **148**, 834–843 (2010).
570. Lenting, P. J., Christophe, O. D. & Denis, C. V. Von Willebrand factor biosynthesis, secretion & clearance: connecting the far ends. *Blood* blood-2014-06-528406 (2015). doi:10.1182/blood-2014-06-528406
571. McGrath, R. T. *et al.* Altered glycosylation of platelet-derived von Willebrand factor confers resistance to ADAMTS13 proteolysis. *Blood* **122**, 4107–4110 (2013).
572. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J. & Peeper, D. S. The essence of senescence. *Genes Dev.* **24**, 2463–79 (2010).
573. Burton, D. G. A. & Krizhanovsky, V. Physiological and pathological consequences of cellular senescence. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 4373–86 (2014).
574. Dong, X. *et al.* NEMO modulates radiation-induced endothelial senescence of human umbilical veins through NF-κB signal pathway. *Radiat. Res.* **183**, 82–93 (2015).
575. Azimzadeh, O. *et al.* Integrative proteomics and targeted transcriptomics analyses in cardiac endothelial cells unravel mechanisms of long-term radiation-induced vascular dysfunction. *J. Proteome Res.* **14**, 1203–1219 (2015).
576. Citrin, D. E. *et al.* Role of type II pneumocyte senescence in radiation-induced lung fibrosis. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 1474–84 (2013).
577. Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol.* **5**, 99–118 (2010).
578. Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P. Y. & Campisi, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12072–7 (2001).
579. Eren, M. *et al.* PAI-1-regulated extracellular proteolysis governs senescence and survival in Klotho mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 7090–5 (2014).
580. Liao, E.-C. *et al.* Radiation induces senescence and a bystander effect through metabolic alterations. *Cell Death Dis.* **5**, e1255 (2014).
581. Moreno-Villanueva, M. *et al.* MARK-AGE biomarkers of ageing. *Mech. Ageing Dev.* **151**, 2–12 (2015).
582. Mun, G. I., Lee, S. J., An, S. M., Kim, I. K. & Boo, Y. C. Differential gene expression in young and senescent endothelial cells under static and laminar shear stress conditions. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 291–9 (2009).
583. Itakura, Y. *et al.* N- and O-glycan cell surface protein modifications associated with cellular senescence and human aging. *Cell Biosci.* **6**, 14 (2016).
584. Dall'Olio, F. *et al.* N-glycomic biomarkers of biological aging and longevity: a link with inflammaging. *Ageing Res. Rev.* **12**, 685–98 (2013).
585. Udono, M. *et al.* Impaired ATP6V0A2 expression contributes to Golgi dispersion and glycosylation changes in

- senescent cells. *Sci. Rep.* **5**, 17342 (2015).
586. Cheung, T. M. *et al.* Endothelial Cell Senescence Increases Traction Forces due to Age-Associated Changes in the Glycocalyx and SIRT1. *Cell. Mol. Bioeng.* **8**, 63–75 (2015).
587. Maier, J. A., Statuto, M. & Ragnotti, G. Senescence stimulates U937-endothelial cell interactions. *Exp. Cell Res.* **208**, 270–4 (1993).
588. Iannello, A. & Raulet, D. H. Immunosurveillance of senescent cancer cells by natural killer cells. *Oncoimmunology* **3**, e27616 (2014).
589. Pantsulaia, I., Ciszewski, W. M. & Niewiarowska, J. Senescent endothelial cells: Potential modulators of immunosenescence and ageing. *Ageing Res. Rev.* **29**, 13–25 (2016).

II. Tables des illustrations

Figure 1 : exposition moyenne de la population française pour l'année 2015 (d'après les données IRSN ¹).....	20
Figure 2 : radiolyse de l'eau (d'après <i>Azzam et Al.</i> ⁴).....	22
Figure 3 : utilisation des RI dans le traitement de cancers : balance bénéfice risque et fenêtre thérapeutique (d'après <i>Brizel et al.</i> ²³).....	28
Figure 4 : illustration de l'influence du rapport α/β dans le modèle LQ, cas du fractionnement (d'après <i>Shrieve et al.</i> ²⁶).....	31
Figure 5 : illustration de l'importance de la réponse immunitaire acquise et innée dans les dommages radio-induits à l'intestin (d'après ⁶⁸).....	41
Figure 6 : dynamique des dommages aux OAR (d'après ^{35,46}).....	45
Figure 7 : cascade d'adhésion des leucocytes à la surface des CE (d'après ^{80,81,83,85,91}).....	54
Figure 8 : liens entre inflammation chronique et angiogenèse (d'après <i>Costa et al.</i> ⁹⁷).....	59
Figure 9 : les 9 principaux monosaccharides retrouvés chez les Mammifères, l'acide N-acétylneuraminique (NeuAc) est le plus commun des acides sialiques ²⁰²	72
Figure 10 : exemple de deux isomères différant par leur liaison osidique α ou β (d'après <i>Bertozi et al.</i> ²⁰²).....	73
Figure 11 : les 3 grands types de N-glycanes (d'après <i>Stanley et al.</i> ²¹¹).....	75
Figure 12 : synthèse dans le RE du précurseur de la N-glycosylation (d'après <i>Nairn et al.</i> ²⁰⁸).....	76
Figure 13 : <i>trimming</i> des mannoses et des glucoses sur le N-glycane (d'après <i>Vallejo et al.</i> ²¹²).....	77
Figure 14 : synthèse des N-glycanes (d'après <i>Nairn et al.</i> ²⁰⁸).....	78
Figure 15 : Principales structures de O-glycanes (d'après <i>Marth et al.</i> ²⁰⁰).....	79
Figure 16 : synthèse et maturation des O-glycanes (d'après <i>Nairn et al.</i> ²⁰⁸).....	80
Figure 17 : le <i>decorating</i> et le <i>capping</i> , processus communs au N- et aux O- glycanes (d'après <i>Nairn et al.</i> ²⁰⁸).....	81
Figure 18 : chaines de synthèse des HS et CS (d'après <i>Häcker et al.</i> ²²²).....	84
Figure 19 : Représentation de la voie de synthèse des N-glycanes (d'après <i>Kim et al.</i> ²²⁴).....	86
Figure 20 : Exemple d'inhibition (d'après <i>Brockhausen et al.</i> ²¹³).....	88
Figure 21 : illustration des différents niveaux de modifications participant à la micro-hétérogénéité glycanique (d'après <i>Defaus et al.</i> ²³⁹).....	89
Figure 22 : les différentes formes des épitopes de Lewis, la forme mère Lewis X est représenté en haut à gauche (d'après <i>Stanley et al.</i> ²¹⁵).....	92
Figure 23 : structure du glycocalyx (d'après <i>Weinbaum et al.</i> ²⁶⁶).....	97

