

Université Pierre et Marie Curie

Ecole Doctorale 394

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

Conséquences de la délétion spécifique de PAI-1 dans l'endothélium sur la réponse radio-induite de l'intestin

Présentée par

Emilie RANNOU

Thèse de doctorat de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Dirigée par le Professeur Jean-Christophe Sabourin (Directeur de thèse)

et le Docteur Fabien Milliat (Encadrant)

Présentée et soutenue publiquement le 17 Mars 2015

Devant un jury composé de :

Professeur Joëlle Sobczak-Thépot

Docteur François Paris

Docteur Marc-André Mouthon

Docteur Eric Ogier-Denis

Docteur Denis Vivien

Professeur Jean-Christophe Sabourin

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

*« La théorie, c'est quand ça ne marche pas mais qu'on sait pourquoi.
La pratique, c'est quand ça marche mais qu'on ne sait pas pourquoi.
Quand la théorie rejoint la pratique, ça ne marche pas et on ne sait pas pourquoi. »*

Lois de Murphy

*« Chaque fois que la science avance d'un pas,
c'est qu'un imbécile la pousse, sans le faire exprès. »*

Emile Zola

« La science consiste à passer d'un étonnement à un autre. »

Aristote

REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement chacun des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse :

- *Le Professeur **Joëlle Sobczak-Thépot**, pour avoir accepté de présider ce jury*
- *Les Docteurs **Marc-André Mouthon** et **François Paris**, pour avoir accepté d'en être les rapporteurs*
- *Les Docteurs **Eric Ogier-Denis** et **Denis Vivien**, pour avoir accepté d'en être les examinateurs*

*Je remercie chaleureusement **Marc Benderitter** et **Philippe Voisin** de m'avoir accueilli au sein de SRBE et de l'ex LRIE. Merci de m'avoir permis de réaliser ce projet de thèse dans des conditions, j'en suis consciente, privilégiées.*

*Je remercie très chaleureusement mon directeur de thèse, le **Professeur Jean-Christophe Sabourin**, pour sa gentillesse et sa bienveillance, tant humaine que scientifique. Merci d'avoir supervisé ce projet de votre œil de clinicien.*

*Un immense merci au **Docteur Fabien Milliat**, mon encadrant qui est aussi chef du L3R, et sans qui ces 3 années n'auraient pas été les mêmes. Au-delà du projet scientifique, qui était extrêmement bien construit, ambitieux et innovant, je te remercie de m'avoir permis de revenir dans les laboratoires malgré mon parcours atypique. Tu as su m'encadrer avec une grande intelligence, une grande disponibilité, et tu m'as laissé l'indépendance dont j'avais besoin. Grâce à toi, je pense débiter ma carrière de chercheur avec des bases extrêmement solides, et une réflexion scientifique affûtée. Enfin, merci de m'avoir fait profiter de ton expérience et de ton esprit scientifique brillant tout au long de ces 3 ans.*

*Un très grand merci à **Agnès François**. Je suis extrêmement heureuse d'avoir croisé ta route, tant sur le plan humain que scientifique. Merci pour ta grande gentillesse, tes conseils précieux, ton aide constante, et ta bonne humeur communicative! Tu m'as également apporté, au même titre que Fabien, une rigueur scientifique de par ton analyse scientifique aiguisée.*

*Je remercie chaleureusement le reste de l'équipe du L3R: **Olivier**, pour tes conseils et ton aide lors des fameuses manip adhésion et pour l'analyse des TLDA. **Georges**, pour ton aide et tes conseils avisés (et rigoureux!) en biologie moléculaire. **Valou**, pour beaucoup de chose. Pour ton aide*

régulière lors des manips, pour tes précieux conseils en histologie, pour ta grande gentillesse, ta bonne humeur à toute épreuve, et ton réconfort dans les moments difficiles. Et Céline.

*Une pensée toute particulière pour « tous mes compagnons de galère », ceux qui sont partis, et ceux qui sont toujours là. Ma **Didie**, pas besoin de longs discours, tu sais déjà tout le bien que je pense de toi. J'espère que notre amitié continuera à s'écrire au-delà des murs de notre bureau. **Cyprien**, un grand merci pour ta bonne humeur inébranlable, tes coups de main attentionnés (vive les THP-1 et les tests adhésion n'est-ce pas ahah), et ton humour...dont toi seul as le secret ! **Jeremy**, tu es quelqu'un de formidable, un ami précieux qu'il est bon d'avoir à ses côtés. Bonne route à toi pour cette thèse qui débute, et prends bien soin de mes souricettes ! Aux anciens, **Raphaëlle**, **Jean-Victor** et **Christelle**, mes grands frères et grandes sœurs lors de mon arrivée. Merci à vous tous pour ces expériences humaines et scientifiques, tous ces fou-rires, et votre soutien. Vous me manquez !*

*Une grosse pensée pour les post-docs et techniciens qui ont partagé un peu de mon expérience au laboratoire. **Béatrice**, merci pour ton aide lors de mon arrivée, notamment pour la prise en main des élevages que tu gérais avec brio. Et merci également pour ton soutien personnel. **Aurore**, merci beaucoup pour tes précieux conseils expérimentaux, et surtout pour la rédaction du papier et du manuscrit, ton expérience m'a été très précieuse. Et merci pour toutes ces soirées et tous ces fous-rires mémorables ! **Fanny**, tu fais également parti des belles rencontres de cette aventure, merci encore pour ton oreille attentive et tes conseils avisés, que mes problèmes soient professionnels ou personnels d'ailleurs. Et merci également de m'avoir fait partager à de nombreuses reprises ton expérience encore fraîche de la rédaction et de la soutenance. **Yoann**, je ne te remercierai jamais assez pour ton aide précieuse lors des séances d'irradiation. Merci également pour ta grande gentillesse et toutes ces longues discussions que nous avons pu avoir. Une pensée également pour **Hania** et **Marième**.*

*Je remercie également les collègues du L2RJ, pour leur gentillesse et leur aide régulière : **Radia**, **Stéphane** (la nespresso te salue !), **Noëlle**, **Alexandra**, **Christine** (merci pour tes conseils sur les macrophages et l'immunité intestinale), **Carine** (Mme histo !) **Claire**, **Christelle**, **Bruno** (j'en rigole encore !), **Valérie** (ma tatie d'adoption de l'IRSN !) **Benoit** (alias Grenoit, notre gros dur au cœur tendre préféré, merci pour ces discussions matinales), **Alexandre** (475, ça te rappelle quelque chose ?!), **Lara**, **Telma**, **Alendra**.*

Une pensée pour les collègues du L \mathcal{R} IOX, avec qui j'ai également partagé de très bons moments (Journées des thèses, soirées, congrès etc) : Jean-Marc, Yann, Téli, Clélia, Marie, Stéfania, Brice, Clémentine.

Une pensée également pour les collègues du LDB : Gaétan, Aurélie, Cécile, Éric, Laurence, Sandrine.

Un grand merci à nos deux secrétaires, Véronique et Sandra, pour leur gentillesse, leur efficacité et leur bonne humeur quotidienne. Une pensée affectueuse également pour Chloé, qui fait de son mieux pour nous rendre quotidiennement les manips plus faciles.

Enfin, une pensée toute particulière pour mes proches, et en particulier pour 3 personnes.

Marion, tu es plus qu'une amie pour moi, tu m'as toujours soutenue, dans les bons moments comme dans les mauvais, dans ma vie privée comme professionnelle. Notre amitié n'a pas de prix, et j'espère que nous en écrirons encore de nombreux chapitres.

Mamy, tu es partie beaucoup trop tôt, mais tu as toujours eu foi en moi et en ma capacité à réaliser mes rêves. Cette thèse, c'est aussi un peu grâce à toi. J'espère que de là-haut tu es fière de ta petite fille, et que tu continues à veiller sur moi comme tu l'as fait pendant 14 ans ...

Maman, les mots me manquent pour t'exprimer l'intensité de ma gratitude. Sans toi je ne serais rien, tu as toujours cru en moi, même quand je n'y croyais plus moi-même, tu m'as porté à bout de bras à chaque fois que j'ai trébuché, et tu as plus que quiconque contribué à la femme, et à la chercheuse que je suis. Alors, pour tout ça, et pour le reste, un immense merci.

ARTICLES ET COMMUNICATIONS

Articles

Rannou E, François A, Guipaud O, Buard V, Tarlet G, Toullec A, Mintet E, Jaillet C, Iruela-Arispe ML, Benderitter M, Sabourin JC and Milliat F. *Endothelial specific PAI-1 deletion protect against radiation-induced intestinal injury and influences inflammatory response* – soumis le 05/01/2015

Sedghi S, Pedruzzi E, Barreau F, **Rannou E**, Cazals-Hatem D, Tréton X, Jean-Pierre Hugot J-P, Ogier-Denis E and Daniel F. *Increased Proliferation of the Ileal Epithelium as a Remote Effect of Chronic Colitis* – en cours de soumission

Mintet E, **Rannou E**, Buard V, Guipaud O, Tarlet G, Sabourin J-C, Benderitter M, Milliat F and François A. *Identification of endothelial to mesenchymal transition as a potential participant to radiation-induced proctitis* – soumis dans The American Journal of Pathology le 30/12/2014

Toullec A, Buard V, **Rannou E**, Tarlet G, Benderitter M, Guipaud O, François A, Milliat F. *Endothelium- but not epithelium - specific HIF-1 α deletion protects from radiation-induced intestinal injury* – en cours de soumission

Communications orales

Rannou E, François A, Guipaud O, Buard V, Tarlet G, Toullec A, Mintet E, Benderitter M, Sabourin JC and Milliat F. *Endothelial PAI-1 deletion protects from radiation-induced intestinal damages and influences inflammatory response*. Septembre 2014, **41st Annual Meeting of the European Radiation Research Society**, Rhodes (Grèce)

Rannou E, François A, Guipaud O, Buard V, Tarlet G, Sabourin JC and Milliat F. *Consequences of conditional inactivation of PAI-1 in endothelium on physiopathological functions associated with radiation therapy side effects*. Juillet 2014, **22nd International Congress of Fibrinolysis and Proteolysis**, Marseille (France)

Rannou E, François A, Guipaud O, Buard V, Tarlet G, Sabourin JC and Milliat F. *Consequences de l'inactivation conditionnelle de PAI-1 dans l'endothélium sur les fonctions physiopathologiques associées aux complications des radiothérapies*. Avril 2014, **Journées des thèses IRSN**, Paris (France)

Rannou E, François A, Guipaud O, Buard V, Tarlet G, Sabourin JC and Milliat F. *Consequences de l'inactivation conditionnelle de PAI-1 dans l'endothélium sur les fonctions physiopathologiques associées aux complications des radiothérapies*. Octobre 2013, **Journées des thèses IRSN**, presqu'île de Giens (France)

Rannou E, François A, Guipaud O, Buard V, Tarlet G, Sabourin JC and Milliat F. *Consequences of conditional inactivation of PAI-1 in endothelium on physiopathological functions associated with radiation therapy side effects*. Mai 2013, **Journées des thèses de l'ED394**, Paris (France)

<u>Communications affichées</u>
--

Rannou E, François A, Guipaud O, Buard V, Tarlet G, Toullec A, Mintet E, Benderitter M, Sabourin JC and Milliat F. *Endothelial PAI-1 deletion protects from radiation-induced intestinal damages and influences inflammatory response*. Septembre 2014, **41st Annual Meeting of the European Radiation Research Society**, Rhodes (Grèce)

Rannou E, François A, Guipaud O, Buard V, Tarlet G, Sabourin JC and Milliat F. *Consequences of conditional inactivation of PAI-1 in endothelium on physiopathological functions associated with radiation therapy side effects*. Mai 2014, **Journées des thèses de l'ED394**, Paris (France)

Rannou E, François A, Guipaud O, Buard V, Tarlet G, Sabourin JC and Milliat F. *Consequences de l'inactivation conditionnelle de PAI-1 dans l'endothélium sur les fonctions physiopathologiques associées aux complications des radiothérapies*. Octobre 2012, **Journées des thèses IRSN**, le Croisic (France)

Rannou E, François A, Guipaud O, Buard V, Tarlet G, Sabourin JC and Milliat F.
Consequences of conditional inactivation of PAI-1 in endothelium on physiopathological functions associated with radiation therapy side effects. Mai 2012, **Journées des thèses de l'ED394**, Paris (France)

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS.....	p11
INTRODUCTION.....	p13
I. La radiothérapie.....	p13
1) <i>Les rayonnements ionisants et leurs effets biologiques</i>	p13
a. Caractéristiques des rayonnements ionisants.....	p13
b. Les effets moléculaires et cellulaires des rayons ionisants.....	p14
2) <i>La radiothérapie : aspects pratiques</i>	p17
a. Les techniques de radiothérapies.....	p17
b. Les paramètres des protocoles et leurs applications.....	p18
c. Compromis entre efficacité et effets secondaires.....	p20
II. Lésions radio-induites aux tissus sains : toxicité gastro-intestinale.....	p23
1) <i>Du concept de la cellule cible à la réponse intégrée</i>	p23
2) <i>Intestin et lésions radio-induites</i>	p26
a. Structure et fonction de l'intestin.....	p26
b. Irradiations corps entier et irradiations localisées.....	p29
c. Description histologique des lésions intestinales radio-induites.....	p32
d. Effets cytotoxiques : mort et régénération des cellules souches intestinales.....	p34
e. Effets indirects : la fibrose radio-induite.....	p39
III. Endothélium et lésions radio-induites.....	p45
1) <i>Structure et fonctions des vaisseaux sanguins</i>	p45
a. Organisation des vaisseaux sanguins et du réseau vasculaire.....	p45
b. Fonctions de l'endothélium vasculaire.....	p47
2) <i>Effets des rayonnements ionisants sur l'endothélium vasculaire</i>	p49
a. Apoptose des cellules endothéliales.....	p49
b. Activation de l'endothélium et inflammation.....	p52
c. Perte de la thromborésistance : implication du système coagulation/fibrinolyse.....	p56
3) <i>Implication des dysfonctions vasculaires dans le développement des lésions tissulaires radio-induites</i>	p59
IV. L'Inhibiteur des Activateurs du Plasminogène de type-1 (PAI-1).....	p65
1) <i>Généralités</i>	p65
2) <i>PAI-1 et physiologie</i>	p68

a. Homéostasie vasculaire.....	p68
b. Mort cellulaire.....	p70
c. Adhésion et migration cellulaire.....	p74
d. Senescence.....	p80
3) <u>PAI-1 et pathologies</u>	p86
a. Pathologies non radio-induites.....	p87
b. Pathologies radio-induites.....	p99
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS.....	p104
ARTICLE.....	p106
LA DELETION DE PAI-1 DANS L'ENDOTHELIUM PROTEGE L'INTESTIN DES LESIONS RADIQUES EN INFLUENÇANT LA REPONSE INFLAMMATOIRE CHEZ LA SOURIS	
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	p151
CONCLUSION.....	p176
ANNEXE : LE SYSTEME CRELOX.....	p177
1) <u>Principes généraux</u>	p177
a. La Cre recombinase et les séquences LoxP.....	p177
b. Application à la transgénèse <i>in vivo</i>	p178
c. Les limites du système CreLox.....	p183
2) <u>Souris Cre : intérêts du promoteur VE-Cadhérine pour cibler l'endothélium</u>	p186
3) <u>Des souris PAI-1^{flx/flx} aux souris PAI-1 KO^{endo} (VE-Cad-Cre ; PAI-1^{flx/flx})</u>	p192
a. Création des souris PAI-1 ^{flx/flx}	p192
b. Génération des souris PAI-1 KO ^{endo} et PAI-1 KO ^{endo(i)}	p195
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	p198
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	p225
TABLE DES TABLEAUX.....	p228
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	p229

AVANT-PROPOS

Le cancer reste à l'heure d'aujourd'hui l'un des principaux problèmes de santé publique dans de nombreux pays. Les derniers chiffres publiés font état de plus de 300000 diagnostics en France chaque année, un nombre qui est par ailleurs voué à augmenter dans les prochaines années. La radiothérapie est un outil indispensable de l'arsenal thérapeutique disponible pour le traitement de cette maladie, et concerne au moins 60% des patients traités, toutes techniques confondues.

L'un des principaux facteurs limitant l'efficacité des protocoles radiothérapeutiques sont les atteintes radio-induites aux tissus sains. D'une part, elles limitent l'escalade de dose délivrée à la tumeur, et d'autre part, elles peuvent altérer la qualité de vie des patients, voire engager leur pronostic vital. La publication récente du plan Cancer 2014-2019 place par ailleurs la toxicité des traitements anti-cancer comme un sujet de préoccupation majeure.

Près de la moitié des traitements par radiothérapie pratiqués en France chaque année concernent des cancers de la sphère abdominopelvienne. Dans ce contexte, une portion de l'intestin (et notamment de l'intestin grêle) peut se retrouver dans le champ d'irradiation. L'exposition de cet organe radiosensible entraîne le développement d'entérites radiques aiguës, qui peuvent évoluer vers la chronicité au fil des mois et des années, compromettant ainsi l'efficacité du protocole et la santé des patients. Les solutions thérapeutiques proposées pour la prise en charge de ces effets secondaires restent à ce jour limitées, et se cantonnent à des traitements symptomatiques ou compassionnels.

C'est à cette problématique que s'adresse le programme de recherche ROSIRIS mené en partie par le Laboratoire de Recherche en Radiobiologie et Radiopathologie (L3R) à l'IRSN. Les travaux menés dans le cadre de ce programme ont pour ambition de développer une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine des effets secondaires des radiothérapies par une approche pluridisciplinaire. Plus particulièrement, l'axe 3 de ce programme se concentre sur les effets biologiques, et vise à identifier les fonctions physiopathologiques impliquées dans le continuum entre la réponse tissulaire aiguë et tardive, notamment au niveau de l'intestin. Les concepts qui entourent les mécanismes d'initiation et de chronicité de ces lésions ont considérablement évolué ces dernières décennies, notamment

quant à la place du compartiment vasculaire, qui apparaît désormais comme un acteur principal. Or, bien que ce concept soit désormais admis, peu d'éléments concrets entourent l'existence de ce continuum endothélium-dépendant dans l'évolution des lésions intestinales radiques.

Ce travail de thèse a pour objectif de mettre en évidence l'existence de ce lien endothélium-dépendant entre l'initiation et la progression de l'entérite radique. Pour aborder cette problématique, nous avons utilisé comme outil moléculaire la protéine PAI-1, qui joue un rôle clé dans la pathogenèse de l'entérite radique, et semble intimement liée à l'endothélium. Grâce à l'utilisation de modèles transgéniques innovants, nous avons pu inactiver le gène codant pour PAI-1 spécifiquement dans le compartiment endothélial, et ainsi étudier les conséquences de cette modification phénotypique de l'endothélium sur le développement et l'évolution de l'entérite radique.

INTRODUCTION

I. La radiothérapie

La radiothérapie est un traitement locorégional des tumeurs cancéreuses, qui repose sur les propriétés biologiques des rayonnements ionisants pour détruire les cellules tumorales et stopper leur prolifération. L'enjeu de cette approche consiste à délivrer une dose maximale à la tumeur afin de garantir son élimination, tout en limitant la dose reçue par les tissus sains environnants.

1) Les rayonnements ionisants et leurs effets biologiques

a. Caractéristiques des rayonnements ionisants

La radioactivité est un phénomène naturel et spontané, au cours duquel un noyau atomique instable (ou radionucléide) se désintègre aléatoirement, afin d'acquies une configuration stable. La désintégration dégage donc de l'énergie sous forme de rayonnement, dont la nature dépend du type de désintégration. De cette manière, l'activité d'une source radioactive donnée se mesure en Becquerel (Bq), qui correspond au nombre de désintégrations par seconde de cette source.

