

Caractérisation des interactions entre monocytes et cellules endothéliales après irradiation

Ségoène LADAIGUE, Anne-Charlotte LEFRANC, Khadidiatou BALDÉ, Monica QUITOCO, Émilie BACQUER, Agnès FRANCOIS, Vincent PAGET, Fabien MILLIAT, Olivier GUIPAUD

Laboratoire de Radiobiologie des Expositions Médicales (LRMed)
Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN)
31 avenue Division Leclerc 92262 Fontenay-aux-roses

segolene.ladaigue@irsn.fr

Plus de la moitié des patients atteints de cancers sont traités par radiothérapie en France chaque année. Malgré les avancées technologiques pour mieux cibler la tumeur, une proportion non négligeable de tissus sains dans le champ de l'irradiation reçoit des rayonnements, à l'origine des complications précoces et tardives de la radiothérapie. Dans ce contexte, la radiobiologie des tissus sains constitue un enjeu majeur afin de mieux comprendre, prévenir et éventuellement guérir les toxicités radio-induites chez les patients.

Parmi les tissus sains, l'endothélium vasculaire forme la couche interne des vaisseaux sanguins. Il joue un rôle clé dans le développement des complications tardives telles que la fibrose. Plusieurs mécanismes prennent place au niveau de l'endothélium et participent à ces complications, dont une modification des acteurs moléculaires du recrutement immunitaire. En effet, l'endothélium constitue la barrière que toute cellule immunitaire doit traverser pour passer de la circulation sanguine au tissu lésé, via les étapes d'adhésion et de migration trans-endothéliale. A chaque étape, de nombreuses molécules d'interaction entre endothélium et cellule immunitaire sont engagées. D'autre part, le rôle du recrutement immunitaire, notamment des monocytes/macrophages, dans la fibrose radio-induite a été mis en évidence. Cependant les mécanismes sous-jacents sont méconnus. L'endothélium pourrait se révéler un acteur clé dans ce processus.

Les précédents travaux du laboratoire ont mis en évidence *in vitro* une augmentation radio-induite des glycosylations présentes à la surface des cellules endothéliales, notamment des N-glycosylations hautement mannosylées (oligomannoses), des structures immatures absentes en condition normale. Dans ces travaux, des tests d'adhésion (première étape du recrutement immunitaire) sur tapis de cellules endothéliales, ont montrés que l'irradiation augmentait l'adhésion des monocytes et cela sous la dépendance des oligomannoses. Aussi, une étude transcriptomique ciblée a révélé que l'irradiation diminuait l'expression d'un gène codant pour une α -1,2-mannosidase de classe I : *man1c1*. MAN1C1 participe à la maturation des N-glycosylations en coupant les mannosés des oligomannoses, permettant le branchement d'autres sucres et la formation de glycosylations matures. Nous supposons que la diminution radio-induite de l'expression de *man1c1* pourrait expliquer l'augmentation des oligomannoses et par conséquent l'augmentation de l'adhésion monocyttaire.

Ce projet a pour but d'évaluer le rôle de MAN1C1 et des oligomannoses dans le recrutement des monocytes post-irradiation. Le suivi des étapes du recrutement immunitaire comme l'adhésion et la migration trans-endothéliale des monocytes a été réalisé par vidéo-microscopie et imagerie en temps réel (système Incucyte). Ces tests ont été effectués avec des modèles cellulaires humains comme les THP-1 (monocytes) et les HUVECS (cellules endothéliales) irradiées à 20 Gy. Le rôle de de MAN1C1 sur les oligomannoses et le

recrutement des monocytes ont été évalués grâce à une stratégie d'inhibition par ARN interférents (siRNA) et de surexpression par vecteurs lentiviraux. *In vivo*, le rôle des oligomannoses dans le recrutement précoce des cellules immunitaires (entre 1 et 7 jours post-irradiation) a été étudié par marquages immunohistochimiques après une irradiation abdominale à 18 Gy chez la souris.

A ce jour, la mise au point d'un outil robuste pour évaluer la transmigration nous a permis de montrer que l'irradiation des HUVECs active la migration trans-endothéliale des THP-1 de manière dose-dépendante. L'inhibition de *man1c1* par les siRNA augmente l'adhésion des THP-1 sur les HUVECs en condition de flux et diminue la migration trans-endothéliale des THP-1. Associé à cela, une augmentation de la quantité d'oligomannoses présents à la surface des HUVECs transfectées par le siRNA, a été observée par cytométrie en flux à l'aide d'une lectine fluorescente reconnaissant les oligomannoses. Les premiers résultats obtenus en condition de surexpression de MAN1C1 semblent indiquer que l'adhésion des THP-1 sur les HUVECs en condition de flux est diminuée après irradiation et que la migration trans-endothéliale est augmentée par comparaison aux contrôles. De même, nous avons observé par cytométrie que la quantité d'oligomannoses est diminuée chez les HUVECs surexprimant MAN1C1. Des expériences supplémentaires sont en cours pour valider nos observations. Le rôle des oligomannoses dans le recrutement des monocytes *in vivo* est également en cours d'analyse par immunohistochimie chez des souris irradiées puis injectées avec des lectines ciblant les oligomannoses (concanavoline A et cyanovirine N).

Pour conclure, ces travaux suggèrent que la mannosidase endothéliale MAN1C1 a un rôle de régulation du recrutement des monocytes via la régulation des oligomannoses à la fois dans les étapes d'adhésion et de migration trans-endothéliale après irradiation. *In vivo*, l'étude du rôle des oligomannoses sur l'infiltration immunitaire post-irradiation nous dira si les oligomannoses pourront se révéler une cible de choix pour limiter le recrutement des monocytes/macrophages et ainsi les toxicités radio-induites associées.