Figure 24 : le <i>shedding</i> du glycocalyx en condition inflammatoire (d'après ²⁹⁸).	105
Figure 25 : rôles des glycanes dans la cascade d'adhésion.	113
Figure 26 : mécanisme proposé pour expliquer la perte d'intégrité vasculaire dans les maladies inflammatoires chroniques.	118
Figure 27 : principaux glycanes surexprimés par les cellules cancéreuses (d'après Pinho <i>et al.</i> ³⁶⁵)	121
Figure 28 : hypothèse du <i>zip code</i> (d'après Scott <i>et al.</i> ²⁵¹).	121
Figure 29 : problématique du projet.	124
Figure 30 : Présentation globale des résultats concernant l'effet de l'irradiation sur la régulation des N-glycanes, voie de synthèse adaptée d'après Nairn <i>et al.</i> ²⁰⁸	162
Figure 31 : Présentation globale des résultats concernant l'effet de l'irradiation sur la régulation des O-glycanes, voie de synthèse adaptée d'après Nairn <i>et al.</i> ²⁰⁸	163
Figure 32 : Présentation globale des résultats concernant l'effet de l'irradiation sur la régulation de la maturation (<i>capping</i>), voie de synthèse adaptée d'après Nairn <i>et al.</i> ²⁰⁸	164
Figure 33 : Facteur d'expression relative (IR/CTRL) des gènes de glycosylation impliqués dans la synthèse des GAGs (moyenne+/- SEM). t-test : *, p < 0,05, **, p < 0,01, ***, p < 0,001. Le rôle dans la voie de biosynthèse des enzymes codées par les gènes mesurés sont indiqués dans le schéma.	165
Figure 34 : clichés pour la quantification du marquage vasculaire à la lectine WGA-FITC injectée dans le sinus rétro-orbital sur coupes (80µm) d'anse intestinale irradiée chez la souris C57BL/6. Les noyaux sont marqués au DAPI. Les CE sont identifiées par marquage CD31-AlexaFluor568, les flèches pointent l'endothélium.	167
Figure 35 : clichés pour la quantification du marquage vasculaire à la lectine Con A-rhodamine sur coupes humaines de rectum. Les noyaux sont marqués au DAPI. Les cellules endothéliales sont identifiées par marquage CD31-AlexaFluor568, les flèches pointent l'endothélium.	169
Figure 36 : illustration de mécanismes conduisant à une synthèse glycanique incomplète dans le cancer (d'après Kannagi <i>et al.</i> ⁴⁰²).	176
Figure 37 : le niveau d'α2-6 sialylation régule l'angiogenèse (d'après Kitazume <i>et al.</i> ⁴⁸⁴).	190
Figure 38 : proposition de mécanisme de régulation de la sialylation(d'après Isaji <i>et al.</i> ⁵²⁵).	196
Figure 39 : principales voies d'induction de la sénescence endothéliale radio-induite (d'après Wang <i>et al.</i> ¹⁰⁸).	203
Figure 40 : mécanismes radio-induits participant à la SERI (d'après Azimzadeh <i>et al.</i> ⁵⁷⁵).	204
Figure 41 : représentations des principales structures glycaniques utilisées dans cette thèse (issues de la chartre graphique du Consortium for Functional Glycomics (http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/CFGnomenclature.pdf))	236

Figure 42 : Présentation globale des résultats concernant l'effet de l'irradiation sur la régulation des O-glycanes non GalNAc dans notre modèle HUVEC, voie de synthèse adaptée d'après Nairn <i>et al.</i> ²⁰⁸	237
Figure 43 : Présentation globale des résultats concernant l'effet de l'irradiation sur la régulation des N-glycanes dans les tissus intestinaux de souris, voie de synthèse adaptée d'après Nairn <i>et al.</i> ²⁰⁸ . .	238
Figure 44 : Présentation globale des résultats concernant l'effet de l'irradiation sur la régulation des O-glycanes dans les tissus intestinaux de souris, voie de synthèse adaptée d'après Nairn <i>et al.</i> ²⁰⁸ . .	239
Figure 45 : Présentation globale des résultats concernant l'effet de l'irradiation sur la régulation du <i>capping</i> dans les tissus intestinaux de souris, voie de synthèse adaptée d'après Nairn <i>et al.</i> ²⁰⁸	240
Figure 46 : Présentation globale des résultats concernant l'effet de l'irradiation sur la régulation des O-glycanes non GalNAc dans les tissus intestinaux de souris, voie de synthèse adaptée d'après Nairn <i>et al.</i> ²⁰⁸	241
Figure 47 : Modèle de cellules endothélial HUVECs.	248
Figure 48 : Modélisation chez la souris C57BL/6 des effets secondaires des Radiothérapies au niveau de l'anse intestinale.	249

III. Table des tableaux

Tableau 1 : types de rayonnements ionisants.....	17
Tableau 2 : unité de mesure des rayonnements.....	18
Tableau 3 : échelle de dose selon l'UNSCEAR.	25
Tableau 4 : les 9 principaux oligosaccharides utilisés dans les processus de glycosylation et les liaisons qu'ils peuvent établir (d'après Ohtsubo <i>et al.</i> ¹⁹⁹).....	73
Tableau 5 : principales molécules liées au protéoglycanes classées par processus (d'après Esko <i>et al.</i> ²¹⁶).....	91
Tableau 6 : gènes codants pour les enzymes impliqués dans les différentes étapes de synthèse des N-glycanes.	242
Tableau 7 : gènes codants pour les enzymes impliqués dans les différentes étapes de synthèse des N-glycanes.	243
Tableau 8 : gènes codants pour les enzymes impliqués dans les différentes étapes de synthèse des O-glycanes.	244
Tableau 9 : gènes codants pour les enzymes impliqués dans les différentes étapes du <i>capping</i>	245
Tableau 10 : gènes codants pour les enzymes impliqués dans les différentes étapes de synthèse des O-glycanes non GalNAc.	247