Le rayonnement émis lors de la désintégration dépend donc de la nature du noyau radioactif émetteur. Les rayonnements particuliers sont, à l'exception des neutrons, directement ionisants, puisqu'ils sont capables d'arracher des électrons du cortège électronique des atomes lors de leur passage dans la matière. C'est le cas des rayonnements de type alpha (α) et bêta (β).

Les rayonnements électromagnétiques, qui sont utilisés dans les protocoles radiothérapeutiques, sont quant à eux indirectement ionisants. En effet, ils transfèrent leur énergie à la matière traversée, mettant de ce fait en mouvement les électrons du milieu, ces derniers étant cette fois directement ionisants. C'est le cas des rayonnements gamma (γ) et X. Un noyau excité, issu d'une désintégration radioactive, émet un photon afin de rejoindre un état d'énergie stable. Ce rayonnement est appelé rayonnement γ , fortement pénétrant (quelques millimètres à quelques centimètres de plomb, en fonction de son énergie, lui font écran). C'est le cas par exemple des sources de Cobalt 60 et Césium 137, qui sont utilisées dans le cadre de ce projet. Les rayonnements X sont, comme les rayonnements γ , de nature

photonique, mais ne possèdent pas la même origine : ils sont produits par le cortège électronique, alors que les photons gamma proviennent du noyau. Les rayons X peuvent être créés par bombardement ou accélération électronique. Le bombardement d'électron va entraîner un changement d'orbite des électrons des couches électroniques du noyau, créant des rayons X. L'accélération consiste à créer des électrons à partir d'un filament métallique (cathode), qui sont accélérés sous vide puis focalisés sur une cible métallique de tungstène ou de molybdène (anode). La déviation des électrons due à l'anode va produire une perte d'énergie de ces électrons sous forme de rayonnement X : il s'agit du rayonnement de freinage. Les propriétés particulières des rayons γ et X sont exploitées dans différents domaines d'application. Les propriétés physiques des rayons X de faible énergie sont utilisées en médecine dans le cadre des examens radiologiques ou des scanners. De même, les propriétés biologiques des rayons γ et X de forte énergie, qui seront détaillées par la suite, sont également utilisées en médecine dans le cadre des traitements par radiothérapie, ainsi que pour la stérilisation d'instruments chirurgicaux ou dans l'agroalimentaire pour les rayons γ (Tableau 1).

Type de rayonnement	Nom	Origine	Nature	Ecran	Applications
<i>Electromagnétique Indirectement ionisant</i>	Rayon X	Désexcitation après désintégration	photon	plomb béton	examens radiologiques scanner radiothérapie
	Rayon γ	Désexcitation après désintégration	photon	plomb béton	stérilisation médicale agroalimentaire radiothérapie

Tableau 1 : Principales caractéristiques des rayons ionisants

b. Les effets moléculaires et cellulaires des rayonnements ionisants

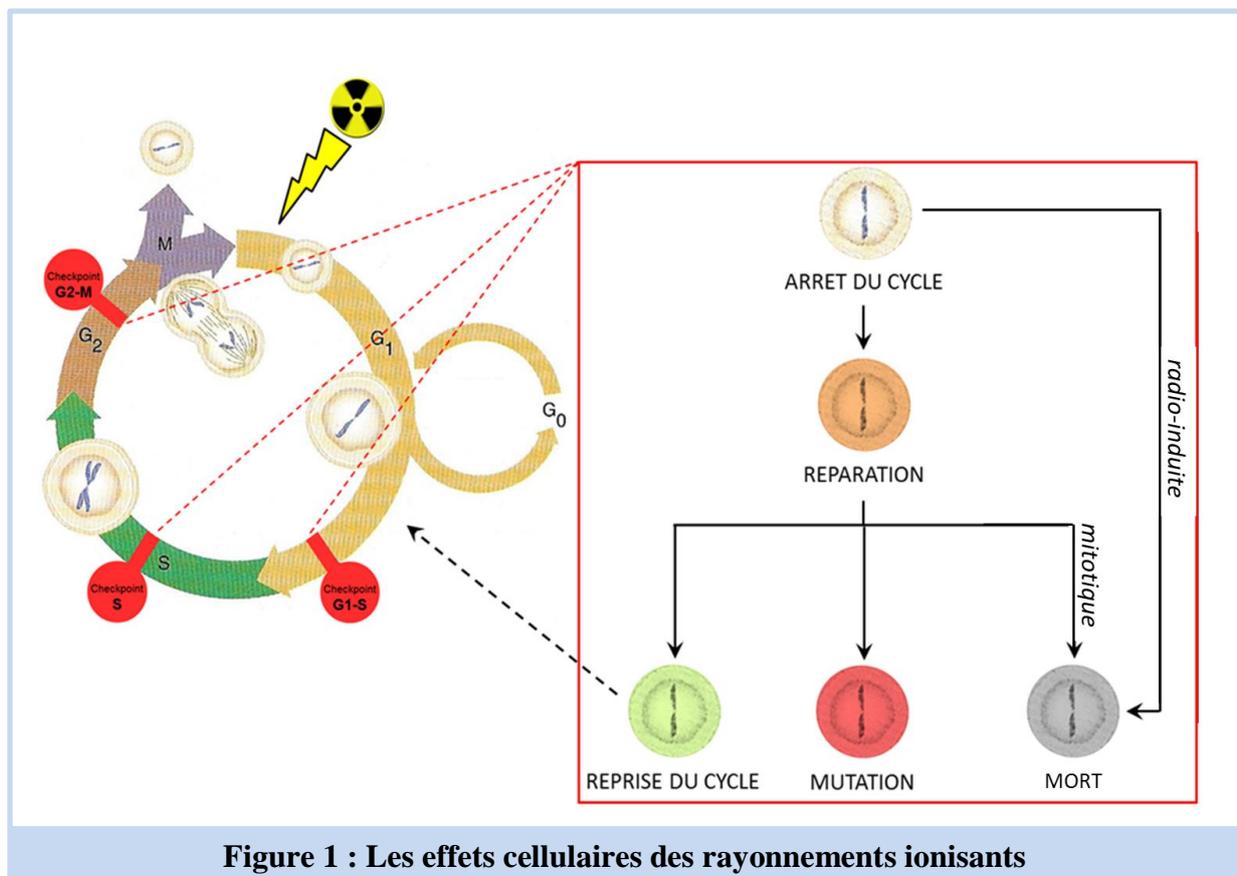
Les rayonnements ionisants, de par leurs propriétés physiques, vont créer en traversant une matière vivante des atteintes biologiques spécifiques, de l'échelle moléculaire à l'échelle macroscopique. Ces lésions peuvent conduire, à plus ou moins long terme, à la dysfonction ou à la mort de la cellule, du tissu, ou de l'organisme touché. Il est à noter que la dose absorbée par une matière s'exprime en Gray (Gy), qui correspond à l'énergie cédée (en joule) par unité de masse (en kilogramme). En d'autres termes, $1\text{Gy} = 1\text{ J.kg}^{-1}$.

Echelle moléculaires. Les effets des rayonnements ionisants sur une molécule biologique peuvent être directs, par ionisation ou excitation des différents composés cellulaires, ou bien indirects, par la création d'espèces radicalaires hautement réactives. Une cellule étant principalement composée d'eau, sa principale source de radicaux libres provient de la radiolyse de l'eau. En effet, l'interaction entre un rayonnement ionisant et une molécule d'eau conduit à l'excitation ou à l'ionisation de cette molécule, qui entraîne la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, pour Reactive Oxygen Species). Ces ROS, tels que les ions OH^\cdot , O_2^\cdot ou le peroxyde d'oxygène H_2O_2 , sont fortement ionisants (LaVerne et al. 2000), et agissent à leur tour sur les différentes molécules biologiques.

Bien que les rayonnements ionisants soient capables d'interagir avec de nombreux composés cellulaires, ce sont leurs effets sur les molécules d'ADN et les acides nucléiques qui les composent qui sont les plus délétères. Les lésions à l'ADN liées à l'exposition aux rayonnements ionisants peuvent être de différente nature. Elles peuvent tout d'abord toucher les nucléotides, provoquant la perte, la modification ou l'altération (oxydation, déamination...) d'une base. Les lésions peuvent également affecter la molécule d'ADN elle-même, sous forme de pontage ou de cassure. Les cassures double brin, bien qu'elles ne soient pas les plus fréquentes, sont les plus toxiques, puisqu'elles peuvent conduire à la modification de la séquence ADN. Elles impliquent la rupture plus ou moins symétrique et plus ou moins étendue du squelette phosphodiester des deux brins de la molécule d'ADN. Les deux principaux systèmes de réparation mis en jeu sont la recombinaison homologue (Homologous Recombination, HR) et la ligature d'extrémités non-homologues (Non-Homologous End Joining, NHEJ) (Santivasi et Xia, 2014). La recombinaison homologue permet de restaurer la séquence exacte du site lésé à partir de la séquence intacte située sur la chromatide sœur. C'est pour cette raison qu'elle intervient principalement en phase S et G2 du cycle cellulaire, lorsque les chromosomes possèdent deux chromatides. La NHEJ quant à elle, intervient principalement en phase G1, lorsque la recombinaison homologue n'est pas possible. Pouvant réparer toutes les formes de cassures, elle consiste à remplacer les nucléotides endommagés par homologie d'appariement. Il s'agit donc d'un mécanisme non conservatif, qui aboutit souvent à l'apparition de délétions ou de substitutions, pouvant provoquer des mutations.

La sévérité des lésions à l'ADN provoquées par les rayonnements ionisants dépend donc de leur nature, de leur nombre, ainsi que des mécanismes de réparation mis en jeu. C'est de l'ensemble de ces facteurs que dépend le devenir de la cellule après irradiation.

Echelle cellulaire. Il est important de comprendre les effets des rayonnements ionisants à l'échelle cellulaire, puisqu'ils sont à la base des traitements des tumeurs cancéreuses par radiothérapie. En effet, le devenir des lésions à l'ADN dépend principalement de la disponibilité des différents systèmes de réparation. C'est pourquoi la radiosensibilité d'une cellule dépend de la phase du cycle cellulaire dans laquelle elle se trouve au moment de l'exposition aux rayonnements ionisants. Il existe lors de l'interphase différents points de contrôle, qui permettent par le biais de senseurs, de s'assurer que la cellule est en état de répliquer son ADN ou de se diviser (Santivasi et Xia, 2014). Dans le cas contraire, les mécanismes de réparation de l'ADN sont alors mis en jeu.



Lorsque les lésions à l'ADN sont trop importantes, la cellule se trouve dans l'incapacité de les réparer, et entre en apoptose (Figure 1). On parle alors d'apoptose radio-

induïte. A contrario, lorsque les lésions à l'ADN sont moins importantes, la cellule tentera de les réparer (Figure 1).

- Dans le cas d'une réparation totale et fidèle, la cellule pourra continuer son cycle.
- Dans le cas d'un échec de réparation, la cellule peut alors perdre sa capacité de division et entrer dans un processus de mort cellulaire. On parle alors de mort mitotique (Verheij et Bartelink, 2000). Elle peut également poursuivre son cycle et se diviser en conservant les modifications des séquences ADN qu'elle a acquises. Ces modifications, lorsqu'elles se trouvent à l'intérieur de séquences codantes, entraînent alors des mutations, qui se transmettront aux cellules filles, et pourront être le point de départ d'un processus de cancérogénèse.

Les cellules cancéreuses possèdent entre autres caractéristiques une capacité proliférative incontrôlée, ainsi qu'une résistance aux signaux d'apoptose ou d'arrêt du cycle cellulaire. Ces propriétés, qui les rendent potentiellement plus radiosensibles que les cellules saines, sont la base de la stratégie radiothérapeutique.

2) La radiothérapie : aspects pratiques

La publication récente du plan cancer 2014-2019 fait état de 355000 diagnostics de cancer en France chaque année. Ce chiffre est par ailleurs probablement voué à augmenter, du fait d'une progression du nombre de cas et de l'amélioration des performances de dépistages. Cette maladie, responsable de près de 148000 décès annuels, est ainsi la première cause de mortalité précoce. Sur l'ensemble des patients traités chaque année, au moins 60% d'entre eux bénéficieront, à un moment ou à un autre de leur maladie, d'un traitement par irradiation. Ces quelques chiffres placent donc la radiothérapie comme une stratégie thérapeutique de premier plan.

a. Les techniques de radiothérapie

Il existe plusieurs techniques de radiothérapie, pouvant être utilisées seules ou en association avec d'autres thérapeutiques telles que la chirurgie, la chimiothérapie ou l'hormonothérapie. **La radiothérapie externe** tout d'abord, regroupe l'ensemble des techniques utilisant une source de rayonnement située à l'extérieur du corps du patient. Employant en premier lieu une source de radioéléments artificiels tels que le Cobalt 60, les appareils à télécobalt ont permis durant plusieurs décennies de traiter de nombreux cancers, notamment en France, et ce jusqu'au début des années 2000. Par ailleurs, dans le cadre de ce

projet, les animaux ont été exposés à une source de Cobalt 60. L'utilisation de ces sources fut par la suite progressivement supplantée par l'utilisation d'accélérateur linéaire d'électrons. Les rayons X possèdent en effet de nombreux avantages, tels que la précision des faisceaux, ainsi que l'affranchissement des déchets radioactifs inhérents aux sources cobalt. C'est pourquoi l'IRSN s'est doté, dans le cadre de ses projets de recherche, d'un accélérateur linéaire de ce type, opérationnel depuis janvier 2013.

Outre la radiothérapie externe, il est également possible de placer une source scellée directement au contact de la tumeur ou d'une cavité naturelle voisine. Cette technique, appelée **curiethérapie**, est également la plus ancienne. Utilisant des radioéléments artificiels tels que l'Iridium 192 ou le Césium 137 (ce dernier étant également utilisé pour l'irradiation des cellules pour ce projet de thèse), la dose délivrée à la tumeur est donc maximale, et décroît rapidement au niveau des tissus sains environnants. Les cancers du col de l'utérus, de la prostate ou du sein, sont les plus couramment traités par cette approche. **La radiothérapie métabolique**, dérivée de la curiethérapie, utilise cette fois des sources non scellées et injectables, qui se fixent sur leur cellules cibles grâce à leur métabolisme. Cette technique permet, par exemple, de traiter certains cancers de la thyroïde par de l'Iode 131, ou certains cancers de la prostate par du Palladium 103.

Parmi toutes ces techniques, la radiothérapie externe est la plus utilisée, de par sa grande précision et le nombre important de tumeurs qu'elle peut traiter. Les protocoles de radiothérapie prennent en compte de nombreux paramètres, tels que le type de tumeur, sa localisation, son stade, ainsi que l'intention thérapeutique du traitement. En effet, les trois grandes variables d'un traitement sont **la dose de contrôle tumoral, le fractionnement, et la dose de tolérance aux organes à risque**.

b. Les paramètres des protocoles et leurs applications

La dose de contrôle tumoral, tout d'abord, est la dose nécessaire pour obtenir la stérilisation définitive des cellules tumorales dans 90% des cas. Elle dépend de plusieurs facteurs, tels que le type histologique, le volume et l'aspect de la tumeur. Cette dose est généralement délivrée de manière fractionnée, en fonction de l'intention thérapeutique. En effet, un traitement à visée curative sera classiquement délivré par fraction de 2Gy en une séance journalière, cinq jours par semaine. Dans ce cas, le fractionnement a trois intérêts majeurs : il permet la réparation des lésions sub-léthales des tissus sains, la réoxygénation

progressive du tissu tumoral (et donc la sensibilisation des cellules hypoxiques), ainsi que la synchronisation de toutes les cellules en phase G2, connue pour sa grande radiosensibilité.

Un traitement à visée palliative est quant à lui destiné à freiner la progression ou l'infiltration métastatique de tumeurs incurables. Il pourra être délivré de manière plus concentrée (dose plus élevée et fractionnement plus faible, plus agressif pour les tissus sains), ou à contrario en split course (deux séries à rythme classique séparées par une période de repos, moins efficace mais mieux toléré). Enfin, un traitement à visée symptomatique sera prescrit pour soulager un symptôme lié à la maladie ou à son traitement, et ce grâce aux propriétés antalgiques, hémostatiques et décompressives des rayons. Ce type de traitement sera plutôt délivré en flash, par exemple 2 séances de 6.5 Gy à 48 heures, qui apportent un soulagement rapide au patient.

Une tumeur est systématiquement entourée de tissus sains, qui recevront obligatoirement une dose plus ou moins élevée s'ils sont présents dans le champ d'irradiation. La dose de tolérance aux organes à risque est donc la dose maximale que peut tolérer un organe donné sans présenter d'effets secondaires majeurs. La connaissance de cette dose est fondamentale lors de la planification d'un traitement, et constitue le principal facteur limitant à la dose reçue par la tumeur (Tableau 2). Cette notion de dose de tolérance aux organes à risque soulève par ailleurs le problème des effets secondaires des radiothérapies.

ORGANES TRÈS RADIOSENSIBLES	
Ovaire	Stérilité temporaire/définitive
Testicule	Stérilité temporaire/définitive
Cristallin	Cataracte
Rein	Néphrite radique
Foie	Hépatite radique
Moelle	Aplasie médullaire
ORGANES RADIOSENSIBLES	
Intestin grêle	Grêle radique, perforation
Colon	Sténose, perforation
Rectum	Rectite radique, perforation
Poumon	Insuffisance respiratoire
Cœur	Péricardite
Peau	Radiodermite, fibrose, télangiectasie
ORGANES PEU RADIOSENSIBLES	
Os	Osteoradionécrose
Muscle	Sclérose, rétractation musculaire
Tissu conjonctif	Fibrose

Tableau 2 : Les principaux organes à risques en radiothérapie et les complications cliniques associées

*D'après le guide des procédures de radiothérapie externe 2007, SFRO
Tiré de Cancérologie pour le praticien, J.P.Gérard, J.Y.Bobin, M.Clavel, 1986*

c. Compromis entre efficacité et effets secondaires

La radiothérapie est reconnue pour sa grande efficacité dans le traitement des cancers. Cependant, l'apparition de lésions radio-induites aux tissus sains situés dans le champ d'irradiation est à ce jour inévitable. La sévérité de ces lésions dépend de nombreux paramètres, tels que l'organe touché et le volume irradié, la dose totale reçue, le protocole utilisé (fractionnement, étalement du traitement), ainsi que la sensibilité individuelle du patient. Cette toxicité des tissus sains autour de la tumeur constitue aujourd'hui le principal facteur limitant à l'escalade de dose dans le traitement des cancers par radiothérapie. De plus, elle constitue un réel problème de santé publique, qui concernera potentiellement un nombre croissant de patients. En effet, l'augmentation du nombre de cas de cancer diagnostiqués associée à l'augmentation de leur guérison entraîne un nombre de plus en plus important de patients qui ont survécu à leur maladie.

Les effets secondaires liés aux traitements par radiothérapie sont classés en deux grandes catégories. Ils sont dits déterministes lorsqu'ils apparaissent au-delà d'une dose seuil, et lorsque leur sévérité augmente avec la dose reçue. C'est le cas par exemple des atteintes aux tissus sains. En revanche, ils sont dits probabilistes lorsqu'ils apparaissent de manière aléatoire et de même sévérité quelle que soit la dose, et lorsque leur probabilité d'apparition augmente avec la dose reçue. C'est le cas des cancers radio-induits. De plus, ces complications sont classées selon cinq grades de sévérité, dépendants de leur impact sur la qualité de vie du patient et les traitements qu'elles nécessitent (Tableau 3).