Annexes

I. Nomenclature














 Galactose (Gal)	 Manose (Man)
 N-Acetylgalactosamine (GalNAc)	 N-Acetylmannosamine (ManNAc)
 Galactosamine (GalN)	 Xylose (Xyl)
 Glucose (Glc)	 Acide sialique (généralement Neu5Ac)
 N-Acetylglucosamine (GlcNAc)	 Fucose (Fuc)
 Glucosamine (GlcN)	 Acide glucuronique (GlcA)
$-\text{SO}_4$ Sulfatation (Sulfo)	 Acide iduronique (IdoA)

Figure 41 : représentations des principales structures glycaniques utilisées dans cette thèse (issues de la chartre graphique du Consortium for Functional Glycomics (<http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/CFGnomenclature.pdf>))

II. Synthèse des résultats de la transcriptomique chez les HUVECs

II.A. O-glycanes de types non GalNac

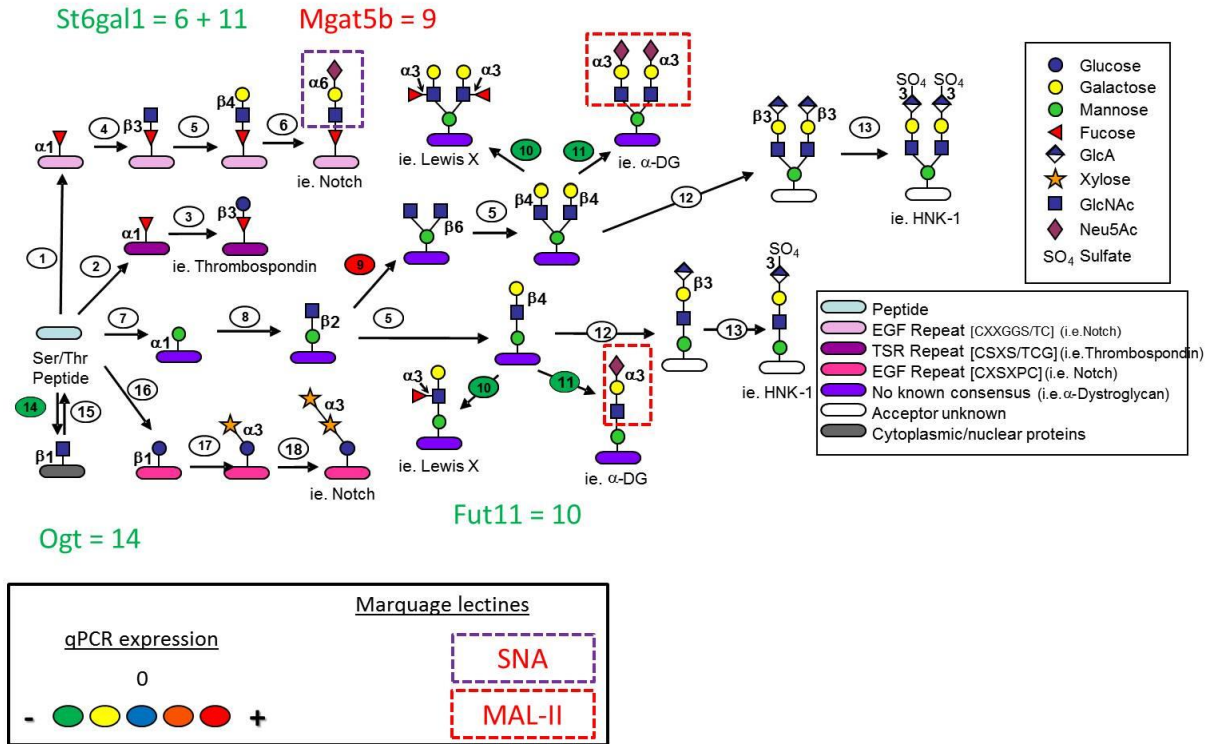


Figure 42 : Présentation globale des résultats concernant l'effet de l'irradiation sur la régulation des O-glycanes non GalNac dans notre modèle HUVEC, voie de synthèse adaptée d'après Nairn *et al.*²⁰⁸.

La chaîne de synthèse des O-glycanes non GalNac a été annotée avec les résultats de notre étude. Les structures potentiellement identifiées par les lectines sont encadrées. Les marquages dont l'intensité **augmente** après irradiation sont annotés en **rouge**, ceux dont l'intensité **diminue** sont annotés en **vert**. Le même système est appliqué à l'expression des gènes. Les gènes sont regroupés en famille en fonctions des étapes catalysées par les enzymes pour lesquelles ils codent. Plusieurs enzymes peuvent correspondre à une même étape. Le rôle de certaines enzymes peut être redondant.

III. Synthèse des résultats de la transcriptomique chez la souris C57BL/6

III.A. N-glycanes

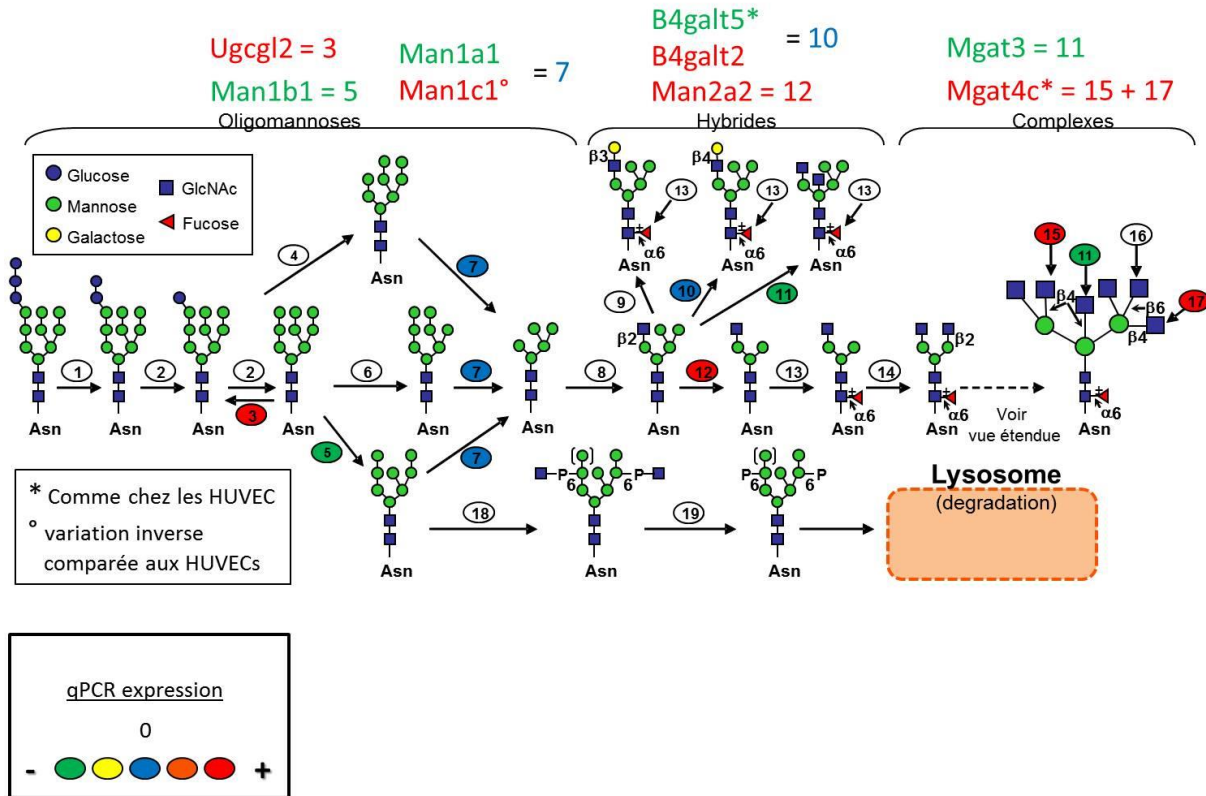


Figure 43 : Présentation globale des résultats concernant l'effet de l'irradiation sur la régulation des N-glycanes dans les tissus intestinaux de souris, voie de synthèse adaptée d'après Nairn *et al.*²⁰⁸.

La chaîne de synthèse des N-glycanes a été annotée avec les résultats de notre étude transcriptomique. Les gènes dont l'expression **augmente** après irradiation sont annotés en **rouge**, ceux dont l'intensité **diminue** sont annotés en **vert**. Les gènes sont regroupés en famille en fonctions des étapes catalysées par les enzymes pour lesquelles ils codent. Plusieurs enzymes peuvent correspondre à une même étape. Le rôle de certaines enzymes peut être redondant.

III.B. O-glycanes

Galnt3
Galnt2* = 1
Galnt10
Galnt6

Gcnt1° = 15
Gcnt3* = 14

Gcnt1° = 9
Gcnt3* = 9

St3gal1 = 5

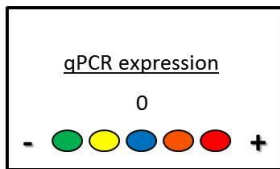
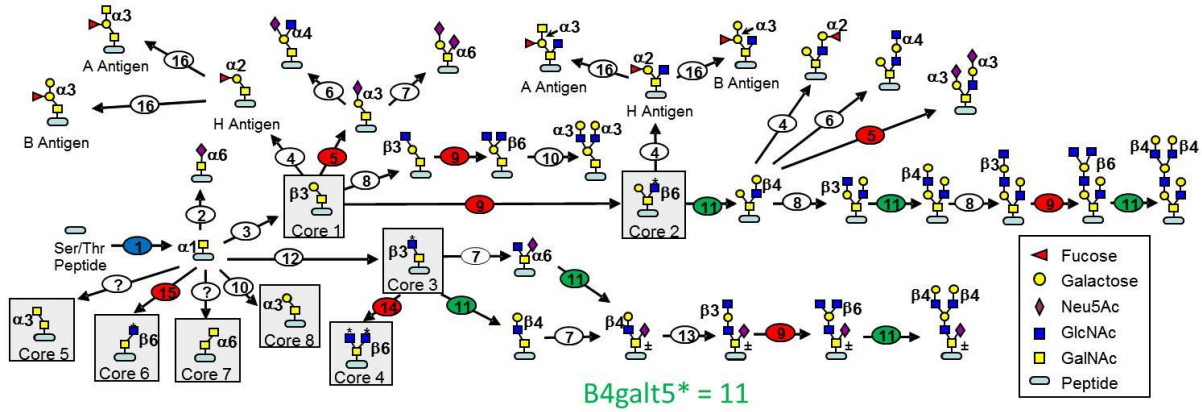


Figure 44 : Présentation globale des résultats concernant l'effet de l'irradiation sur la régulation des O-glycanes dans les tissus intestinaux de souris, voie de synthèse adaptée d'après Nairn *et al.*²⁰⁸.

La chaîne de synthèse des O-glycanes a été annotée avec les résultats de notre étude transcriptomique. Les gènes dont l'expression **augmente** après irradiation sont annotés en **rouge**, ceux dont l'intensité **diminue** sont annotés en **vert**. Les gènes sont regroupés en famille en fonctions des étapes catalysées par les enzymes pour lesquelles ils codent. Plusieurs enzymes peuvent correspondre à une même étape. Le rôle de certaines enzymes peut être redondant.

III.C. Maturation (*capping*)