GRADE	SEVERITE	DESCRIPTION
1	légère	- pas d'effets sur l'activité quotidienne - pas de traitements nécessaires
2	modérée	- perturbation de l'activité quotidienne - traitement ambulatoire sans arrêt de la radiothérapie
3	sévère	- empêche une activité quotidienne - traitement hospitalier et/ou arrêt de la radiothérapie > 4jours
4	très sévère	- menace du pronostic vital - réanimation
5	létale	- complications mortelles

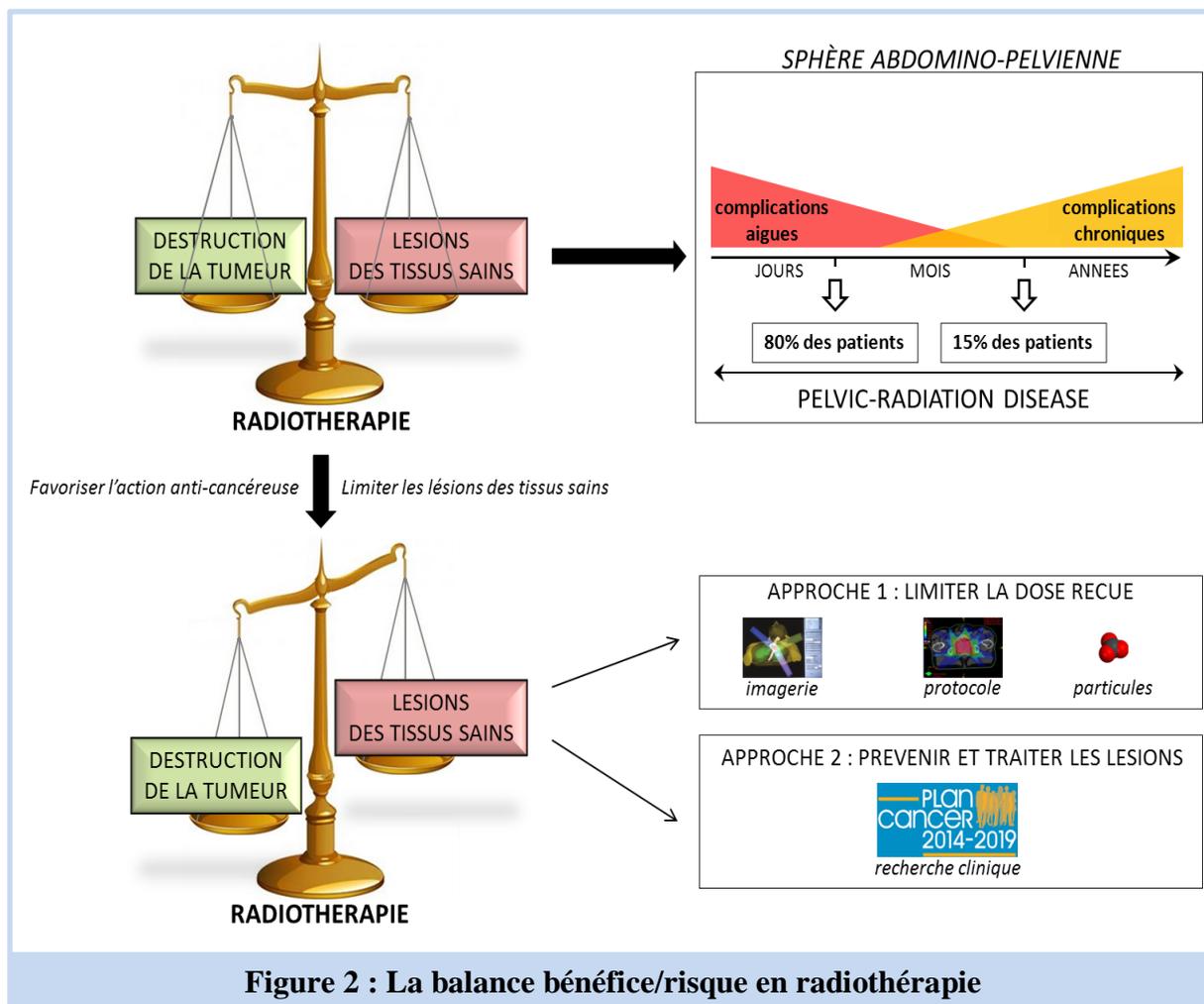
Tableau 3 : Score de toxicité des dommages radio-induits aux tissus sains
d'après le CTAE (Common Terminology Criteria for Adverse Event), version 3.0

La radiothérapie se situe donc à l'intersection exacte entre l'efficacité maximum de l'effet anti-tumoral (bénéfices) et l'impact minimum sur les tissus sains adjacents (risques). Tout l'enjeu des différentes stratégies de radiothérapie repose donc sur l'optimisation de cette

balance bénéfiques/risques, à savoir la minimisation des effets secondaires sur les tissus sains, sans compromettre le traitement anti-cancéreux (Figure 2). On peut distinguer deux approches différentes à cette problématique.

- **Limiter la dose totale et le volume de tissus sains irradiés.** C'est là le challenge des avancées techniques de la radiothérapie. Notamment, l'optimisation des techniques d'imagerie, avec l'apparition de la radiothérapie conformationnelle (3D-CRT) ou de la radiothérapie à modulation d'intensité (IMRT), a permis d'ajuster au plus près de la tumeur la forme des faisceaux et la distribution de la dose. De plus, l'apparition de la radiothérapie stéréotaxique, utilisée dans certaines indications (tumeurs intracrâniennes principalement), permet un meilleur contrôle tumoral en irradiant de tout petits volumes avec de fortes doses par fraction. Cette technique repose sur la multiplication des faisceaux et la réduction de leur taille. Bien que le volume de tissu sain irradié soit par conséquent plus faible, le recul est à ce jour insuffisant pour en évaluer les effets. Enfin, l'utilisation émergente de nouvelles particules telles que les protons ou les ions carbonés (hadronthérapie), permet un dépôt d'énergie extrêmement précis au niveau du pic de Bragg, et améliore ainsi la précision et l'efficacité du traitement.

- **Comprendre, prévenir et traiter les lésions radio-induites aux tissus sains.** Il est en effet nécessaire d'appréhender les mécanismes moléculaires et cellulaires associés afin d'élaborer des stratégies préventives ou curatives. Il s'agit par ailleurs de l'un des enjeux majeurs du plan Cancer 2014-2019, dont l'objectif 8 vise à limiter la toxicité des traitements, notamment par la recherche clinique. Plus précisément, l'action 8.3 a pour objectif d'améliorer la prise en compte des séquelles physiques des traitements des cancers. Cette action passe par l'acquisition d'une meilleure connaissance de ces séquelles afin de mettre en place des stratégies de prévention et de prise en charge. Les travaux du L3R à l'IRSN, dont l'objectif principal est de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques associés au développement des complications après radiothérapie, s'inscrivent donc dans cet axe.



A ce jour, sur l'ensemble des traitements par radiothérapie pratiqués dans le monde, plus de la moitié concernent une tumeur localisée dans la sphère abdomino-pelvienne (gynécologiques, génitaux-urinaires, colorectaux). Les effets secondaires gastro-intestinaux concernent donc un nombre important de patients, qui présentent dans plus de 80% des cas une toxicité aiguë, qui évoluera dans près de 15% des cas vers des complications chroniques (Figure 2) (Hauer-Jensen et al., 2014). Cependant, cette toxicité gastro-intestinale est encore trop peu considérée par les médecins et les oncologues, qui la considèrent davantage comme un ensemble de symptômes plutôt flous que comme une réelle pathologie. C'est pourquoi, il émerge depuis quelques années le concept de « pelvic-radiation disease », qui regroupe dans une même pathologie l'ensemble des effets secondaires, aigus ou tardifs, plus ou moins sévères, qui touchent les tissus sains après un traitement par radiothérapie de tumeurs pelviennes (Andreyev et al., 2010). Bien que les symptômes cliniques liés à la toxicité intestinale radio-induite soient relativement bien décrits, il reste encore beaucoup à faire sur la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de ces lésions.

II. Lésions radio-induites aux tissus sains : toxicité gastro-intestinale

1) Du concept de la cellule cible à la réponse intégrée

Pendant de nombreuses années, la compréhension des effets tissulaires radio-induits a été régie par le dogme dit « de la cellule cible ». Ce concept trouve sa source en 1956, avec la parution des travaux de Puck et Marcus concernant les effets des rayons X sur les cellules de mammifères. Ils ont ainsi montré que la capacité des cellules HeLa à former des colonies était inversement proportionnelle à la dose de rayons X qu'elles recevaient (Puck et Marcus, 1956). Le concept de la cellule cible se base donc sur la création de lésions irréparables à l'ADN, qui conduisent à la mort d'une population cellulaire cruciale pour l'organe, et donc à terme au dysfonctionnement de celui-ci. Cette vision de la pathogénèse a entraîné dans les années 80 la modification des protocoles de fractionnement, en limitant la dose délivrée à chaque séance. Cette pratique visait à trouver le juste équilibre entre les lésions créées aux cellules tumorales, et celles subies par les cellules saines voisines. La diminution des effets secondaires aigus, consécutive à la mise en place de cette pratique, a de surcroît fait les heures de gloire du concept de la cellule cible. Ce modèle s'est par ailleurs révélé pertinent pour la compréhension de la réponse précoce du système hématopoïétique, spermatogénique, ou des épithélia tels que la muqueuse du tractus gastro-intestinal (Dörr et al., 1997).

D'après le concept de cellule cible, la radiosensibilité de l'intestin apparaît exclusivement liée à son épithélium à prolifération rapide, dont l'importance des lésions détermine la sévérité des effets secondaires précoces liés à une irradiation. Ainsi, la réponse de l'intestin aux rayonnements ionisants serait dépendante de la mort cellulaire dans le compartiment souche, c'est-à-dire dans les cryptes (Figure 3). Et de ce fait, la régénération du tissu serait directement corrélée à la survie et à la prolifération de ces cellules souches ou progénitrices. Cette hypothèse est par ailleurs soutenue par des études sur la protection du compartiment épithélial lors de l'irradiation. En effet, l'utilisation de facteur de croissance spécifique de l'intestin, le GLP-2 (Glucagon-Like Peptide-2) limite les lésions précoces et chroniques consécutives à une irradiation localisée chez le rat (Torres et al., 2007). De même, l'utilisation de facteur de croissance spécifique du compartiment souche, le R-Spondin-1, protège les souris d'un syndrome gastro-intestinal après une irradiation corps entier (Bhanja et al., 2009).

Cependant, bien que le concept de la cellule cible demeure aujourd'hui largement utilisé pour expliquer les effets précoces de la radiothérapie, l'inadéquation de ce modèle avec les effets plus tardifs est apparu progressivement au gré des études, principalement sur la fibrose radio-induite. Notamment, la présence d'un temps de latence souvent très long entre les effets aigus et tardifs ne trouvait pas d'explication pertinente. On parlait alors d'un « intervalle silencieux », justifié par la mort mitotique de cellules moins proliférantes (fibroblastes, cellules endothéliales), qui à terme compromettait la fonction de l'organe (Figure 3). D'autre part, l'augmentation de l'incidence des fibroses radio-induites par des drogues non-cytotoxiques était difficilement justifiable par ce concept de cellule cible (S M Bentzen et al. 1996). Enfin, la fibrose est principalement caractérisée par une accumulation de tissu conjonctif, notamment de collagène, sécrété par les cellules mésenchymateuses. Dans ce contexte, comment expliquer que la mort mitotique des fibroblastes soit associée à une augmentation du dépôt de collagène ? Par ailleurs, la suprématie du dogme de la cellule cible fut pour la première fois remis en cause au début des années 90. En effet, plusieurs équipes établirent un parallèle entre la radiosensibilité des fibroblastes *in vitro* et les effets secondaires tardifs de la radiothérapie (Loeffler et al., 1990). Cependant, l'existence de ce lien fut longtemps sujette à controverse.

Il fallut attendre l'amélioration des connaissances en radiopathologie pour comprendre que le concept de la cellule cible ne reflétait pas à lui seul la réponse d'un organe à une irradiation. Ces progrès, notamment en radiobiologie moléculaire, ont permis de mieux appréhender la mécanistique de la pathogénèse des effets secondaires radio-induits tardifs. Il a par exemple été découvert que « l'intervalle silencieux » entre l'irradiation et l'expression clinique des effets chroniques correspondait en fait à l'activation d'une cascade de cytokines, qui persistait dans le temps (Rubin et al., 1995). Ainsi, bien que l'apoptose radio-induite de certaines cellules stratégiques puisse jouer un rôle de déclencheur, il apparaît désormais évident que la réponse tissulaire aux rayonnements ionisants est orchestrée et active, liée à la sécrétion précoce de cytokines, chémokines et autres facteurs de croissance.

La vision contemporaine de la réponse à l'irradiation implique donc l'ensemble des tissus et des types cellulaires, tous plus ou moins radiosensibles, qui composent l'organe touché. Au niveau de l'intestin par exemple, il apparaît depuis quelques années que l'implication des compartiments vasculaires, immunitaires et neuronaux est au moins aussi importante que celle du compartiment épithélial (Hauer-Jensen et al., 2014). La réponse

tissulaire aux rayonnements ionisants est donc désormais considérée comme un continuum entre les évènements très précoces et les complications chroniques (Figure 3). Cette réponse tissulaire peut être assimilable à une cicatrisation perpétuelle et auto-entretenu, initiée dans les instants qui suivent l'irradiation, et qui à terme, conduit à la fibrose de l'organe.

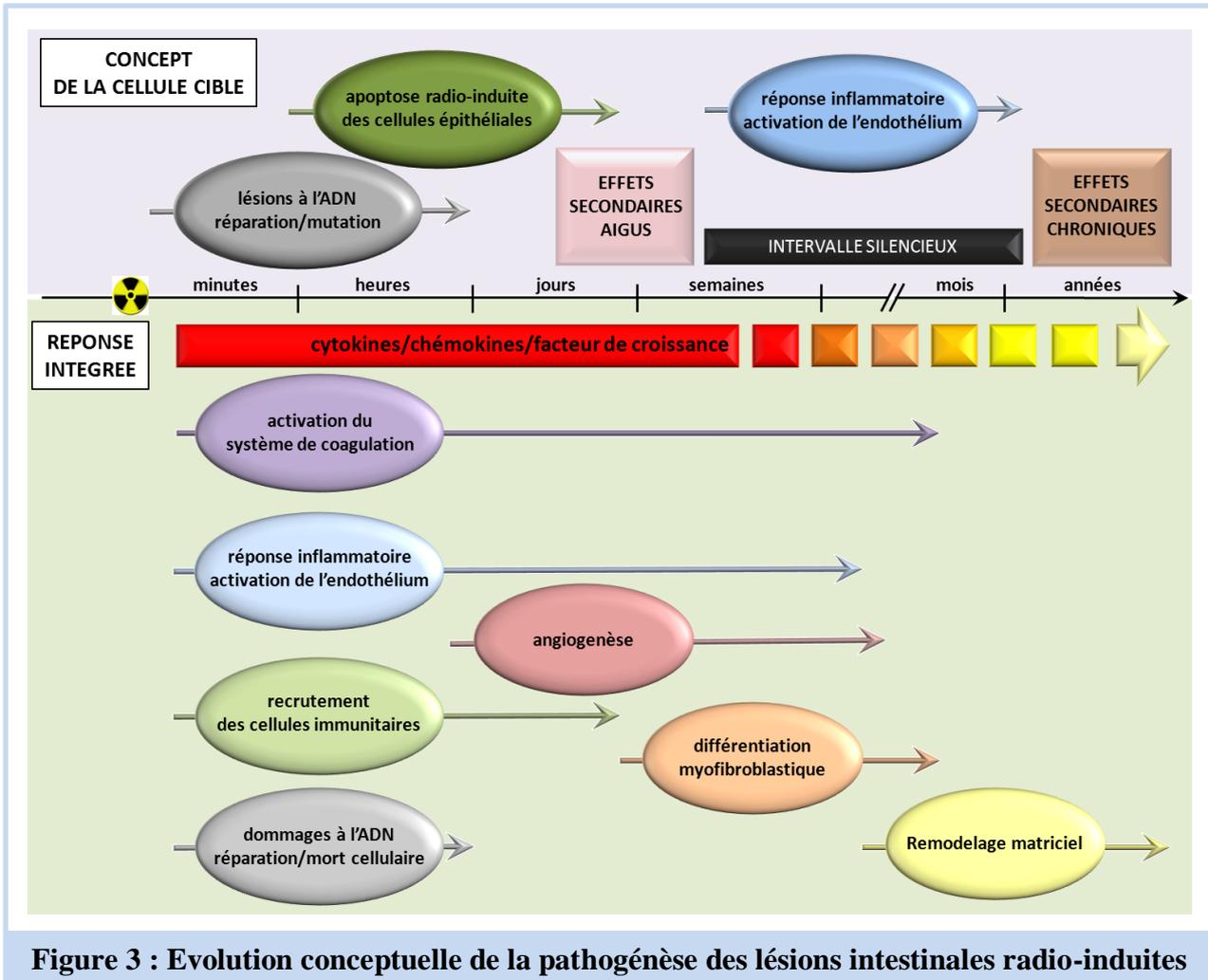


Figure 3 : Evolution conceptuelle de la pathogénèse des lésions intestinales radio-induites

Au niveau de l'intestin, la véracité de ce concept multi-cellulaire est appuyée par la publication de travaux portant sur la protection de compartiments autres que l'épithélium après irradiation. En effet, il apparaît que la protection des cellules endothéliales par administration de b-FGF protège les souris d'un syndrome gastro-intestinal consécutif à une irradiation corps entier (Paris et al., 2001). De plus, la diminution des lésions intestinales chez les souris PAI-1 $-/-$ dans un modèle d'irradiation localisée est associée à une diminution de l'apoptose radio-induites des cellules endothéliales (Abderrahmani et al., 2012).

Cette évolution du concept de cellule cible vers celui d'une réponse multi-cellulaire intégrée, permet aujourd'hui une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à la réponse tissulaire radio-induite, notamment au niveau de l'intestin.

2) **Intestin et lésions radio-induites**

a. Structure et fonction de l'intestin

L'intestin se compose de l'intestin grêle et du gros intestin. Nous nous focaliserons ici sur l'anatomie et les différentes fonctions de l'intestin grêle, qui constitue le modèle d'étude de ce projet de thèse.

Composé de trois segments qui sont (selon l'axe antéro-postérieur) le duodénum, le jéjunum et l'iléon, l'intestin grêle remplit deux fonctions primordiales pour l'organisme. La première concerne la digestion des aliments et l'absorption des nutriments. Au niveau du duodénum, le chyme subit l'action des sucs pancréatiques, biliaires et intestinaux, qui vont poursuivre l'action digestive débutée dans l'estomac. L'action de ces sucs digestifs, associée au péristaltisme, permet la transformation du chyme en nutriments tout au long de sa progression dans l'intestin grêle. Ces nutriments, à savoir les glucides, les protéides, les lipides, l'eau, les sels et les vitamines, sont alors sélectivement absorbés au niveau des entérocytes vers les compartiments sanguins et lymphatiques. Cette absorption est facilitée par l'importante surface d'échange créée par les nombreux replis successifs de la paroi intestinale, allant des valvules conniventes aux microvillosités. De la même manière, l'importante flore commensale de l'intestin contribue à la digestion des aliments, en facilitant la digestion et l'absorption de certains sucres et lipides complexes.

La deuxième fonction principale de l'intestin concerne son rôle de barrière entre le milieu extérieur et le milieu intérieur, qui peut être décrit selon trois niveaux. Au niveau de la lumière tout d'abord, l'action du mucus ou des peptides de défense tels que les défensines assurent une première protection des cellules épithéliales contre les microorganismes pathogènes. De plus, les cellules épithéliales sécrètent des molécules bactéricides qui assurent une défense supplémentaire contre la flore bactérienne. Cette action est renforcée par la présence de jonctions serrées au niveau des entérocytes, qui forment ainsi une barrière physique contre la diffusion des molécules et agents pathogènes. Enfin, la présence du système immunitaire au niveau de l'intestin, sous forme de leucocytes circulants ou du tissu lymphoïde associé à l'intestin (ou GALT), représente une dernière barrière capitale contre les

microorganismes. La réponse immunitaire mise en place au niveau de l'intestin joue un rôle important dans la réponse globale de l'organe à toute forme d'agression, tels que les rayonnements ionisants. De même, la réponse inappropriée du système immunitaire est une composante importante des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (IBD).