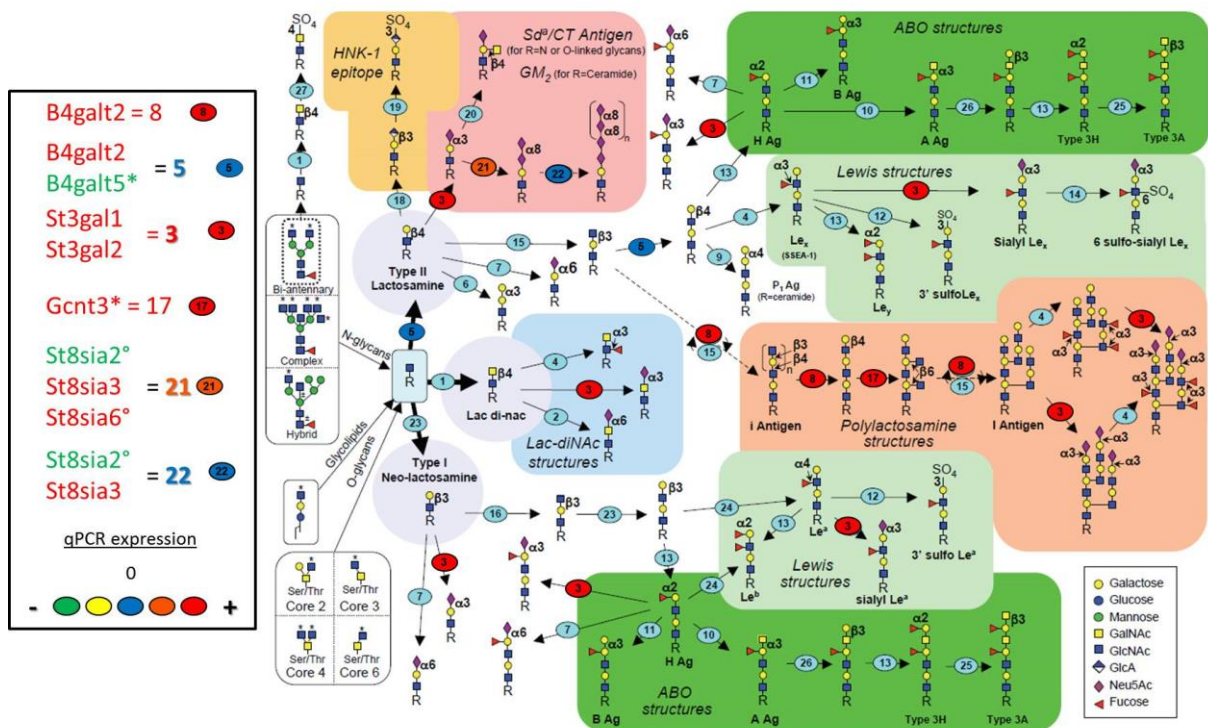


Figure 45 : Présentation globale des résultats concernant l'effet de l'irradiation sur la régulation du *capping* dans les tissus intestinaux de souris, voie de synthèse adaptée d'après Nairn *et al.*²⁰⁸.

Les étapes du *capping* ont été annotées avec les résultats de notre étude transcriptomique. Les gènes dont l'expression **augmente** après irradiation sont annotés en **rouge**, ceux dont l'intensité **diminue** sont annotés en **vert**. Les gènes sont regroupés en famille en fonction des étapes catalysées par les enzymes pour lesquelles ils codent. Plusieurs enzymes peuvent correspondre à une même étape. Le rôle de certaines enzymes peut être redondant.

III.D. O-glycanes de types non GalNAc

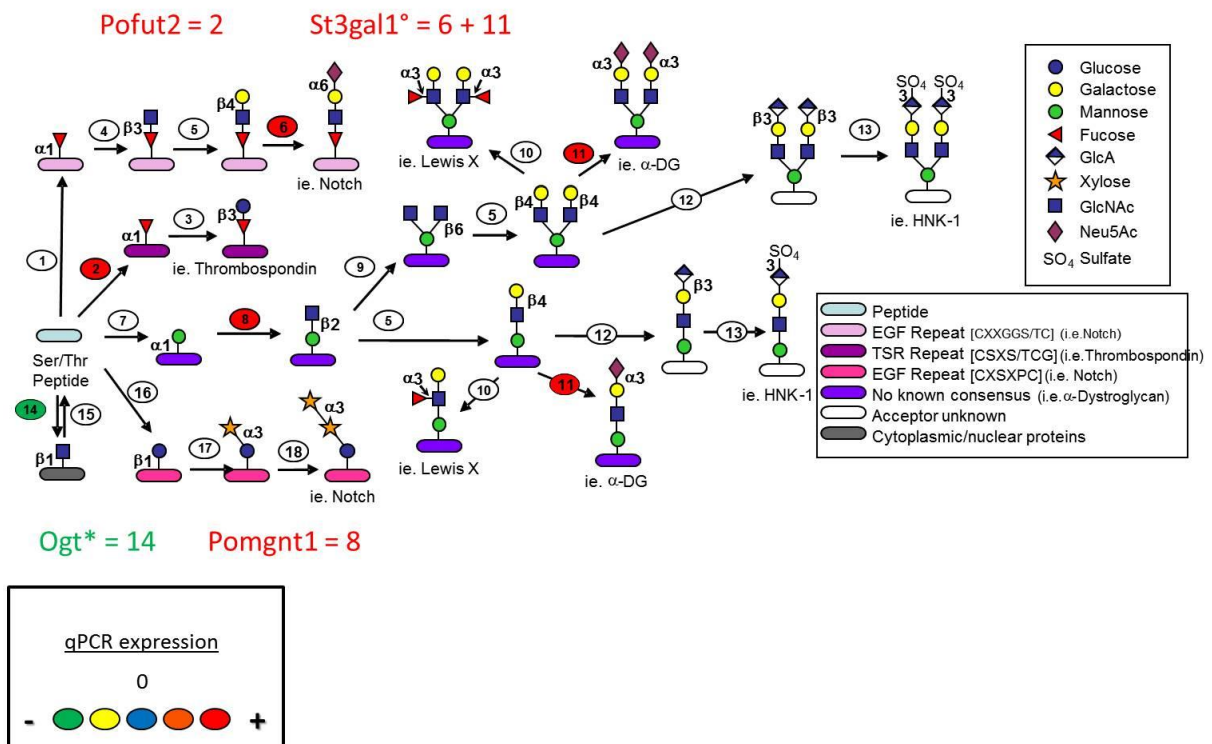


Figure 46 : Présentation globale des résultats concernant l'effet de l'irradiation sur la régulation des O-glycanes non GalNAc dans les tissus intestinaux de souris, voie de synthèse adaptée d'après Nairn *et al.*²⁰⁸.

La chaîne de synthèse des O-glycanes non GalNAc a été annotée avec les résultats de notre étude transcriptomique. Les gènes dont l'expression **augmente** après irradiation sont annotés en **rouge**, ceux dont l'intensité **diminue** sont annotés en **vert**. Les gènes sont regroupés en famille en fonctions des étapes catalysées par les enzymes pour lesquelles ils codent. Plusieurs enzymes peuvent correspondre à une même étape. Le rôle de certaines enzymes peut être redondant.