D'un point de vue structurel, l'intestin grêle peut être décomposé en 5 tuniques successives (Figure 4). La plus externe, la séreuse, fait partie du péritoine viscéral. Elle est composée d'un tissu conjonctif (le chorion) qui repose sur un mésothélium. A l'intérieur de cette séreuse se trouvent les deux couches musculaires, composées de cellules musculaires lisses, et qui sont responsables du péristaltisme. En effet, la plus externe est orientée longitudinalement par rapport à l'axe de l'intestin, alors que la plus interne, qui est aussi la plus épaisse, est circulaire. La tunique suivante, située à l'intérieur de la musculuse, est la sous-muqueuse. Elle est composée d'un tissu conjonctif, infiltré de nombreuses veinules, artérioles, et vaisseaux lymphatiques. La sous-muqueuse est elle-même tapissée par la musculaire muqueuse, qui est constituée d'une mince couche musculaire lisse. Enfin, la tunique la plus interne, la muqueuse, est directement en contact avec la lumière intestinale. Reposant sur la musculaire muqueuse, elle se compose d'une lamina propria recouverte d'un épithélium cylindrique simple. Cet épithélium s'oriente selon un axe crypto-villositaire, formé par la projection des villosités dans la lumière de l'intestin, et les invaginations épithéliales qui forment les cryptes de Lieberkhün. Cette orientation permet ainsi une régionalisation des compartiments fonctionnels et prolifératifs (Figure 5).

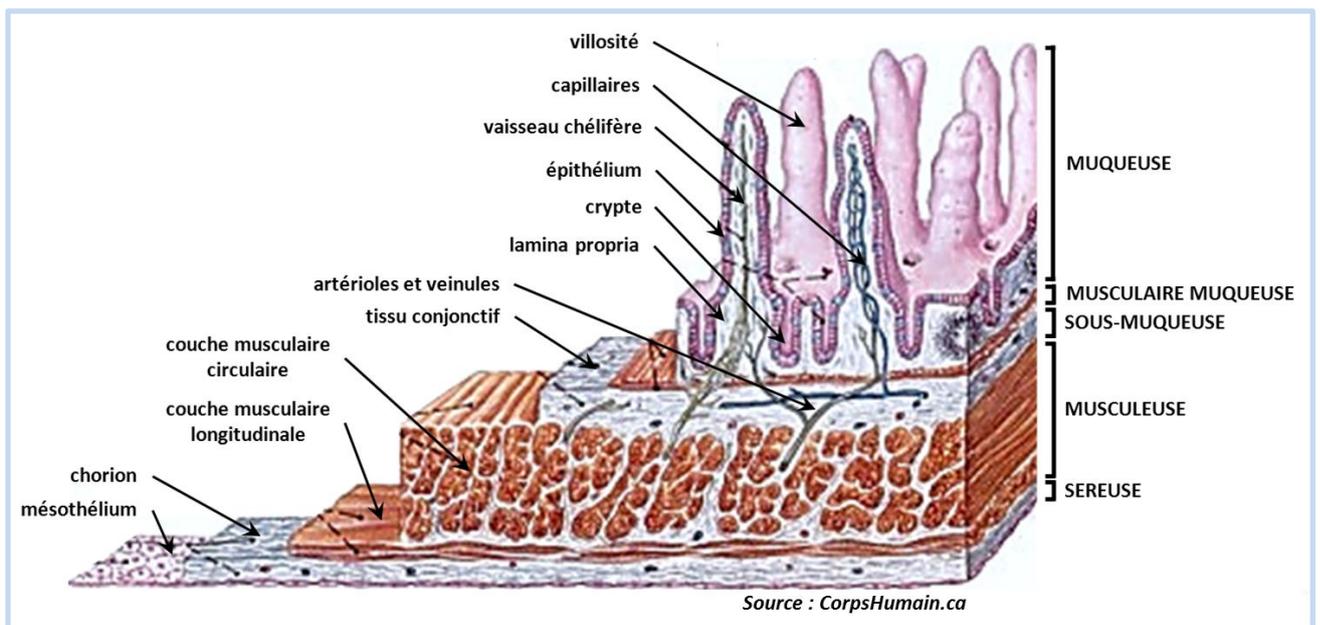


Figure 4 : Structure de l'intestin

En effet, **l'épithélium fonctionnel** se compose principalement de 4 types cellulaires, situés pour la plupart au niveau des villosités, et qui sont tous adaptés aux fonctions de protection et d'absorption inhérentes au contact avec la lumière intestinale. *Les entérocytes*, majoritaires, sont dévolus à l'absorption des nutriments, *les cellules caliciformes* sécrètent le mucus qui tapisse l'épithélium, *les cellules enteroendocrines* produisent les différentes hormones sécrétées par l'intestin, et *les cellules de Paneth*, qui sont contrairement aux autres situées dans les cryptes, possèdent entre autres fonctions la sécrétion des peptides antimicrobiens. D'autres types cellulaires, plus rares, peuvent également être retrouvés, tels que les cellules tuft ou les cellules M au niveau des plaques de Peyer. **L'épithélium prolifératif** est quant à lui cantonné aux cryptes, et se compose notamment des deux types de cellules souches de l'intestin. *Les CBC* (Crypt-Based columnar Cells) s'intercalent au fond des cryptes avec les cellules de Paneth, qui leur fournissent un signal de maintien à l'état souche. Au nombre de 10 à 12 par crypte, elles se divisent quotidiennement pour assurer le turn-over rapide de l'épithélium (3 à 5 jours). *Les LRC+4* (Label-Retaining Cells), sont comme leur nom l'indique situées généralement en position +4 des cryptes, juste au-dessus des CBC et des cellules de Paneth. En nombre plus restreint (4 à 5 par cryptes), elles possèdent également un cycle beaucoup plus lent. Les divisions des cellules souches présentent la particularité d'être asymétriques : une cellule souche engendre une nouvelle cellule souche et une cellule dite progénitrice. Ces progéniteurs, descendants directs des cellules souches, forment un compartiment prolifératif, qui par divisions successives donne naissance aux quatre types de cellules épithéliales différenciées. Ainsi, à mesure de leurs divisions et de leurs différenciations, les cellules issues des progéniteurs progressent le long de la villosité vers la lumière intestinale, où elles finissent par desquamer par anoïkis.

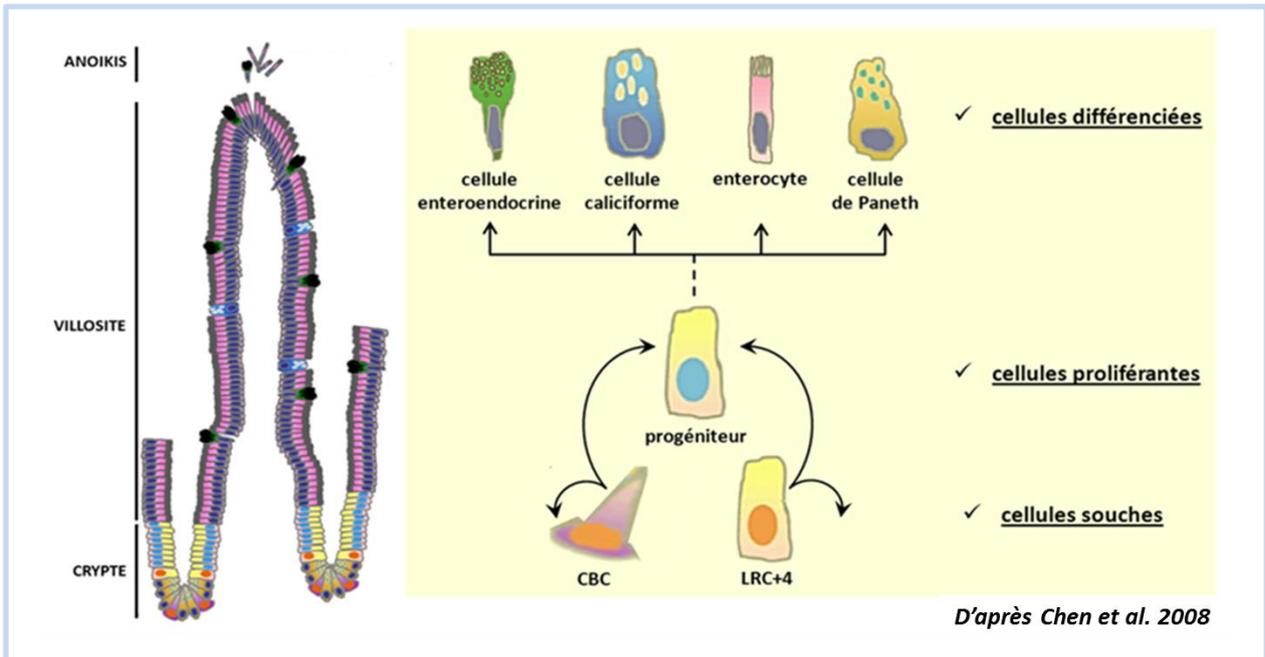


Figure 5 : Organisation de l'épithélium intestinal en zones fonctionnelles et prolifératives

De par ses différentes fonctions, l'intestin grêle est également un organe richement irrigué. Cette vascularisation sera détaillée dans la partie consacrée à l'endothélium et aux lésions radio-induites. De plus, la fonction d'absorption impose la présence d'une circulation lymphatique. Les vaisseaux chélyfères, présents dans chaque villosité, se rassemblent au niveau de la sous-muqueuse, et la lymphe est ensuite filtrée par les nombreux ganglions lymphatiques présents dans l'intestin.

Cette structure particulière de l'intestin est en partie responsable de sa radiosensibilité. En effet, l'activité mitotique des cellules souches afin d'assurer le renouvellement perpétuel de l'épithélium les rend relativement sensibles aux rayonnements ionisants. Or leur mort aboutit rapidement à une dénudation complète de l'épithélium, et donc à la perte des fonctions d'absorption et de barrière qui lui sont propres. En outre, comme nous le verrons par la suite, la riche irrigation sanguine de cet organe, inhérente à ses différentes fonctions, contribue également à la radiosensibilité de cet organe.

b. Irradiations corps entier et irradiations localisées

L'apparition de lésions radio-induites au niveau de l'intestin peut survenir dans deux cas distincts. Elles peuvent tout d'abord être consécutives à une exposition de l'intégralité du corps, ou de la zone abdominale. On parle alors d'irradiation corps entier (ou TBI, Total Body Irradiation) ou abdominale totale, qui peut survenir par exemple dans le cadre d'accident dans

l'industrie nucléaire, telles que Tchernobyl en 1986 ou Fukushima Daiichi en 2011. Une telle exposition entraîne chez l'homme l'apparition d'un syndrome d'irradiation aigu, et ce dès la dose de 1 Gy. Bien que la sévérité de ce syndrome soit fonction de la dose reçue, de sa distribution et de la durée d'exposition, ce dernier se décompose toujours en trois phases.

- **Une première phase dite « prodromale »**, qui dure généralement 24h, et se caractérise par des symptômes de types nausées, diarrhées, céphalées, voir érythèmes précoces.
- **Une phase dite « de latence »**, caractérisée par une atténuation ou une disparition du syndrome initial. Cette phase sera d'autant plus courte que la dose sera élevée.
- **Une phase dite « clinique manifeste »**, qui peut présenter différents syndromes en fonction de la dose reçue et donc des organes atteints. Le syndrome gastro-intestinal (SGI) est l'un d'eux. Il apparaît dès 7Gy, et s'ajoute au syndrome hématopoïétique, qui se développe lui dès 1Gy, et sera suivi par le syndrome neurovasculaire dans le cas d'irradiation très forte (supérieures à 50Gy). Le syndrome gastro-intestinal se caractérise par des diarrhées, des douleurs abdominales, des saignements, voir des ulcères ou une septicémie, qui conduisent au décès du patient en une à deux semaines. Contrairement au syndrome hématopoïétique qui se traite principalement par facteurs de croissance et cytokines ([Gourmelon et al., 2010](#)), il n'existe pas de traitement curatif pour le SGI. Les traitements proposés sont symptomatiques, et visent à corriger la déshydratation, le déséquilibre électrolytique, les diarrhées ou encore les atteintes de la flore commensale de l'intestin.

Les lésions intestinales radio-induites peuvent également être consécutives à l'exposition plus localisée d'une portion de l'intestin, notamment lors des protocoles radiothérapeutiques, et peuvent évoluer des années plus tard en lésions chroniques. Le tableau clinique peut alors présenter une perturbation du transit, des douleurs abdominales sévères, une malabsorption des nutriments, des fistules ou des occlusions, autant de symptômes qui perturbent la qualité de vie des patients et peuvent entraîner leur décès. Les traitements proposés visent à soulager les symptômes des patients, et peuvent aller jusqu'à la chirurgie dans les cas les plus sévères. Bien que l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses dans le cadre d'un traitement compassionnel de certains sur-irradiés d'Epinal ou de patients souffrant de la maladie de Crohn ait fourni des résultats encourageants, ce projet demeure à l'état d'essais cliniques ([Voswinkel et al., 2013](#)).

Il est intéressant de constater depuis quelques années l'émergence de nombreuses corrélations physiopathologiques entre la toxicité intestinale radio-induite et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (IBD) telle que la maladie de Crohn. Ces corrélations posent entre autres la question d'une transversalité des données obtenues sur chacune des deux pathologies, ainsi que l'intérêt d'une utilisation de l'entérite radique comme modèle d'inflammation intestinale. Plusieurs arguments appuient par ailleurs ce transfert méthodologique : une prévalence supérieure des entérites radiques en comparaison aux IBD, la possibilité d'un contrôle facile et précis de l'inducteur (les rayonnements ionisants), ainsi qu'un transfert direct des modèles animaux aux patients, puisque dans les deux cas l'agent inducteur est le même. Sans perdre de vue certaines différences, telles que l'implication de la radiosensibilité de l'intestin ou ses capacités réparatrices, l'établissement de ponts entre l'étude de ces deux types de pathologies permettra probablement d'accélérer la recherche dans ces deux domaines.

De ce fait, l'amélioration de la compréhension des mécanismes sous-jacents au développement des entérites radiques ainsi que la recherche de traitements curatifs apparaissent capitales, et passent inévitablement par la mise en place de modèles animaux. L'irradiation TBI ou abdominale totale reste à ce jour la plus utilisée. Elle présente en effet de nombreux avantages, tels que la simplicité, la rapidité, et l'adaptabilité à toutes tailles de modèles animaux. Cependant, la dose nécessaire pour générer une fibrose intestinale radique est incompatible avec ces configurations d'irradiation, puisqu'elle provoque la mort de l'animal par défaillance multi-organe. Il est donc nécessaire d'utiliser des modèles d'irradiation localisée afin de pouvoir étudier les lésions intestinales radio-induites aiguës et tardives.

Il existe à ce jour deux grandes techniques d'irradiation localisée de l'intestin. La première, qui est également celle que nous avons appliquée dans le cadre de ces travaux de thèse, est l'irradiation d'une anse intestinale extériorisée (Figure 6). Elle consiste à réaliser une petite incision au niveau de l'abdomen d'un animal anesthésié afin d'extérioriser une anse intestinale, et de soumettre cette dernière à une irradiation, le reste de l'animal étant protégé par des plaques de plomb. L'anse irradiée est ensuite replacée dans l'abdomen, dont les plans musculaires et cutanés sont suturés. Utilisée aussi bien chez le rat que chez la souris ([Hauer Jensen et al. 1983](#); [Zheng et al. 2000](#)), cette technique permet de conserver les animaux en vie le temps nécessaire au développement des lésions attendues. Dans le cadre d'étude des lésions

radio-induites tardives, les doses de 21Gy chez le rat et de 19Gy chez la souris sont considérées comme nécessaires et suffisantes pour obtenir un ratio acceptable entre l'apparition des lésions chroniques et la mortalité des animaux. Cette technique, bien que régulièrement utilisée, n'autorise pas d'études sur l'irradiation fractionnée, car l'acte chirurgical constitue un obstacle à la mise en place du fractionnement (Hauer Jensen et al. 1983).

C'est pourquoi il a été mis en place une deuxième technique d'irradiation localisée de l'intestin, la scrotalisation (Figure 6). Pratiquée uniquement chez les rats mâles, cette technique élégante consiste à fixer une anse intestinale dans le scrotum après castration des animaux (Hauer-Jensen et al. 1988). Cette technique permet ainsi un fractionnement quotidien des irradiations afin de se rapprocher au plus près des protocoles de radiothérapie.

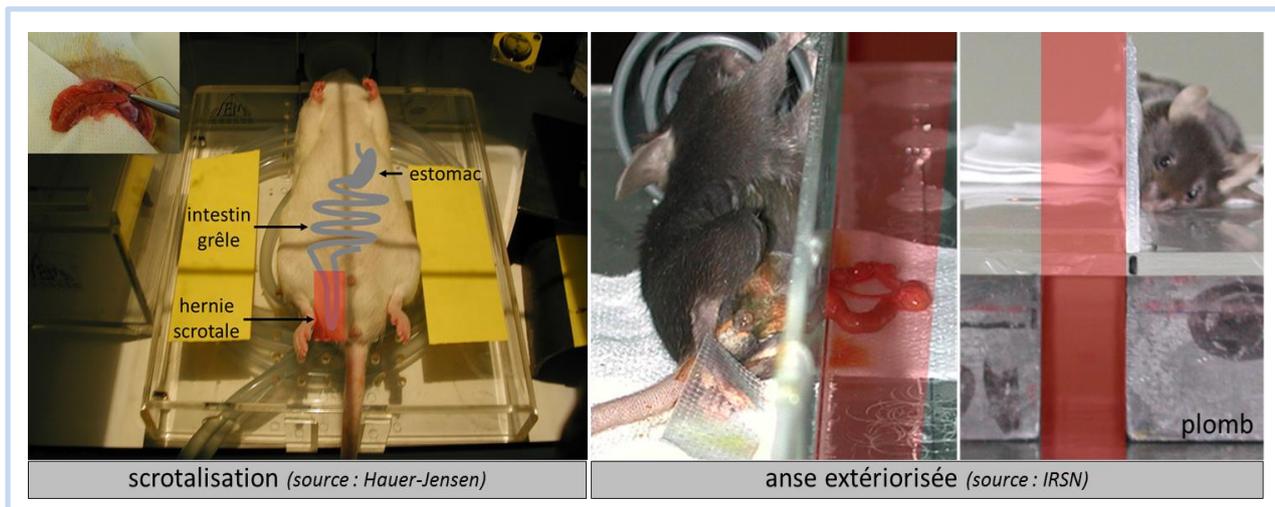


Figure 6 : Les techniques d'irradiation localisée de l'intestin grêle chez l'animal
gauche : Illustration de la scrotalisation, pratiquée chez le rat. **droite** : Extériorisation d'une anse intestinale, pratiquée chez le rat et la souris. La zone rouge représente le champ d'irradiation.

L'utilisation de ces différentes techniques d'irradiation permet ainsi l'étude de la physiopathologie des lésions intestinales radio-induites, qu'elles soient précoces ou chroniques.

c. Description histologique des lésions intestinales radio-induites

L'irradiation forte dose du grêle entraîne des modifications histologiques et morphologiques visibles dès les premières heures qui suivent l'exposition (Figure 7). La description qui va suivre s'appuie sur les observations faites au laboratoire en comparaison à un intestin sain (a), qui rejoignent la description détaillée réalisée chez le rat, et publiée en 1996 (Rubio et Jalnas, 1996).