IV. Correspondance gènes/enzymes de glycosylation impliqués dans les étapes des chaines de synthèse des glycanes

Données issues de Nairn *et al.*²⁰⁸

IV.A. Etape de synthèse dans le RE du précurseur de la N-glycosylation

Tableau 6 : gènes codants pour les enzymes impliqués dans les différentes étapes de synthèse des N-glycanes.

numéro dans le schéma (groupe d'enzyme)	gène codant pour l'enzyme
1	Alg5
2	Dpm1
	Dpm2
	Dpm3
3	Dolk
4	Dpagt1
5	Alg13
	Glit28d2
6	Alg14
7	Alg1
8	Alg2
9	Alg11
10	Rft1
11	Alg3
12	Alg9
13	Alg12
14	Alg6
15	Alg8
16	Alg10
17	Rpn1
	Rpn2
	Ddost
	Dad1
	Stt3a
	Stt3b
	Tusc3
	Riken (OST4 homologue)

IV.B. Etape de synthèse des N-glycanes

Tableau 7 : gènes codants pour les enzymes impliqués dans les différentes étapes de synthèse des N-glycanes.

numéro dans le schéma (groupe d'enzyme)	gène codant pour l'enzyme
1	Gcs1
2	Prkcsh
	Ganab
3	Ugcgl1
	Ugcgl2
4	Endo alpha-Mannosidase
5	Man1b1
6	Man2c1
7	Man1a1
	Man1a2
	Man1c1
8	Mgat1
9	B3galt1
	B3galt2
	B3galt5
10	B4galt1
	B4galt2
	B4galt3
	B4galt4
	B4galt5
11	Mgat3
12	Man2a1
	Man2a2
13	Fut8
14	Mgat2
15	Mgat4a
	Mgat4b
	Mgat4c
16	Mgat5
	Mgat5b
17	Mgat4c
18	Gnptg
	Gnptab
19	Nagpa
système ERAD (dégradation des protéines mal repliées)	Edem1
	Edem2
	Edem3
dégradation lysosomale	Fuca1
	Fuca2
	Manba
	Man2b1

IV.C. Synthèse et maturation des O-glycanes

Tableau 8 : gènes codants pour les enzymes impliqués dans les différentes étapes de synthèse des O-glycanes.

numéro dans le schéma (groupe d'enzyme)	gène codant pour l'enzyme
1	Galnt1
	Galnt2
	Galnt3
	Galnt4
	Galnt5
	Galnt6
	Galnt7
	Galnt8
	Galnt9
	Galnt10
	Galnt11
	Galnt12
	Galnt13
	Galnt14
	Galnt1
	Galnt2
2	Galnt3
	Galnt4
	Galnt5
	Galnt6
	St6galnac1
	St6galnac2
3	St6galnac3
	St6galnac4
4	St6galnac5
	St6galnac6
5	C1galt1
	C1galt1c1
6	Fut1
	Fut2
	Sec1
7	St3gal1
8	A4gnt
9	St6galnac1
	St6galnac2
10	B3gnt3
	Gcnt1
11	Gcnt3
	Gcnt4 (humain)
	Ggta1
12	B4galt1
	B4galt4
	B4galt5
13	B3gnt6
	B3gnt1
	B3gnt2
	B3gnt4
14	B3gnt8
	Gcnt3
15	Gcnt1
16	Abo

IV.D. Le *decorating* et le *capping*, processus communs au N- et aux O- glycanes

Tableau 9 : gènes codants pour les enzymes impliqués dans les différentes étapes du *capping*.

numéro dans le schéma (groupe d'enzyme)	gène codant pour l'enzyme
1	B4galnt3
	B4galnt4
2	St6galnac1
	St6galnac2
	St6galnac3
	St6galnac4
	St6galnac5
	St6galnac6
3	St3gal1
	St3gal2
	St3gal3
	St3gal4
	St3gal5
	St3gal6
4	Fut11
	Fut4
	Fut7
	Fut9
	Fut10
	Fut6
5	B4galt1
	B4galt2
	B4galt3
	B4galt4
	B4galt5
	B4galt6
6	Ggta1
7	St6gal1
	St6gal2
8	B4galt1
	B4galt2
	B4galt3
	B4galt4
9	A4galt
10	Abo
11	Abo
12	Gal3st1
13	Fut1
	Fut2
	Sec1
14	Chst2
	Chst4
15	B3gnt1
	B3gnt2
	B3gnt4
	B3gnt5
	B3gnt8
	B3gnt6
	B3gnt3
16	B3gnt3
17	Gcnt2
	Gcnt3

	Gcnt4
18	B3galt1
	B3galt2
19	Chst10
20	B4galnt1
	B4galnt2
21	St8sia1
	St8sia2
	St8sia3
	St8sia4
	St8sia5
	St8sia6
22	St8sia2
	St8sia3
	St8sia4
23	B3galt1
	B3galt2
	B3galt5
24	fut3
25	B3galnt2
26	B3galt4
	B3galt5
27	Chst8
	Chst9

IV.E. O-glycanes de type non GalNAc

Tableau 10 : gènes codants pour les enzymes impliqués dans les différentes étapes de synthèse des O-glycanes non GalNAc.

numéro dans le schéma (groupe d'enzyme)	gène codant pour l'enzyme
1	Pofut1
2	Pofut2
3	B3glct
4	Lfng
	Mfng
	Rfng
5	B4galt1
6	St3gal1
	St3gal4
	St6gal1
	St6gal2
7	Pomt1
	Pomt2
8	Pomgnt1
9	Mgat5b
10	Fut4
	Fut7
	Fut9
	Fut10
	Fut11
11	St3gal1
	St3gal4
12	B3gat1
	B3gat2
13	Chst10
14	Ogt
	Eogt
15	Mgea5
16	xylt-xylt
	Poglct
	Ktelc1
17	Gxylt1
	Gxylt2
18	Xxylt

V. Modèle cellulaire

Modèle de cellules primaires endothéliales (HUVEC)