Tout d'abord, il apparaît dès 4h après irradiation des cellules apoptotiques au niveau de l'épithélium (flèche), principalement au niveau des cryptes (**b**). Cette mort cellulaire radio-induite persiste jusqu'à 3 jours après irradiation. A ce stade, l'organisation crypto-villositaire est encore visible malgré les pertes cellulaires, et malgré la quasi-disparition des cryptes. Ce phénomène s'accompagne d'un épaissement de la couche musculaire externe, ainsi que d'un infiltrat inflammatoire qui recouvre les couches musculaires et la muqueuse (**c**). A 7 jours post-irradiation, la muqueuse présente des zones d'ulcération, qui côtoient des zones d'atypies ou de reprises épithéliales, ces dernières étant caractérisées par la présence de cryptes hyperplasiques (**d**). L'infiltrat inflammatoire est dense, riche en neutrophiles et en macrophages. 14 jours après l'irradiation, il subsiste des zones d'ulcération muqueuse, qui s'accompagnent d'un dépôt de collagène principalement sous-séreux, qui s'étend vers la couche musculaire externe. A ce stade, la distinction entre les couches muqueuses, sous-muqueuses et musculaires est encore possible. Enfin, à des temps plus tardifs (de l'ordre de 6 semaines post-irradiation pour la souris), il est possible d'observer la présence d'une fibrose radio-induite, caractérisée par une désorganisation de la structure intestinale et des reprises glandulaires ectopiques, associées à un fort dépôt collagénique (**e**). Cette fois, la transition entre les différents compartiments de la paroi intestinale est plus floue. L'ensemble de ces modifications a donc pour conséquence la perte des fonctions de barrière et d'absorption, principalement liée aux ulcérations et aux dysfonctionnements de la motilité intestinale et du transport d'eau et d'électrolytes.

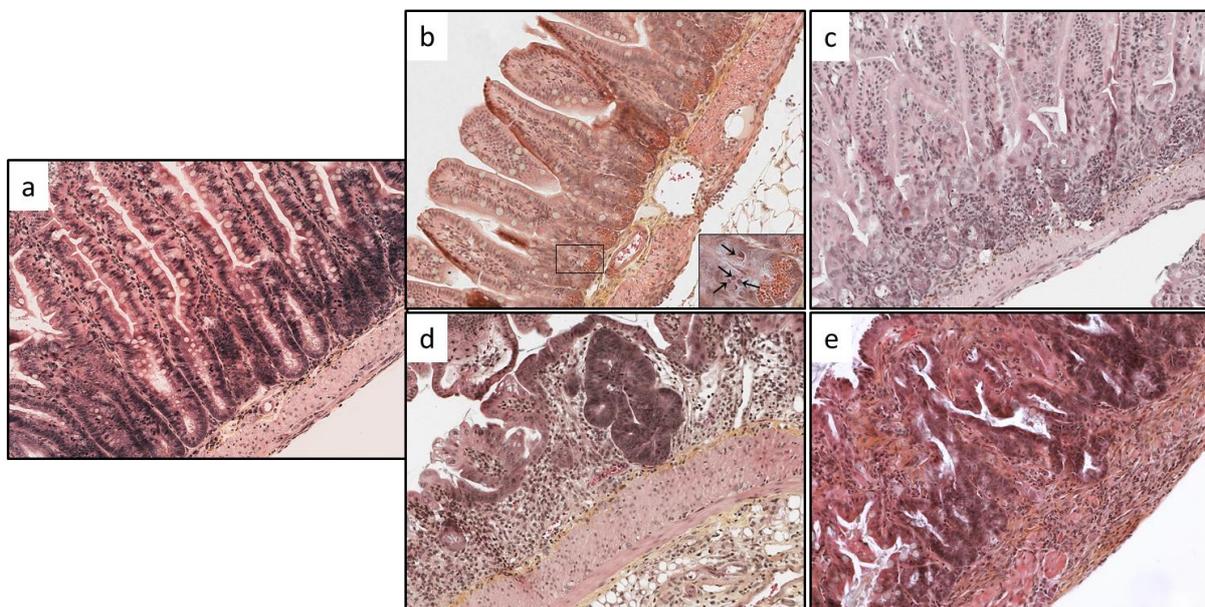


Figure 7 : Lésions radio-induite au niveau de l'intestin grêle chez la souris
Irradiation localisée de 19Gy (Co^{60}). Coloration HES. Grossissement : x200 [Rannou et al., résultats personnels]

Bien qu'elle ne soit pas formellement démontrée, l'existence d'un lien entre la sévérité des lésions aiguës et l'apparition des lésions tardives est aujourd'hui admise (Bourne et al., 1983). Cependant, il semble de plus en plus clair que ces notions, qui reposent sur la cinétique d'expression clinique, ne reflètent pas réellement la complexité de la situation. Il est par exemple possible de dissocier pharmacologiquement ou transgéniquement des effets précoces et tardifs, menant par exemple à des lésions épithéliales plus sévères, mais associées à une fibrose moins importante. Les problèmes conceptuels de ces terminologies, liés à une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires sous-jacents aux lésions radio-induites, ont donc conduit à proposer une nouvelle classification (Denham et al., 2001). On distingue alors :

- des **effets cytotoxiques**, liés à la mort des différents types cellulaires.
- des **effets indirects**, liés aux atteintes des cellules parenchymateuses ainsi qu'aux médiateurs de l'inflammation.
- des **effets fonctionnels**, liés à des modifications moléculaires au niveau intra ou extra-cellulaires, telles que l'activation du système de coagulation.

Cette nouvelle classification, basée sur des mécanismes fondamentaux, permet ainsi une vision plus claire des mécanismes sous-jacents au développement des lésions radio-induites. Celles-ci résultent ainsi d'interactions complexes entre ces trois types d'effets.

d. Effets cytotoxiques : mort et régénération des cellules souches intestinales

Les effets cytotoxiques s'illustrent notamment par la mort radio-induite des cellules souches présentes dans les cryptes, ainsi que par la mort des cellules endothéliales. Ces deux phénomènes surviennent dans les premières heures qui suivent l'irradiation. La mort des cellules endothéliales sera abordée dans le chapitre dédié à l'endothélium et à ses atteintes radio-induites. C'est pourquoi il ne sera question dans cette partie que de la mort des cellules souches et la régénération de l'épithélium qui s'en suit. Les résultats décrits sont principalement issus de travaux utilisant l'irradiation corps entier, qui est le modèle le plus utilisé dans l'étude des événements précoces induits par les rayonnements ionisants.

L'un des acteurs principaux de la mort radio-induite des cellules souches épithéliales est le facteur de transcription p53. Stabilisé par les lésions à l'ADN provoqué par les rayonnements ionisants, il initie une cascade moléculaire qui aboutit à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose (Gottlieb et Oren, 1996). Il a été montré qu'une irradiation de 8Gy TBI chez la souris induit une augmentation de l'expression de p53 au niveau des cellules

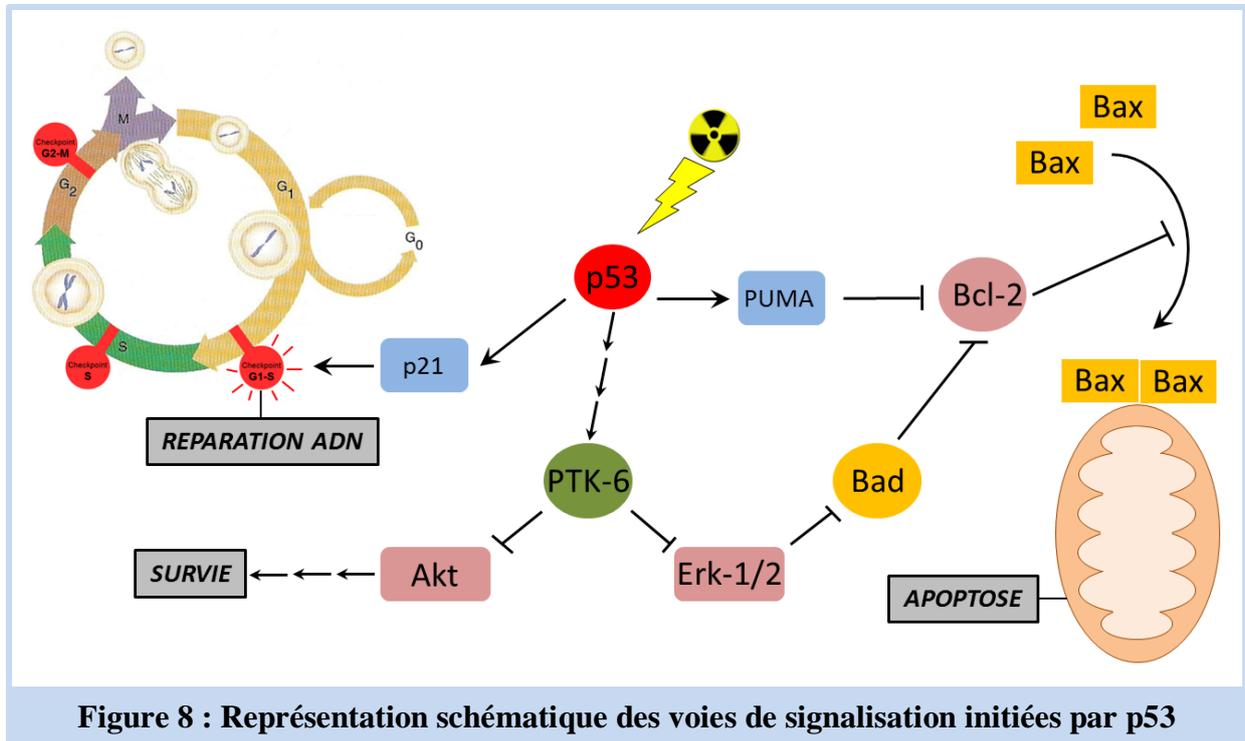
présentes dans les cryptes, et que cette surexpression est associée au statut apoptotique de ces cellules 5h après irradiation. Ce phénomène apoptotique disparaît chez les souris p53^{-/-}, qui présentent en revanche une vague de mort retardée, 24h après irradiation, liée à une forte proportion de mitoses aberrantes (Merritt et al., 1997). De plus, cette vague de mort abroge la forte prolifération des cellules souches survivantes 72h après irradiation. Il est donc possible de distinguer deux vagues de mort radio-induite des cellules souches : **l'apoptose radio-induite**, qui est p53-dépendante et survient quelques heures après irradiation, et la **mort mitotique**, qui est p53-indépendante et survient 24h après irradiation. L'utilisation des souris p53^{-/-} a par ailleurs permis de soulever l'action ambivalente de ce facteur de transcription, puisque ces dernières sont sensibilisées au SGI après une irradiation de 12.5Gy TBI comparées aux souris contrôles. Cette sensibilité exacerbée est également associée à des atteintes cryptiques plus sévères (Komarova et al., 2004). En outre, ces résultats démontrent que la mort clonogénique des cellules souches intestinales joue un rôle clé dans le développement du syndrome gastro-intestinal. Ce concept est par ailleurs confirmé par l'utilisation de souris KO pour p53, Bax et Bak spécifiquement dans les cellules épithéliales. Ces souris, irradiées à 15Gy en TBI, présentent la même sensibilité au SGI que les souris KO pour p53 dans les cellules épithéliales (Kirsch et al., 2010). Ces résultats démontrent bien que la sévérité du SGI ne dépend pas de la voie apoptotique liée à p53, mais bien de la mort clonogénique.

Cette dualité d'action de p53, qui d'une part induit l'apoptose radio-induite des cellules souches, et d'autre part favorise la régénération cryptique et la résistance au SGI, s'explique par l'existence de deux voies de signalisation distincte (Figure 8). La première d'entre elle implique la protéine PUMA (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis), qui est l'effecteur principal de l'apoptose radio-induite via p53. PUMA est capable d'inhiber les 5 protéines anti-apoptotique de la famille Bcl-2, autorisant ainsi la translocation de Bax au niveau de la membrane mitochondriale, et donc le déclenchement de l'apoptose par la voie mitochondriale (Qiu et al., 2010). C'est pourquoi des souris PUMA^{-/-}, irradiées à 18Gy en TBI, présentent une baisse drastique de l'apoptose des cellules souche intestinales à 4h et 24h post-irradiation comparées aux souris contrôles. Ces souris présentent également une meilleure régénération cryptique (Qiu et al., 2008). Il est intéressant de constater que l'inactivation de PUMA entraîne une surexpression de p21, qui est l'autre cible principale de p53 dans les cellules des cryptes après irradiation.

Ainsi, p21 est l'acteur clé de la deuxième voie de signalisation p53 dépendante, qui explique par ailleurs l'importance de l'apoptose radio-induite dans la sévérité des lésions. En effet, cette kinase cycline-dépendante est nécessaire à l'activation du checkpoint G1/S, au maintien du checkpoint G2/M, et à la réparation de l'ADN. Elle régule ainsi la progression du cycle cellulaire. Il a été montré que les souris p21^{-/-} irradiées à 15Gy en TBI présentent le même profil que les souris p53^{-/-}, à savoir une accélération de la perte des cryptes associée à des lésions radio-induites plus sévères (Komarova et al., 2004). Ces résultats démontrent ainsi que l'arrêt du cycle médié par p53 via p21 est protecteur pour les cellules souches. De plus, il a également été montré que l'induction de p21 par p53 prévient l'accumulation de lésions à l'ADN dans les cellules souches, et donc par conséquent la vague de mort mitotique 24h après irradiation au niveau des cryptes régénérantes (Leibowitz et al., 2011). Cette même équipe a par ailleurs démontré l'indépendance des voies p53/p21 et p53/PUMA grâce à l'utilisation de souris double KO (PUMA, p21). Ces souris présentent exactement le même profil que les souris p53^{-/-} après irradiation, à savoir une baisse de l'apoptose radio-induite au niveau des cryptes, associée à des lésions plus sévères. Ces résultats reflètent donc bien l'indépendance des deux voies de signalisation. En outre, les résultats obtenus avec les souris p21^{-/-} sont cohérents avec un certain nombre d'études montrant que la déficience d'une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN entraîne des lésions radio-induites plus sévères au niveau des cryptes (par exemple ATM (Ch'ang et al., 2005)). A la lumière de ces résultats, p53 apparaît donc comme un régulateur important de la sévérité des lésions épithéliales radio-induites. D'une part, il favorise l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN par p21. D'autre part, il enclenche si nécessaire le processus apoptotique par PUMA, afin d'éliminer les cellules qui ont échoué dans la réparation de l'ADN et de favoriser la prolifération ultérieure des cellules survivantes.

En marge de cette voie de signalisation p53 dépendante, il a été montré récemment que PTK6 (Protein Tyrosine Kinase 6) était également impliqué dans la mort radio-induite des cellules souches intestinales (Figure 8). L'expression de cette protéine est induite au niveau des cellules des cryptes par une irradiation de 8Gy en TBI, et est associée à l'apoptose de ces mêmes cellules. De plus, l'utilisation de souris PTK6^{-/-} a montré que cette protéine était impliquée dans l'apoptose des cellules souches à 6 et 72h après irradiation, ainsi que dans la prolifération des cellules des cryptes 72h après irradiation. Cette activité pro-apoptotique de PTK6 passe par l'inhibition des protéines Akt et Erk1/2, cette dernière étant responsable de l'inactivation de Bad par phosphorylation (Haegebarth et al., 2009). Il est

intéressant de constater que l'expression radio-induite de PTK6 est en partie liée à p53, bien qu'elle ne soit pas une cible transcriptionnelle directe (Gierut et al., 2012). Ces résultats récents renforcent donc le caractère déterminant de p53 dans le devenir des cellules souches intestinales après irradiation.



La vague de mort qui survient au niveau des cryptes dans les premières heures qui suivent l'irradiation est associée à une forte prolifération des cellules souches survivantes, qui sont à l'initiative de la régénération de l'épithélium (Merritt et al., 1997; Qiu et al., 2008). L'utilisation depuis quelques années de souris reportrices, qui permettent de suivre un lignage cellulaire précis, a considérablement amélioré nos connaissances sur ces cellules souches ainsi que sur les mécanismes régénératifs mis en jeu.

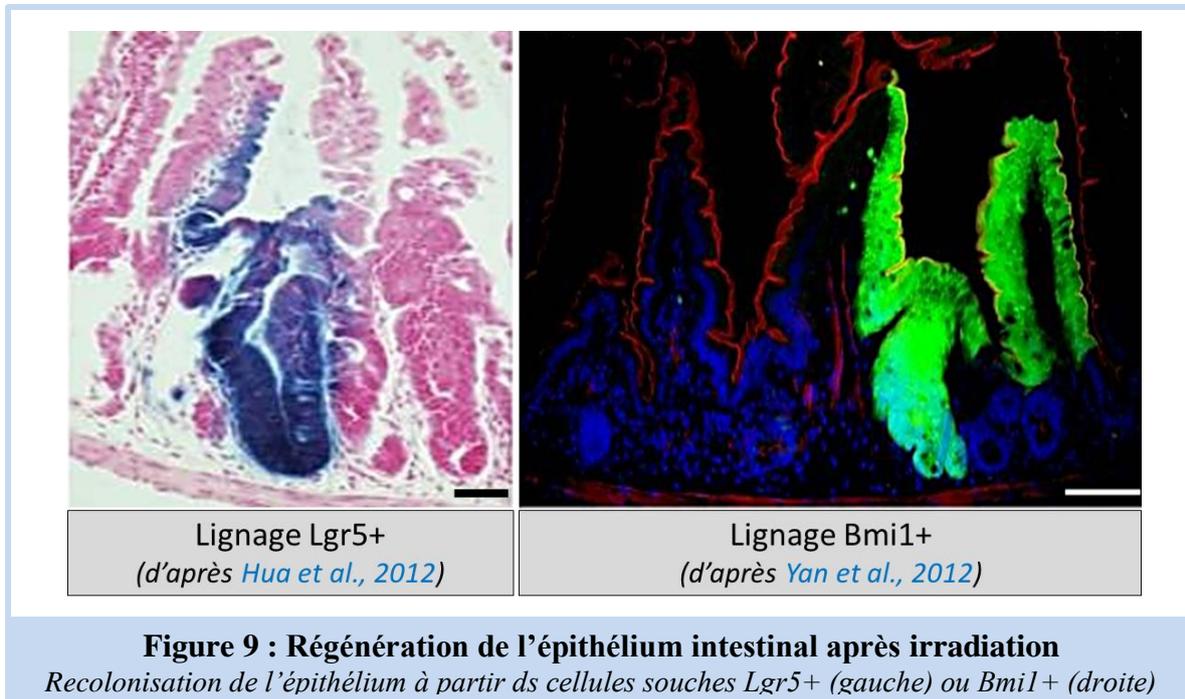
Décrites initialement par Cheng et Leblond en 1974 (Cheng et Leblond, 1974), les cellules CBC ont été caractérisées en 2007 comme des cellules Lgr5 positives (Lgr5+), capables d'assurer l'homéostasie à long terme de l'épithélium (Barker et al., 2007). Les cellules LRC+4 ont quant à elles été décrites par Potten en 1977 (Potten, 1977), bien qu'il semble désormais que ce terme regroupe probablement plusieurs types cellulaires qui expriment différents marqueurs spécifiques (Bmi1 (Sangiorgi et Capecchi, 2008), Hopx (Takeda et al., 2011), mTERT (Montgomery et al., 2011), Lrig (Powell et al., 2012)). Cependant, il apparaît ces dernières années que la frontière entre ces deux lignées cellulaires

soit plus floue, puisque d'une part des cellules LCR+4 peuvent dériver de cellules CBC et inversement (Tian et al., 2011; Takeda et al., 2011), et d'autre part les marqueurs LRC+4 sont également exprimés par les cellules Lgr5+ (Muñoz et al., 2012).

Les cellules souches intestinales ont un rôle crucial dans la régénération de l'épithélium après irradiation, bien qu'il subsiste encore dans la littérature des contradictions, tant sur leur radiosensibilité que sur leur participation respective. Il a tout d'abord été montré qu'une irradiation de 12Gy en TBI induisait une mortalité importante mais pas totale des cellules Lgr5+, et que la proportion de cellules survivantes 48h après irradiation présageait de la régénération des cryptes 3.5 jours après irradiation (Hua et al., 2012). Les auteurs expliquent cette certaine radiorésistance par la mise en place très rapide des mécanismes d'arrêt du cycle et de réparation de l'ADN, particulièrement efficace grâce à la recombinaison homologue. L'utilisation de souris Lgr5-LacZ leur a également permis de montrer que la repopulation épithéliale avait pour origine les cellules Lgr5+ (Figure 9). La même année, l'équipe de Kuo a quant à elle montré qu'une irradiation de 12Gy en TBI entraînait 48h plus tard la disparition des cellules Lgr5+, contrairement aux cellules Bmi1+ qui elles se maintenaient. De plus, l'utilisation de souris Bmi1-CreER; Rosa26-YFP a permis de montrer que ces cellules étaient capables de sortir de leur quiescence pour proliférer, régénérer l'épithélium intestinal et reformer des cellules souches Lgr5+ une semaine après irradiation (Yan et al., 2012). Les auteurs ont donc conclu que contrairement à leur rôle mineur dans le maintien de l'homéostasie intestinale, les cellules Bmi1+ sont déterminantes dans la régénération de l'épithélium après irradiation (Figure 9).

Une explication de ces résultats à première vue contradictoires se trouve peut-être dans les travaux de Van Landeghem et al., eux aussi parus en 2012. En effet, l'utilisation de souris Sox9-EGFP a permis de montrer une prolifération des cellules Lgr5+ et Bmi1/Hopx+ (respectivement Sox9-low et Sox9 high) après une irradiation abdominale de 14 Gy. Cependant, cette prolifération concerne principalement les cellules Sox9-low. De plus, l'analyse du transcriptome a révélé un switch phénotypique radio-induit des cellules Sox9-high favorisant la réparation des lésions à l'ADN et la prolifération (Van Landeghem et al., 2012). Ces travaux représentent donc la démonstration élégante que les cellules CBC sont les principaux effecteurs de la régénération épithéliale après irradiation, et que les cellules LRC+4 représentent un pool radio activable de cellules souches. Ces résultats ont par ailleurs été corroborés très récemment, grâce à l'utilisation de souris délétées spécifiquement des

cellules CBC grâce au système DTR/DT (Diphtheria Toxin Receptor/Diphtheria toxin). Il a en effet été montré que les cellules CBC sont indispensables à la régénération de l'épithélium intestinal suite à une irradiation de 10Gy en TBI (Metcalf et al., 2014). De plus, les auteurs ont également montré une activation compensatoire des cellules LRC+4, mais cette fois pour des doses inférieures à 6Gy TBI.



En résumé, l'exposition de l'intestin aux rayonnements ionisants entraîne dans les heures qui suivent un arrêt du cycle des cellules souches intestinales, qui engagent un processus de réparation des lésions à l'ADN, et si nécessaire un processus apoptotique. Les cellules souches survivantes entrent alors dans une phase de prolifération intense, qui conduit à la régénération de l'épithélium.

e. Effets indirects : la fibrose radio-induite

La fibrose radique est une complication classique des traitements par radiothérapie, qui apparaît généralement plusieurs mois, voire plusieurs années après le début des expositions. Elle se caractérise par une accumulation de matrice extracellulaire (MEC) au niveau de l'organe touché, principalement du collagène, associée à une composante inflammatoire chronique. A terme, cette accumulation anormale de fibres de collagène entraîne une dysfonction de l'organe, qui cause un réel problème clinique sur l'évolution des patients traités par radiothérapie. Dans le cadre de la sphère abdominopelvienne par exemple, les conséquences des fibroses intestinales, au sens large du terme, vont de l'altération de la

qualité de vie des patients (syndrome de malabsorption, sténose) jusqu'à l'engagement de leur pronostic vital (occlusion, fistule) ([Andreyev, 2005](#)).

Les phases précoces de la fibrose sont comparables à un processus cicatriciel classique. Les mécanismes finement régulés qui le composent impliquent dans un premier temps la formation d'un tissu conjonctif provisoire, visant à combler les pertes tissulaires consécutives à une lésion. Cette étape implique principalement la différenciation de cellules mésenchymateuses en myofibroblastes (principalement les fibroblastes résidants), qui vont sécréter de la MEC. Dans un deuxième temps, après maturation de ce tissu provisoire, un processus de remodelage matriciel va s'enclencher afin d'éliminer cette MEC et les myofibroblastes, permettant à l'organe de recouvrir sa structure originelle ou quasi-originelle. Or, dans le cas d'une fibrose radique, ce mécanisme est compromis par la mise en place d'une boucle d'activation chronique des signaux moléculaires et cellulaires initialement impliqués. Ainsi, la fibrose est assimilable à un processus de cicatrisation pathologique, qui conduit notamment à une dérégulation des mécanismes de synthèse/dégradation de la MEC ([Strup-Perrot et al., 2004](#)), ainsi qu'à un maintien de la différenciation et de la survie des myofibroblastes ([Vozenin-Brotons et al., 2003](#)).

Les myofibroblastes sont les acteurs cellulaires clés du processus fibrotique, car la production continue de MEC liée à leur activation chronique entraîne une évolution de la cicatrisation vers la fibrose. Leur caractéristique principale réside dans l'expression de fibres de stress composées d' α -Smooth Muscle Actin (α -SMA), qui leur confèrent notamment un phénotype contractile ([Hinz et al., 2007](#)). L'origine des myofibroblastes dans le cadre des fibroses est diverse :

- Ils proviennent généralement de la différenciation des cellules mésenchymateuses, principalement les fibroblastes résidants mais aussi les cellules musculaires lisses (CML), et ce notamment dans le cadre des entérites radiques ([Vozenin-Brotons et al., 2004](#); [Wang et al., 2004](#)).
- Ils peuvent également provenir des cellules épithéliales par la transition épithélium-mésenchyme. Ce mécanisme a déjà été démontré dans différentes pathologies fibrotiques, notamment au niveau de l'intestin dans un modèle de colite induite au TNBS ([Flier et al., 2010](#)), ainsi que récemment dans les fibroses radiques pulmonaires ([Almeida et al., 2013](#)) et hépatiques ([Wang et al., 2013](#)).

- Les cellules endothéliales constituent une autre origine potentielle des myofibroblastes par la transition endothélium-mésenchyme. Ce mécanisme a déjà été décrit dans le cadre des fibroses cardiaques, ainsi que dans la maladie de Crohn (Rieder et al., 2011), et fait par ailleurs l'objet d'une thèse au laboratoire.

La différenciation des myofibroblastes est régie par l'action de cytokines pro-fibrosantes, sécrétées entre autre par les cellules inflammatoires. L'un de ces acteurs principaux est le Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1). En effet, le TGF- β 1 induit la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes en régulant la transcription de l' α -SMA et des collagènes (Verrecchia et al., 2001), ainsi qu'en régulant de nombreux acteurs impliqués dans le remodelage matriciel (Eickelberg et al., 1999). Il est ainsi responsable de l'acquisition du phénotype contractile, sécrétoire et proliférant des myofibroblastes.

Il a été montré *in vivo* que le TGF- β 1 est activé par les rayonnements ionisant dans un modèle d'irradiation des glandes mammaires chez la souris (Barcellos-Hoff et al., 1994). Cette même équipe a par la suite démontré la responsabilité des ROS dans ce mécanisme, qui sont capables d'activer très rapidement après irradiation le TGF- β 1 sous forme latente, lié au LAP (Latency-Associated Peptide), présent dans la MEC (Jobling et al., 2006) (Figure 10). La surexpression du TGF- β 1 au niveau ARN et protéique est décrite dans de nombreux modèles de fibrose radique. Dans le cas de la fibrose intestinale, elle a été mise en évidence chez les patients, principalement au niveau des cellules endothéliales et des myofibroblastes (Vozenin-Brotons et al., 2003), ainsi que dans un modèle d'entérite radique chez le rat (Wang et al., 2001). Au-delà de sa surexpression observée après irradiation, son implication directe dans le développement des fibroses radiques a été démontrée de différentes manières. Tout d'abord, l'inhibition de la voie TGF- β 1 par un inhibiteur du récepteur TGF β R2 dans un modèle d'entérite radique chez la souris montre une amélioration de la fibrose radique (Zheng et al., 2000). Par ailleurs, l'équipe d'Hauer-Jensen a par la suite publié un certain nombre d'études montrant les propriétés anti-fibrosantes de différentes molécules dans un modèle d'irradiation localisée du grêle chez le rat, et toutes ces molécules sont associées à une diminution de l'expression du TGF- β 1 dans les tissus (Wang et al., 2004; Boerma et al., 2006). Enfin, récemment, cette même équipe a également montré qu'une augmentation pharmacologique du taux plasmatique de TGF- β 1 est associée à une aggravation des manifestations histopathologiques associées à la fibrose, toujours sur le même modèle animal (Boerma et al., 2013).

Bien que le TGF- β 1 soit capable de moduler différentes voies de signalisation, la voie des protéines SMAD (Figure 10) semble préférentiellement impliquée dans les mécanismes de la fibrose. En effet, il a été montré sur des coupes de rectites radiques que la surexpression du TGF- β 1 dans les cellules endothéliales est associée à une augmentation de la phosphorylation des protéines SMAD2/3. De plus, cette augmentation de l'activation des protéines SMAD est impliquée dans le phénotype fibrogénique des cellules musculaires lisses vasculaires (Milliat et al., 2006), ainsi que dans la surexpression radio-induite du Plasminogen Activator Inhibitor-type 1 (PAI-1), qui est un des gènes cibles du TGF- β 1 (Milliat et al., 2008). L'implication de cette protéine dans le processus fibrotique sera par ailleurs détaillée dans la partie IV qui lui est consacrée. De même, la déficience génétique en SMAD3 chez la souris provoque une diminution des lésions fibrotiques après une irradiation cutanée forte dose, qui est associée à une diminution de l'immunoréactivité du TGF- β 1 (Flanders et al., 2002). L'ensemble de ces résultats démontrent donc que le TGF- β 1, par la voie de signalisation SMAD3 dépendante et ces gènes cibles, joue un rôle important dans l'évolution fibrotique des lésions radio-induites.

Le TGF- β 1 n'est pas le seul effecteur de la différenciation myofibroblastique. Il a en effet été montré que le Connective Tissue Growth Factor (CTGF) est un autre acteur moléculaire clé du processus fibrotique. En effet, bien que son expression nécessite un signal inducteur en condition physiologique (comme par exemple pendant la cicatrisation), le CTGF est constitutivement surexprimé dans diverses pathologies fibrotiques, où il régule notamment la prolifération, la migration et l'adhésion des fibroblastes, ainsi que la production de MEC (Moussad et Brigstock, 2000). De la même manière, il a été montré sur des biopsies d'entérites radiques que le CTGF était surexprimé au niveau ARN et protéique, et ce spécifiquement au niveau des sites d'accumulation collagénique et myofibroblastique (Vozenin-Brotons et al., 2003). Par ailleurs, les cellules musculaires lisses et les myofibroblastes isolés à partir de ces biopsies surexpriment constitutivement le CTGF (Bourgier et al., 2005).

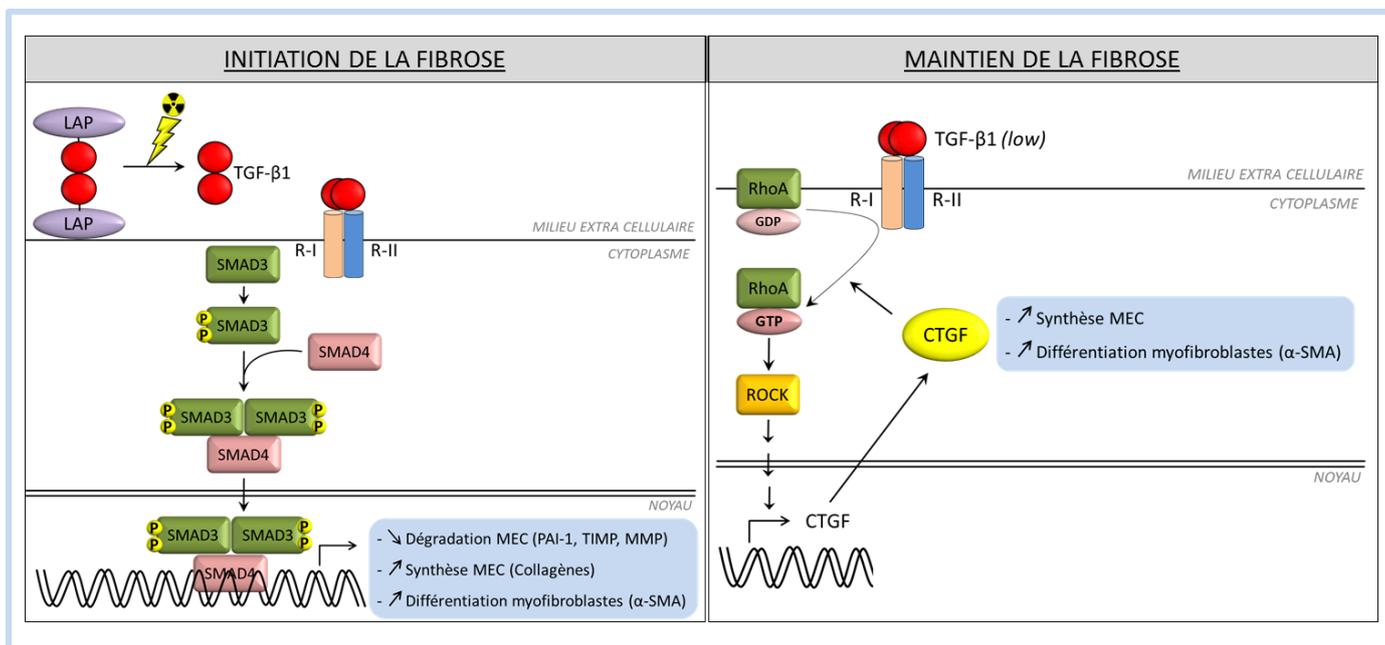


Figure 10 : Mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la fibrose radique
Représentation simplifiée, à partir de (Pohlers et al., 2009)

Il est intéressant de constater que le CTGF est une cible transcriptionnelle du TGF-β1. Il a en effet été montré que le TGF-β1 induit une forte surexpression du CTGF sur des fibroblastes pulmonaires humains, et que cette surexpression peut être médiée tant par la voie des SMAD (SMAD3 principalement) que par une protéine G de la superfamille Ras, telle que Rho ou Rac (Figure 10) (Kucich et al., 2001). Dans le cadre des fibroses associées aux entérites radiques, il a été montré que l'activation du CTGF par le TGF-β1 passe préférentiellement par la voie des SMAD dans des cellules musculaires lisses saines, alors qu'elle passe préférentiellement par la voie Rho/ROCK dans des cellules musculaires lisses provenant des zones lésées (Haydont et al., 2005). De plus, l'activation de cette voie Rho/ROCK a été montrée sur les biopsies de patients, et a été reliée à la différenciation myofibroblastique des cellules musculaires lisses mises en culture à partir des zones irradiées (Bourgier et al., 2005). En outre, cette même équipe a également mis en évidence une différence dans les mécanismes d'initiation et de maintien de la fibrose. En effet, bien que le TGF-β1 soit impliqué dans l'initiation de la fibrose radique, notamment en initiant la différenciation myofibroblastique, le maintien de cette fibrose est quant à elle dépendante de l'action autocrine du CTGF (Haydont et al., 2008). De plus, la faible expression du TGF-β1 constatée sur les biopsies d'entérites radiques contribue à cette auto-induction du CTGF en stimulant l'activation de la voie Rho (Figure 10). Ces résultats semblent par ailleurs corroborés par l'effet d'un anticorps neutralisant du CTGF, qui montre une diminution de la fibrose et du dépôt de collagène dans un modèle d'irradiation cutanée chez la souris (Ikawa et

al., 2008), ainsi que par l'inhibition de l'activation de fibroblastes en culture isolés de patients porteurs de sclérose systémique grâce à l'inhibition de la voie ROCK par siRNA (Akhmetshina et al., 2008). L'ensemble de ces résultats démontrent donc le rôle prépondérant du CTGF dans le maintien des fibroses radiques.

Les cellules inflammatoires peuvent également produire des signaux pro-fibrosants, notamment par le biais des cytokines IL4 et IL13. En effet, il a été montré que la balance entre les cytokines IL4/IL13 (pro-fibrosantes, principalement sécrétées par les LT(TH2) et les macrophages M2) et les cytokines IL1/IL12 (anti-fibrosantes, principalement sécrétées par les LT(TH1) et les macrophages M1), détermine l'orientation fibrose/réparation après la réponse inflammatoire (Wynn et al., 2004). De plus, les souris IL4^{-/-} sont protégées de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, bien qu'elles présentent une inflammation plus sévère (Huaux et al., 2003). Ces résultats soulèvent la question intéressante du lien entre l'inflammation et la fibrose. En effet, la fibrose est la conséquence tardive d'une réponse à divers stimuli qui impliquent tous une réponse inflammatoire, et un certain nombre d'études semble impliquer ce processus inflammatoire dans le développement de la fibrose. De manière non exhaustive, il a été montré que la concentration de LPA (LysoPhosphatidique Acid) est élevée dans les lavages broncho-alvéolaires de patients souffrant de fibroses idiopathiques, et que les souris déficientes pour le LPAR (LysoPhosphatidique Acid Receptor) sont protégées de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Tager et al., 2008). De même, la Prostaglandine F2 α et son récepteur apparaissent comme des médiateurs fibrogéniques potentiels dans ce même modèle animal (Oga et al., 2009). Cependant, l'inefficacité des stéroïdes et anti-inflammatoires non stéroïdiens sur le développement des pneumopathies idiopathiques nous indique que l'inflammation ne semble pas influencer le maintien de la fibrose, bien que le stimulus inflammatoire initial soit nécessaire. Ce concept est appuyé par l'effet différentiel de la prednisolone dans un modèle de fibrose pulmonaire chez le rat en fonction de la cinétique du traitement. Si la prednisolone est administrée dans les 9 jours qui suivent l'induction de la fibrose, phase correspondante à la surexpression des gènes pro-inflammatoires ainsi qu'à l'infiltrat des cellules immunitaires, le traitement prévient efficacement la fibrose. En revanche, à partir du 10^e jour, l'initiation de ce traitement est inefficace sur le développement de la fibrose (Chaudhary et al., 2006). Cependant, ce lien entre fibrose et inflammation n'est pas encore clairement défini. De nouvelles études pourraient apporter un éclairage supplémentaire à cette question, notamment dans le cadre des fibroses radiques où le processus inflammatoire lié à l'irradiation est très important.

III. Endothélium et lésions radio-induites

Il a déjà été évoqué dans ce manuscrit que l'épithélium intestinal n'est pas la seule cible des rayonnements ionisants dans le cadre de la radiothérapie. Le compartiment vasculaire, et notamment l'endothélium, subissent également de nombreuses modifications après exposition aux rayonnements ionisants. Or, les nombreuses fonctions physiologiques et physiopathologiques associées aux cellules endothéliales influencent, de concert avec le compartiment intestinal, l'évolution des lésions radio-induites.

1) Structure et fonction des vaisseaux sanguins

a. Organisation des vaisseaux sanguins et du réseau vasculaire

Un vaisseau sanguin se compose de trois tuniques, chacune dévouée à des fonctions précises, et dont l'épaisseur est adaptée au type de vaisseaux (Figure 11).

La couche la plus interne est l'**intima**. Située à l'interface avec le sang, elle est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales qui repose sur une lame basale. Dans le cas des artères élastiques, qui possèdent le plus gros diamètre, l'intima est très épaisse, et les cellules endothéliales peuvent être associées à des cellules myointimales, qui sont des cellules musculaires lisses. L'intima est la seule couche systématiquement présente quel que soit le diamètre du vaisseau, puisque les plus petits d'entre eux, les capillaires, sont constitués d'une unique couche de cellules endothéliales.