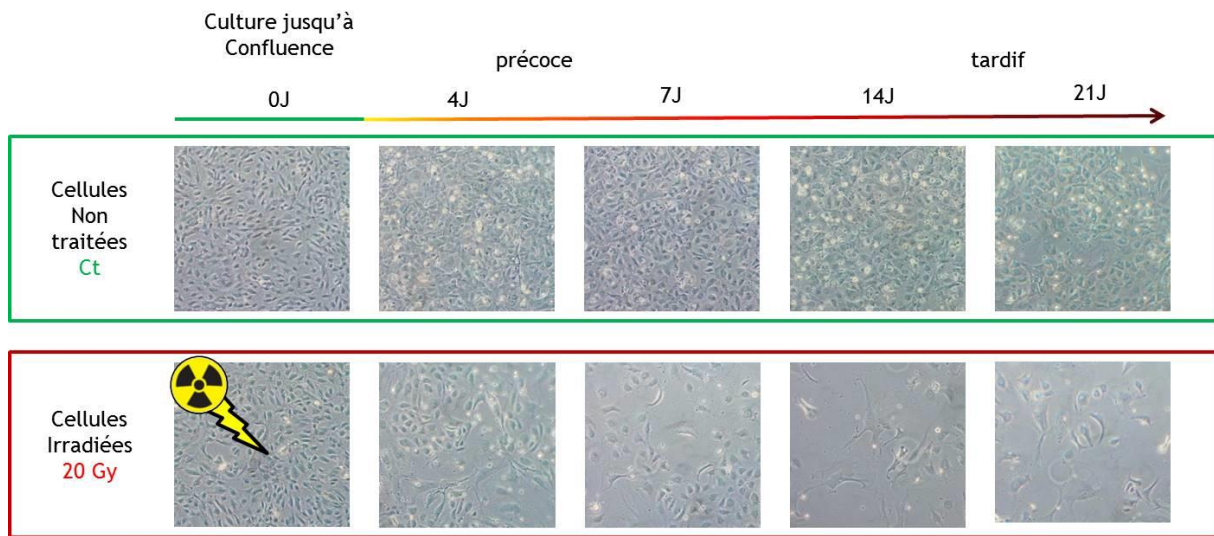


Figure 47 : Modèle de cellules endothélial HUVECs.

Les cellules sont cultivées jusqu'à confluence puis irradiées et suivis en cinétique entre 1 et 21 jours.

VI. Modèle murin

Modèle de grêle radique chez la souris C57BL/6

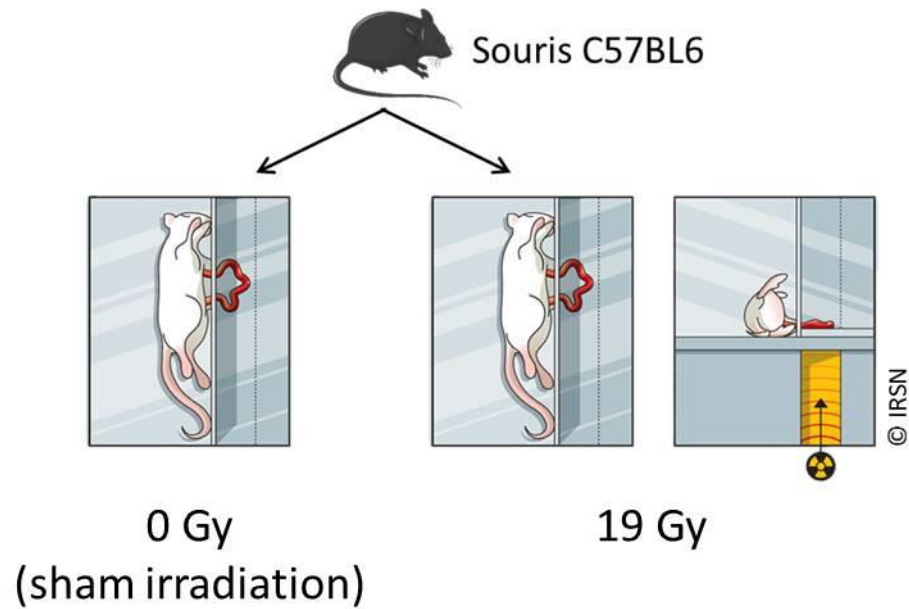


Figure 48 : Modélisation chez la souris C57BL/6 des effets secondaires des Radiothérapies au niveau de l'anse intestinale.

L'anse extériorisée par chirurgie est irradiée à une dose de 19 Gy et permet d'obtenir un phénotype et des lésions comparables à ceux des tissus sains irradiés chez le patient.

VII. CV du candidat

Cyprien JAILLET, né le 08/12/1989.

Ingénieur-Doctorant à l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN).

Formation

- **Doctorat en Radiobiologie et Glycobiologie Fonctionnelle (2013-2017)**
Ecole doctorale de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique, ED394, Université Paris 6 (UPMC).
- **Certificat d'aptitude à l'expérimentation animale niveau I (2015)**
UPMC, Paris.
- **Diplôme d'ingénieur en biotechnologies (grade de Master), spécialisation en recherche et développement (2013)**
Ecole de Biologie Industrielle (EBI), Cergy.
- **Ecole préparatoire EBI (2009-2010),**
Ecole de Biologie Industrielle (EBI), Cergy.
- **Première année de médecine (PCEM1) (2007-2009),**
Université Paris 7 Diderot, Paris.
- **Baccalauréat Scientifique (2007),**
Lycée Jean Renoir Asnières (92).

Parcours professionnel

- **Doctorant en Radiobiologie et Glycobiologie (2013-2017)**
Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, Fontenay aux Roses. Laboratoire de Recherche en Radiobiologie et Radiopathologie (L3R).
« Modifications du glycome endothélial vasculaire dans le contexte d'une irradiation à forte dose »
- **Stagiaire de fin d'étude d'ingénieur - équivalent M2 (2013)**
Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, Fontenay aux Roses. Laboratoire de Radiopathologie et de Thérapies Expérimentales (LRTE).
« Modification de la glycosylation des protéines membranaires des cellules endothéliales en réponse à l'irradiation »
- **Stagiaire de 1^{er} année d'ingénieur - équivalent L3 (2011)**
Pr Jacques-P. Tremblay Lab, CHU de Québec – Université Laval, Québec, Canada.
« Solution thérapeutique pour la myopathie de Duchenne: modification de myoblastes humain par protéines a doigts de zincs ».
- **Stagiaire L2 (2010)**
Service de recherche en panification, Lesaffre international, Lille-Marcq-en-Barœul.
« Génération d'arômes par bioconversion avec *Saccharomyces cerevisiae* ».

Collaborations

Université de Lille, UMR Lille1/CNRS n°8576, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle : analyse du glycome et du glycocalyx des cellules endothéliales irradiées

Encadrement

Maéva Gesson (2014, 4 mois): « Microscopie multiphoton pour l'étude de la structure 3D de la vascularisation des villosités intestinales après une irradiation localisée de l'intestin à forte dose.»

Master 1 Biologie Cellulaire et Physiopathologie, Université Paris 7.

Membre de sociétés savantes et d'associations scientifiques

- Membre de la Radiation Research Society (RRS) (Etats-Unis)
- Membre de la European Radiation Research Society (ERRS)
- Vice-secrétaire de l'association des doctorants et post-doctorants de l'IRSN (Adi[N])

Publications dans des revues à comité de lecture

Jaillet C, Morelle W, Slomianny M-C, Paget V, Tarlet G, Buard V, Selbonne S, Caffin F, Rannou E, Martinez P, François A, Foulquier F, Allain F, Milliat F, Guipaud O. *Radiation-induced changes in the glycome of endothelial cells with functional consequences*. Soumis en décembre 2016.