La couche intermédiaire est la **média**. Composée de CML et de MEC, son épaisseur et sa structure sont très variables en fonction du type de vaisseau. Elle peut aller de la monocouche de CML pour les petites artérioles et veinules, à l'empilement concentrique de plusieurs unités lamellaires pour les plus grosses artères, en d'autres termes une alternance de CML et de lames élastiques.

Enfin, l'**adventice** est la couche la plus externe, et se compose principalement de collagène et de fibroblastes. Elle contient également les terminaisons nerveuses de système autonome, qui contrôle avec le système endocrinien la vasoconstriction ou la vasodilatation des vaisseaux via les CML. De plus, l'adventice des plus grosses artères présente des capillaires nourriciers, le vaso vasorum, qui alimente les cellules les plus éloignées de la lumière du vaisseau, et donc du sang.

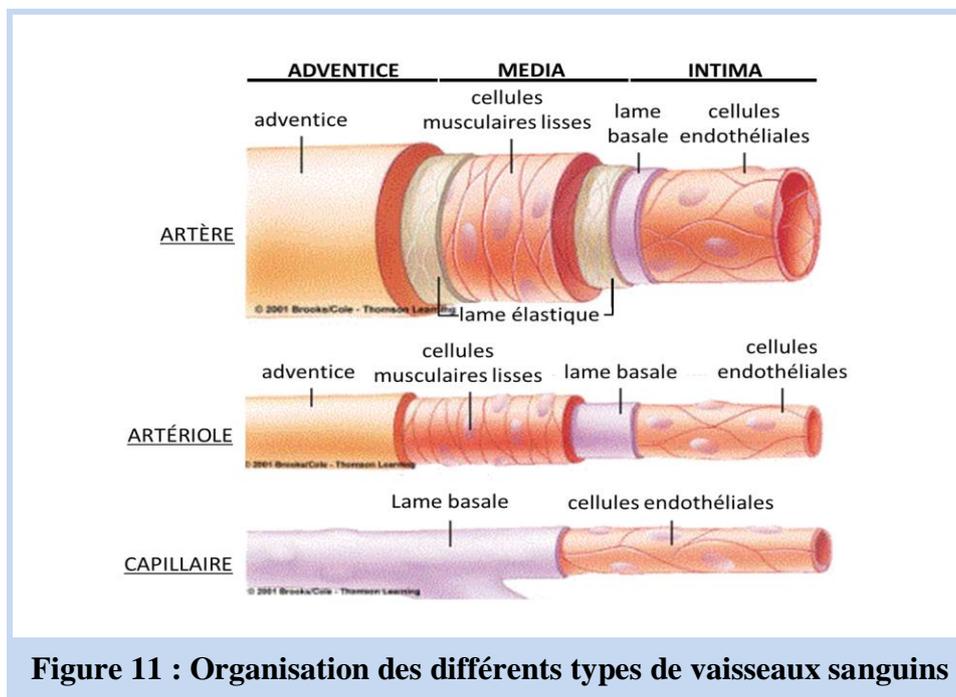


Figure 11 : Organisation des différents types de vaisseaux sanguins

Le réseau vasculaire systémique suit le schéma général suivant. A la sortie du cœur, le sang oxygéné circule dans des artères élastiques, qui se divisent en artères musculaires. Leur diamètre rétrécit progressivement à mesure de leurs ramifications dans les tissus pour former des artérioles, qui se divisent elles-mêmes en capillaires, siège des échanges en gaz et en nutriments. Le sang repart alors dans des veinules, qui se rassemblent pour former des veines. Ces veines grossissent jusqu'à atteindre le cœur, qui enverra le sang dans le réseau vasculaire pulmonaire afin d'être oxygéné avant d'être réinjecté dans le système général.

Au niveau viscéral, l'intestin grêle est irrigué par l'artère mésentérique supérieure, qui se divise successivement pour pénétrer et s'enfoncer dans la paroi intestinale. Les artérioles présentes dans la sous-muqueuse se ramifient elles-mêmes en capillaires au niveau de la lamina propria des villosités, là où le sang est enrichi en nutriments issus de la digestion. Ces capillaires sont en retour drainés par les veinules, elles aussi présentes dans la sous-muqueuse, et se rassemblent progressivement pour former la veine mésentérique supérieure (Figure 12).

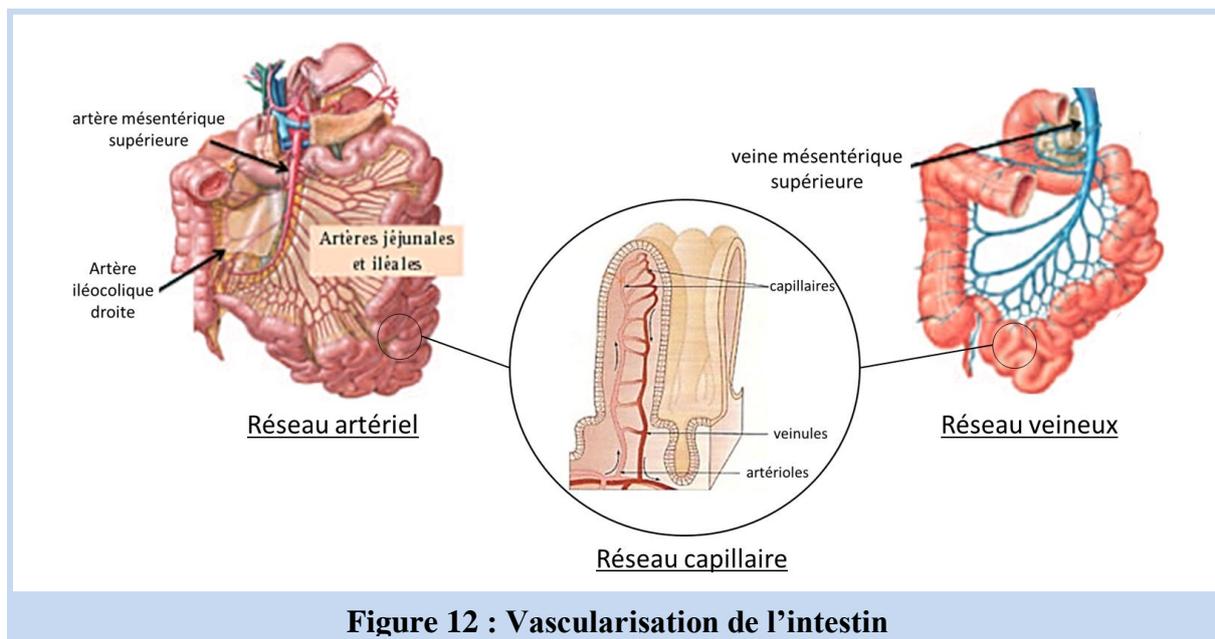


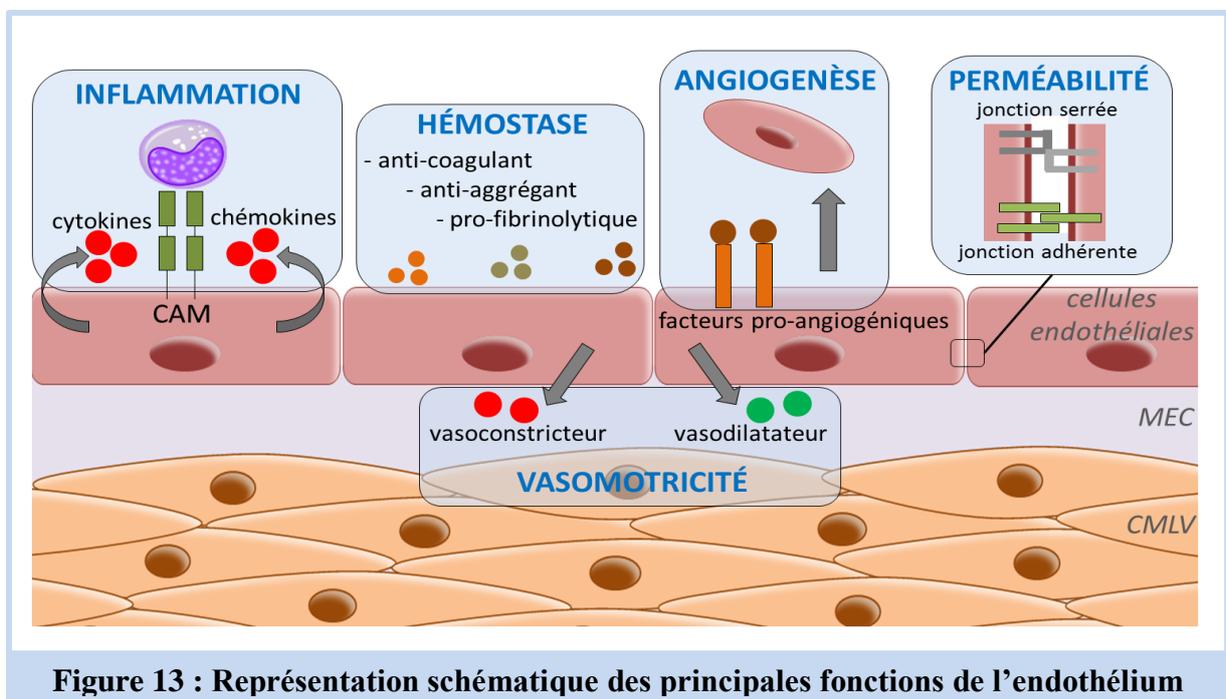
Figure 12 : Vascularisation de l'intestin

b. Fonctions de l'endothélium vasculaire

L'endothélium est un compartiment clé de la régulation des fonctions physiologiques vasculaires, notamment de par sa position stratégique à l'interface entre le sang et les vaisseaux. En effet, la fonction première des vaisseaux sanguins consiste à transporter le sang à l'ensemble des tissus afin de garantir leur approvisionnement en gaz, nutriments et hormones. Ainsi, la distance maximale entre une cellule et un capillaire est de l'ordre de quelques micromètres. Dans ce contexte, l'endothélium assure un rôle de barrière filtrante entre le sang et les tissus. Cette perméabilité sélective, indispensable au maintien de l'homéostasie tissulaire, est assurée par les jonctions cellulaires qui unissent les cellules endothéliales entre elles (Figure 13). Celles-ci sont pour la plupart serrées, composées de claudines et d'occludines, ou adhérentes, composées de VE-Cadherin (Vascular Endothelial-Cadherin). Les unes comme les autres sont reliées au cytosquelette, et impliquent une étanchéité inter-cellulaire qui assure un contrôle strict des molécules qui passent du sang vers les tissus (Wallez et Huber, 2008).

De par son contact direct avec le sang, l'endothélium doit garantir l'homéostasie vasculaire en formant une surface naturellement thromborésistante. Cette caractéristique est assurée par la production de substances anticoagulantes (thrombomoduline, héparine), antiagrégantes (prostacycline, NO = monoxyde d'azote) et pro-fibrinolytiques (activateurs du plasminogène) (Figure 13). Ainsi, l'endothélium régule à la fois les mécanismes de coagulation et de fibrinolyse, qui seront plus amplement détaillés dans la partie consacrée à PAI-1, dont la fonction principale est de s'opposer à l'activation du plasminogène.

De la même manière, sa proximité avec les cellules sanguines, notamment les leucocytes, confère à l'endothélium un rôle central dans la réponse inflammatoire et immunitaire (Figure 13). En effet, les cellules endothéliales régulent le trafic des leucocytes entre le sang et les sites inflammatoires en fonction des stimuli qu'elles reçoivent. D'une part, la sécrétion de chémokines, telles que CCL5 (C-C motif Ligand 5) ou MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1), attirent les leucocytes (en l'occurrence dans ce cas précis les monocytes) à proximité du foyer inflammatoire. D'autre part, l'expression de molécules d'adhésion cellulaire (CAM) initie le rolling, l'adhésion et la transmigration des leucocytes circulants, régulant ainsi leur recrutement dans les tissus à la suite d'un stimulus inflammatoire. Les principales CAM impliquées dans le recrutement des leucocytes sont VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), ICAM-1/2 (Intercellular Cell Adhesion Molecule-1/2), PECAM-1 (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1), qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines, ainsi que les Sélectine P et E. De plus, les cellules endothéliales sécrètent également diverses cytokines pro et anti-inflammatoires, qui participent pleinement à la réponse inflammatoire tissulaire.



Une autre fonction importante des cellules endothéliales est la régulation paracrine du tonus vasculaire. Ce contrôle de la vasomotricité est assuré par la sécrétion d'un panel de molécules hémodynamiques, qui agissent localement sur la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) (Figure 13). De manière non exhaustive, les molécules vasodilatatrices sont entre autres le NO, produit par la eNOS (endothelial NO

Synthase) et le CNP (C-type Natriuretic Peptide). L'un comme l'autre, directement ou via ses récepteurs, augmentent la concentration intra-cellulaire de GMPc dans les CMLV, second messenger qui déclenche la relaxation de ces cellules. De même, les molécules vasoconstrictrices sont par exemple l'angiotensine II et l'endothéline-1. L'angiotensine II provient du clivage de l'angiotensinogène par l'enzyme de conversion de l'angiotensine, et agit sur les CMLV via le récepteur couplé aux protéines G AT1. L'endothéline-1 quant à elle, permet une régulation très fine de la vasomotricité. Elle induit d'une part la contraction des CMLV directement via le récepteur ET-A, et d'autre part la relaxation de ces cellules en activant le récepteur ET-B présent dans les cellules endothéliales, et en stimulant leur production de NO et de prostacycline.

Enfin, l'angiogenèse est un processus de néovascularisation à partir de vaisseaux préexistants, qui peut intervenir tant dans un contexte physiologique (cicatrisation, embryogenèse), que physiopathologique (progression tumorale). Quel que soit le mécanisme angiogénique en jeu (bourgeonnement, intussusception, septation), l'activation des cellules endothéliales par des facteurs pro-angiogéniques est une étape clé, leur permettant de proliférer et de migrer afin de former les ébauches des nouveaux vaisseaux (Figure 13). L'activation des cellules endothéliales s'accompagne d'un remodelage matriciel, ainsi que de la migration des CMLV, le tout étant finement orchestré et régulé. Les principaux facteurs pro-angiogéniques qui agissent sur les cellules endothéliales via leurs récepteurs sont : le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), le FGF2 (Fibroblast Growth Factor-2), le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) et l'angiopoïétine 1.

2) Effets des rayonnements ionisants sur l'endothélium vasculaire

L'endothélium représente, avec les cellules souches intestinales, l'un des principaux compartiments cible des rayonnements ionisants au niveau de l'intestin. Ces derniers déclenchent dans les cellules endothéliales diverses réponses, qui vont du changement phénotypique à leur mort.

a. Apoptose des cellules endothéliales

Le phénomène d'apoptose radio-induite au niveau de l'endothélium est connu depuis de nombreuses années. La première étude qui décrit la radiosensibilité des cellules endothéliales démontre que l'exposition de cellules bovines (Bovine Aortic Endothelial Cell) à une irradiation de 10 Gy entraîne très rapidement l'hydrolyse des sphingomyélines en

céramides, qui sont responsables de leur apoptose (Haimovitz-Friedman et al., 1994). De plus, l'étude menée sur des préparations membranaires isolées démontre que les rayonnements ionisants stimulent l'hydrolyse de la sphingomyéline directement au niveau membranaire, probablement par action de la sphingomyélinase acide (ASMase). Cette hypothèse sera confirmée 2 ans plus tard par l'utilisation de cellules lymphoblastiques de patients déficients en ASMase, qui sont protégées de la génération de céramides et de l'apoptose induite par les rayonnements ionisants (Santana et al., 1996). Ces résultats seront également confirmés par Liao et al., qui démontre de surcroît l'existence de 2 vagues de production des céramides après irradiation de cellules endothéliales bovines (Figure 14). La première vague (entre 30s et 2h après irradiation) est liée à l'action de l'ASMase au niveau de la membrane plasmique, et la deuxième vague (4h après irradiation) est liée aux cassures double-brin de l'ADN qui provoquent l'activation post-transcriptionnelle de la céramide synthase et la synthèse de novo de céramides (Liao et al., 1999).

L'activation de l'ASMase par les rayonnements ionisants apparaît comme la voie de production principale des céramides. Par ailleurs, l'expression accrue de cette enzyme dans les cellules endothéliales microvasculaires, avec une localisation préférentielle à la membrane, pourrait expliquer la radiosensibilité accrue des microvaisseaux (Marathe et al., 1998). Il a été montré que les rayonnements ionisants entraînent la translocation de l'ASMase des lysosomes vers le feuillet externe de la membrane plasmique (Figure 14) (Truman et al., 2010). En revanche, les mécanismes d'activation radio-induite de cette enzyme n'ont pas encore été déterminés. Cependant, l'activation de l'ASMase par le stress oxydant, démontrée dans les cellules endothéliales, semble particulièrement intéressante dans un contexte radique, du fait de la forte production de ROS qui intervient très tôt après irradiation (Figure 15) (Zhang et al., 2007). Cette hypothèse est appuyée par l'inhibition de la translocation et de l'activation de l'ASMase après irradiation de cellules endothéliales microvasculaires par des enzymes anti-oxydantes (Corre et al., 2013).

De par leur nature fortement hydrophobe, les céramides forment spontanément, en association avec le cholestérol, des rafts lipidiques, qui sous l'action de différents stimuli peuvent s'associer en domaine enrichis en céramide (Ceramide Rich Platform). Il a été montré que ces CRP sont impliqués dans la transduction du signal apoptotique médié par les céramides (Figure 14). D'une part, la formation des CRP apparaît nécessaire à la translocation et l'activation radio-induite de l'ASMase dans des cellules cancéreuses humaines (Bionda et

al., 2007), et d'autre part l'exposition de BAEC à une irradiation de 10 Gy entraîne très rapidement la formation de CRP enrichis en ASMase, dont la dissociation entraîne une baisse de 70% du taux d'apoptose radio-induite (Rotolo et al., 2012).

Bien que les céramides soient capables d'activer plusieurs cascades moléculaires qui conduisent à l'apoptose, les connaissances sur les voies de signalisation impliquées dans l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales restent limitées. Il a cependant été montré que la voie de signalisation apoptotique liée à l'ASMase est indépendante de p53 (Santana et al., 1996), qu'elle requiert l'activation de la voie SAPK/JNK (Verheij et al., 1996), et qu'elle dépend de Bax et Bak de manière non redondante (Rotolo et al., 2008) (Figure 14).

Au-delà des modèles *in vitro*, l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales a pu être observée dans de très nombreux modèles animaux, notamment au niveau de l'intestin (Paris et al., 2001; Cho et al., 2004; Rotolo et al., 2008) En outre, l'utilisation de souris ASMase^{-/-} a permis de confirmer le rôle des céramides dans la signalisation apoptotique radio-induite, puisque ces souris présentent une baisse drastique du nombre de cellules endothéliales apoptotiques après irradiation TBI dans l'intestin (Paris et al., 2001), le poumon (Santana et al., 1996) ou le système nerveux central (Peña et al., 2000).