Rannou E, François A, Toullec A, Guipaud O, Buard V, Tarlet G, Mintet E, Jaillet C, Iruela-Arispe M.L, Benderitter M, Sabourin J-C, Milliat F. *In vivo* evidence for an endothelium-dependent mechanism in radiation-induced normal tissue injury. *Sci Rep* **5**, 15738 (2015).

Communications orales

Jaillet C. *Le glycome vasculaire dans le contexte d'une irradiation à forte dose*, jeudi du SRBE mai 2016, IRSN Fontenay-aux-roses, France.

Jaillet C. *Modifications radio-induites du glycome de l'endothélium vasculaire : implications sur le recrutement des cellules circulantes et sur la thrombose vasculaire dans le tissu irradié*, Journée des thèses de l'IRSN 2016, le Croisic, France.

Jaillet C. *Role of endothelial cell glycosylation in initiation and development of radiation tissue injury*, Plenary Session – From Bench to Clinic, 16th Jed 394 UPMC 2015, Paris, France.

Jaillet C. *Modifications radio-induites du glycome de l'endothélium vasculaire : implications sur le recrutement des cellules circulantes et sur la thrombose vasculaire dans le tissu irradié*, Journée des thèses de l'IRSN 2015, L'Isle-sur-la-Sorgue, France.

Communications affichées

Jaillet C, Morelle W, Martinez P, Slomianny M-C, Buard V, Caffin F, Selbonne S, Benderitter M, Slomianny C, Lacoste A-S, Foulquier F, Francois A, Milliat F, Allain F, Guipaud O. *Role of endothelial glycome in a context of high doses radiation exposure*, **17th Jed 394 UPMC 2016**, Paris, France.

Jaillet C; Martinez P; Slomianny M-C; Morelle W; Buard V; Benderitter M; Milliat F; Allain F; Guipaud O. *Role of endothelial cell glycosylation in the initiation and development of radiation tissue injury*, 2015 : **61st Annual Meeting of the Radiation Research Society**, Weston, USA.

Jaillet C; Guipaud O. Radiation-induced modification of the endothelial glycome: action on cell circulation and thrombosis, **15th Jed 394 UPMC 2014**, Paris, France.

Prix scientifiques

Student in Training – Travel Award, 2015, **61st Annual Meeting of the Radiation Research Society**, Weston, USA.

Gagnant du concours de projet innovation en équipe pluridisciplinaire, **Doctoriales UMPC Avril 2016**, Sèvres, France.

Modifications du glycome endothélial vasculaire dans le contexte d'une irradiation à forte dose

Résumé: La radiothérapie constitue l'un des principaux traitements pour l'éradication des cancers. Cependant, elle présente un risque d'effets secondaires aux tissus sains environnant les tumeurs. Dans ce processus, le système vasculaire et plus particulièrement l'endothélium jouent un rôle clé. Les cellules endothéliales activées favorisent le recrutement chronique des thrombocytes et des leucocytes, contribuant ainsi aux effets secondaires. D'autre part, dans les maladies inflammatoires, les glycanes exprimés à la surface des cellules endothéliales sont modifiés et influencent le recrutement des cellules immunitaires. Dans cette étude, nous avons évalué la modification des glycanes endothéliaux en réponse à une irradiation à forte dose, et étudié les effets fonctionnels de ces modifications sur le recrutement des leucocytes en utilisant un modèle de cellules endothéliales (HUVECs) *in vitro*. Nos résultats apportent les premières preuves d'une modification du glycome des cellules endothéliales en réponse à l'irradiation. Les N-glycanes hautement mannosylés, les O-glycanes et les motifs sialylés sont surexprimés. Parallèlement, le glycocalyx endothélial semble subir une dégradation. Nous avons évalué l'effet fonctionnel des modifications glycaniques des cellules endothéliales irradiées sur l'adhésion d'une lignée de monocyte (THP-1). Nos résultats montrent que l'adhésion radio-induite est en partie due à la surexpression endothéliale des N-glycanes hautement mannosylés. Nous avons aussi évalué le glycome sur un modèle de souris irradiées et sur des pièces opératoires de patients traités par radiothérapies. Nos résultats de transcriptomiques sur la souris suggèrent l'existence de modifications glycaniques radio-induites *in vivo*. L'intégration de la composante glycanique permet de porter un regard nouveau sur le continuum d'évènement qui conduit aux lésions tissulaires radio-induites. A l'avenir, l'étude du glycome pourrait ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques pour une meilleure prise en charge des effets secondaires de la radiothérapie.

Mots clés : endothélium vasculaire, radiothérapie, effets secondaires, glycanes, glycocalyx, recrutement leucocytaire.

Modifications in the glycome of the vascular endothelium in a context of high dose radiation exposure

Abstract: Radiotherapy is one of the main treatments against cancers. However, it presents a risk of adverse effects for the normal tissues surrounding the tumors. The vascular network and especially the endothelium are considered as main targets to limit normal tissue damages and prevent side effects of radiotherapy. Activated endothelial cells are involved in the chronic recruitment of thrombocytes and leukocytes, resulting in tissue complications. On the other hand, in inflammatory diseases, the glycans expressed on the surface of endothelial cells are modified and lead to immune cells recruitment. In this work, we sought to evaluate changes in endothelial glycome in a context of exposure to high dose of radiation, and studied the functional consequences on the recruitment of leukocytes. *In vitro*, the characterization of the glycome was performed on a primary endothelial cell model (HUVEC). Our results provide the first evidences of an endothelial modification of the glycome after exposure to ionizing radiation. We report an overexpression of high mannose N-glycans, O-glycans and sialylated motifs. At the same time, endothelial glycocalyx appeared to be damaged by exposure to radiation. Next, we evaluated these radiation-induced modifications of endothelial glycans on monocyte adhesion. We show that the radiation induced adhesion was mediated by overexpression of high mannose N-glycans. We also investigated changes in glycome in an irradiated mouse model of enteropathy and in resections of patients treated with radiotherapy. In mice, a transcriptomic study suggests changes in glycans following radiation exposure. Collectively, these findings on glycome changes provide a new perspective of the continuum of events leading to normal tissue complications. In the future, the study of the glycome should open new therapeutics opportunities for better management of tissue damages induced by radiation.

Keywords : vascular endothelium, radiotherapy, side effects, glycans, glycocalyx, leukocyte recruitment.