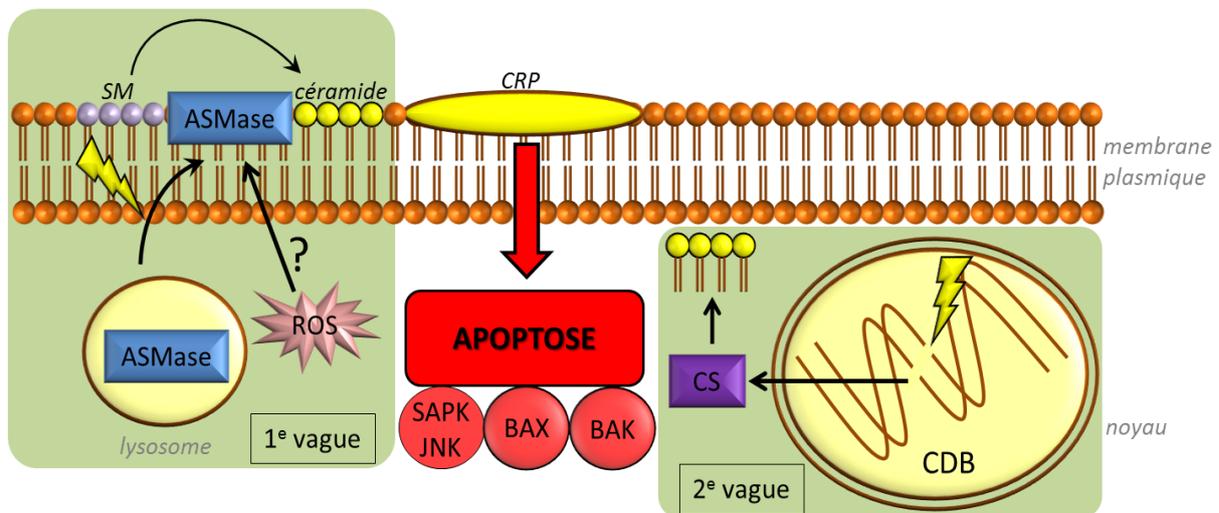


Figure 14 : Implication des céramides dans l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales
 SM : sphingomyéline, CS : céramide synthase, CDB : cassure double-brin, CRP : Ceramide Rich Platform

L'exposition aux rayons ionisants entraîne donc une vague d'apoptose radio-induite importante des cellules endothéliales. Les cellules survivantes développent quant à elles un phénotype dysfonctionnel, caractérisé entre autre par une sécrétion excessive de cytokines pro-inflammatoires, un accroissement du recrutement des cellules sanguines, ainsi que l'activation du système de coagulation.

b. Activation de l'endothélium et inflammation

L'activation radio-induite de l'endothélium se traduit tout d'abord par une surexpression rapide, à la surface des cellules endothéliales, des différentes molécules d'adhésion impliquées dans le recrutement des leucocytes et des thrombocytes (Molla et Panes, 2007) (pour mémoire, ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, et les Sélectines P et E). Cette surexpression a pu être montrée dans de nombreux modèles d'irradiation, aussi bien *in vitro* que *in vivo*, notamment au niveau des veinules post-capillaires mésentériques après irradiation abdominale chez la souris (Molla et al., 2001; Molla et al., 2003). Cette surexpression radio-induite se retrouve également au niveau des vaisseaux sur différentes biopsies de patients traités par radiothérapie (Handschel et al., 1999; Baeten et al., 2006).

La surexpression de ces différentes molécules d'adhésion dans les heures qui suivent l'exposition aux rayons ionisants transforme ainsi la surface de l'endothélium en surface pro-adhésive qui favorise les interactions leucocytes/cellules endothéliales. Ces interactions se déroulent en plusieurs étapes successives, à savoir le rolling, l'adhésion ferme et la transmigration endothéliale. Un certain nombre de travaux *in vitro* démontrent en effet une augmentation des interactions leucocytes/cellules endothéliales irradiées, tant pour des conditions statiques que pour des protocoles en flux. La plupart des études ont été réalisées sur des lignées monocytaires (U937, HL-60), et montrent une augmentation de l'adhésion qui peut être précoce, dans les 24h qui suivent l'irradiation (Quarmby et al., 1999), ou plus tardive, de 7 à 15 jours après irradiation (Lowe et al., 2014). Ces résultats ont par ailleurs pu être confirmés *in vivo* grâce à la technique de microscopie intravitale, dans de nombreux modèles d'irradiation chez le rongeur. Ainsi, au niveau de l'intestin, une irradiation abdominale chez le rat ou la souris entraîne une augmentation du rolling et de l'adhésion ferme des leucocytes, respectivement 2h et 6h après irradiation, au niveau des veinules mésentériques (Molla et al., 2001; Panés et al., 1995). De plus, l'exposition d'une anse iléale à une irradiation forte dose chez la souris permet d'observer une augmentation du rolling et de l'adhésion ferme des leucocytes 2h et 48h après irradiation au niveau des veinules iléales post-capillaire (Johnson et al., 2004). Des résultats similaires ont également été obtenus dans

des modèles d'irradiation cutanée (Holler et al., 2009) et cérébrale (Gaber et al., 2004) chez la souris. Ces résultats suggèrent donc une augmentation de l'adhésion des leucocytes très précoce, dans les premières heures qui suivent l'irradiation avant de retourner à un niveau basal 48h plus tard. Or, l'augmentation du rolling et de l'adhésion ferme observée 15 jours après une irradiation abdominale chez la souris (Molla et al., 2003) et 28 jours après une irradiation cutanée, toujours chez la souris (Holler et al., 2009; Molla et al., 2003), semble suggérer l'existence d'une deuxième vague d'adhésion radio-induite des leucocytes au niveau des vaisseaux. Cette deuxième vague, plus tardive, pourrait expliquer le recrutement chronique des leucocytes dans les tissus après irradiation.

L'exposition aux rayonnements ionisants entraîne l'apparition d'un infiltrat inflammatoire tissulaire au niveau des zones lésées, lié à l'augmentation de l'adhésion des leucocytes sur les cellules endothéliales irradiées. Cet infiltrat a été observé dès 6h au niveau de l'intestin après irradiation abdominale forte dose chez le rat (Panés et al., 1995). De plus, le marquage MPO réalisé après irradiation colorectale de 22.5 Gy, toujours chez le rat, montre un infiltrat principalement composé de polynucléaires neutrophiles, qui persiste 6 jours après irradiation (Ikeda et al., 2000). La présence de leucocytes dans les tissus a également pu être mise en évidence à des temps plus tardifs, 35 jours et 5 semaines après irradiation thoracique forte dose chez la souris (Hallahan et Virudachalam, 1997; Hallahan et al., 2002), voir jusqu'à 30 semaines après irradiation rénale forte dose chez la souris, infiltrat dans ce cas précis principalement composé de macrophages (Scharpfenecker et al., 2011). En outre, l'accumulation des leucocytes, notamment autour des vaisseaux, a pu être observée sur différentes biopsies de patients traités par radiothérapie (Handschel et al., 1999; Quarmby et al., 1999), infiltrat qui se compose principalement de neutrophiles, de macrophages, et de LT(CD3) (Baeten et al., 2006).

L'implication des molécules d'adhésion dans les différentes étapes du recrutement des leucocytes a pu être étudiée individuellement grâce à l'utilisation d'anticorps inhibiteurs ou de modèles murins transgéniques. En effet, l'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre ICAM-1 a permis d'identifier son implication dans l'adhésion ferme des cellules U937 sur des HUVEC 24h après irradiation (Hallahan et al., 1996), ainsi que dans l'adhésion précoce des leucocytes à l'endothélium, notamment dans un modèle d'irradiation abdominale chez le rat (Panés et al., 1995). L'utilisation de ces anticorps bloquants dans un modèle d'irradiation abdominale chez la souris a de surcroît permis d'identifier le rôle d'ICAM-1 exclusivement

dans l'adhésion ferme des leucocytes en phase inflammatoire aiguë (24h après irradiation), et non chronique (2 semaines après irradiation) (Molla et al., 2003). Cette même étude, toujours par l'utilisation d'anticorps bloquants, a également permis de montrer l'implication de VCAM-1 dans l'adhésion des leucocytes, partiellement en phase inflammatoire aiguë et majoritairement en phase inflammatoire chronique. De la même manière, l'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre PECAM-1 a permis de mettre en évidence son rôle dans l'adhésion ferme de leucocytes sanguins en flux sur une monocouche de cellules endothéliales microvasculaires irradiées (Gaugler et al., 2004), ainsi que dans la transmigration endothéliale de la lignée monocyttaire U937 à travers des HUVEC 72h après irradiation (Quarmby et al., 1999). Enfin, l'utilisation de souris P-Sel $-/-$ dans un modèle d'irradiation abdominale chez la souris a permis de mettre en évidence son rôle dans le rolling, mais pas dans l'adhésion ni la transmigration des leucocytes 12h après irradiation au niveau des veinules mésentériques (Molla et al., 2001). L'ensemble de ces mécanismes, ainsi que l'implication respective des différentes molécules d'adhésion, sont résumés dans la Figure 15.

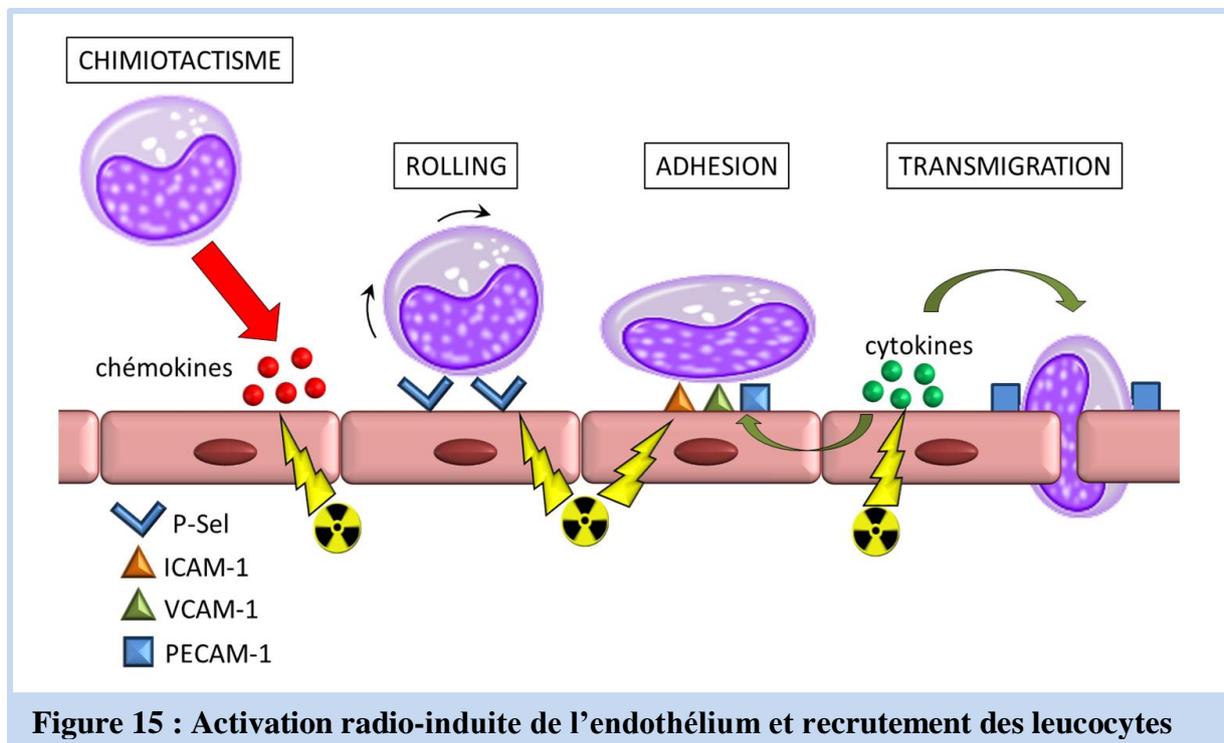


Figure 15 : Activation radio-induite de l'endothélium et recrutement des leucocytes

Au-delà de la surexpression des molécules d'adhésion, les cellules endothéliales irradiées acquièrent un phénotype sécrétoire, qui crée un microenvironnement favorable au recrutement des leucocytes et à l'inflammation (Figure 15). En effet, il a été montré *in vitro* une augmentation de l'expression et de la sécrétion de différentes cytokines et chémokines dans les 24 premières heures qui suivent l'irradiation de cellules endothéliales en culture

(Figure 16). On trouve parmi les cytokines surexprimées l'IL-1 β , le TNF α et l'IL-6 (Blirando et al., 2012; Riquier et al., 2013), qui jouent un rôle crucial dans la phase inflammatoire aiguë, notamment en favorisant l'activation des cellules endothéliales et la formation de l'inflammasome. Parmi les chémokines surexprimées, on note la présence de CCL2 et CXCL12, qui exercent un effet chimiotactique sur les monocytes, ainsi que la présence de l'IL-8, CXCL1 et CXCL2, qui exercent quant à eux un effet chimiotactique sur les neutrophiles (Chang et al., 2009). L'augmentation de l'expression de ces différents médiateurs peut par ailleurs persister une à deux semaines après irradiation (Meeren et al., 1997; Holler et al., 2009). Les études réalisées *in vivo* mettent également en évidence la présence d'une « soupe » inflammatoire dans les tissus irradiés, qui contient entre autre les cytokines et chémokines produites *in vitro* par les cellules endothéliales. Démontrée dans des modèles d'irradiation abdominale et colorectale chez le rongeur, cette surexpression des médiateurs inflammatoires est précoce, de 3h à 3 jours après irradiation (Linard et al., 2004), mais également plus tardive (Blirando et al., 2012). Bien que les cellules endothéliales contribuent à la mise en place de ce contexte inflammatoire, la part respective de l'endothélium, des leucocytes, et des autres types cellulaires présents dans la zone irradiée (fibroblastes, cellules musculaires et musculaires lisses vasculaires notamment) est délicate à évaluer. En outre, les interactions intercellulaires sont capables d'influencer l'expression des médiateurs inflammatoires. Il a notamment été montré au laboratoire un effet synergique de l'irradiation et de l'histamine produite par les mastocytes sur l'expression de l'IL-6, IL-8, CXCL2 et E-Selectin par les cellules endothéliales (Blirando et al., 2011). Ainsi, les cellules endothéliales participent à la mise en place de la réponse immunitaire et inflammatoire qui se développe après irradiation.

Au-delà du recrutement des cellules immunitaires et de l'implication dans le processus inflammatoire, l'activation radio-induite de l'endothélium favorise également l'adhésion des thrombocytes. Ce phénomène a été montré *in vitro* dans un modèle d'adhésion de sang humain en flux sur des cellules endothéliales irradiées, entre 7 et 21 jours après irradiation, et implique la surexpression de PECAM-1 (Gaugler et al., 2004). L'augmentation du rolling et de l'adhésion des thrombocytes a également été montrée par microscopie intravitale 6 et 24h après irradiation abdominale chez la souris, au niveau des veinules intestinales (Mouthon et al., 2003). De plus, on note également l'accumulation de thrombocytes à proximité des vaisseaux, sur des biopsies cutanées de patients traités par radiothérapie (Quarmby et al., 1999). Ainsi, l'exposition aux rayonnements ionisants transforme les cellules endothéliales

quiescentes en surface pro-adhérente pour les thrombocytes, mécanisme qui peut à terme, en association avec l'activation du système de coagulation, conduire à la thrombose.

c. Perte de la thromborésistance : implication du système coagulation/fibrinolyse

L'exposition aux rayonnements ionisants entraîne rapidement une augmentation de la sécrétion de molécules pro-coagulantes par les cellules endothéliales, telles que le TF (Tissue Factor) (Wang et al., 2004), le vWF (von Willebrand Factor) (Jahroudi et al., 1996; Boerma et al., 2004) ainsi que le PAF (Platelet Activating Factor) (McManus et al., 1993) (Figure 16-2 et 3). Cette surexpression, démontrée à la fois *in vitro* et dans des modèles animaux ou chez des patients traités par radiothérapie, débute dans les heures qui suivent l'irradiation, et peut se poursuivre des mois voire des années plus tard. Ainsi, en favorisant la production de fibrine et l'activation thrombocytaire, la surexpression radio-induite de ces molécules favorise l'apparition de thrombus (Amoaku et al., 1992).

Outre la surexpression de facteurs procoagulants, l'irradiation induit également une diminution drastique de l'activité de la thrombomoduline (TM) à la surface des cellules endothéliales (Figure 16-1). La fonction principale de cette glycoprotéine transmembranaire réside dans sa capacité à former des complexes avec la thrombine, et à convertir la fonction procoagulante de cette dernière en fonction anticoagulante. En effet, la thrombine libre catalyse la conversion du fibrinogène en fibrine (Figure 16-2), alors que les complexes TM-thrombine catalysent l'activation de la Protéine C, une sérine protéase qui bloque l'amplification du système de coagulation en inactivant les Facteurs V et VIII (Figure 16-1). La diminution radio-induite de l'expression de la TM a pu être montrée dans un modèle d'entérite radique chez le rat, dès 24h après irradiation, et jusqu'à 26 semaines après irradiation, avec une diminution de 60% de la proportion de vaisseaux exprimant la TM (Wang et al., 2002). Des résultats similaires ont également été obtenus sur des biopsies de patients souffrant d'entérite radique (Richter et al., 1997), ou traités par radiothérapie pour des tumeurs rectales (Richter et al., 1998). Cette inhibition radio-induite de l'expression et de l'activité de la TM trouve son explication dans 3 mécanismes distincts. Tout d'abord, il a été montré que les ROS produits par les rayonnements ionisants entraînent, en association avec la myelopéroxydase, l'oxydation directe du résidu Met388 de la TM, responsable de la diminution de 75 à 90% de son activité (Ross et al., 2008). De plus, des études ont révélé que les cytokines pro inflammatoires, telles que l'IL-1 β , le TNF α et le TGF- β 1 qui sont surexprimées après irradiation, sont capables d'inhiber l'expression de la TM au niveau transcriptionnel, tant dans des modèles cellulaires qu'animaux (Stern et al., 1988; Lentz et al.,

1991; Ohji et al., 1995). Enfin, il a été montré sur des HUVEC et chez la souris que les médiateurs inflammatoires sécrétés après irradiation entraînent le clivage du segment extracellulaire de la TM, et ainsi son relargage vers le sang (Boehme et al., 1996).

Au-delà de son action dans la cascade de coagulation, l'inhibition radio-induite de la TM peut potentiellement influencer la réponse inflammatoire radio-induite (Figure 16-1). En effet, il a été montré dans un modèle de septicémie chez la souris que le domaine Nt extracellulaire de la TM possède des propriétés anti-inflammatoires, notamment en limitant le rolling et l'adhésion des granulocytes sur les cellules endothéliales, mécanisme impliquant la molécules d'adhésion ICAM-1 et le facteur de transcription ERK_{1/2} (Conway et al., 2002). L'inhibition radio-induite de la thrombomoduline limite de surcroît la production de la Protéine C Activée (APC), qui au-delà de ses propriétés anticoagulantes possède elle aussi des propriétés anti-inflammatoires intrinsèques (Figure 16-1). Il a notamment été montré *in vitro* que l'APC est capable de moduler la réponse inflammatoire des monocytes après stimulation par le LPS (Grey et al., 1994; Yuksel et al., 2002). De plus, cette sérine protéase limite également le rolling et l'adhésion des leucocytes dans les artérioles et veinules cutanées dans un modèle de septicémie chez le hamster (Hoffmann et al., 2004).

En inhibant la TM et l'APC, et en induisant la surexpression du TF et du vWF, l'irradiation induit indirectement la surexpression de la thrombine qui est, comme nous l'avons décrit plus haut, l'effecteur principal de la synthèse de fibrine (Figure 16-2). Ce phénomène a été démontré dans un modèle d'entérite radique chez le rat au niveau endothélial et périvasculaire, 2 et 26 semaines après irradiation, en association avec un dépôt conséquent de fibrine (Wang et al., 2004). La présence de thrombine active a également pu être détectée dans des zones extravasculaires, notamment au niveau de la MEC (Figure 16-2), dans les cellules type fibroblastes ou les CML. Cette observation semble corroborée par les travaux menés par Bar-Shavit et al., qui montre que la thrombine, après avoir traversé la monocouche cellules endothéliales, est capable de se lier directement à la MEC, liaison qui la protège de ses principaux inhibiteurs (Bar-Shavit et al., 1989).

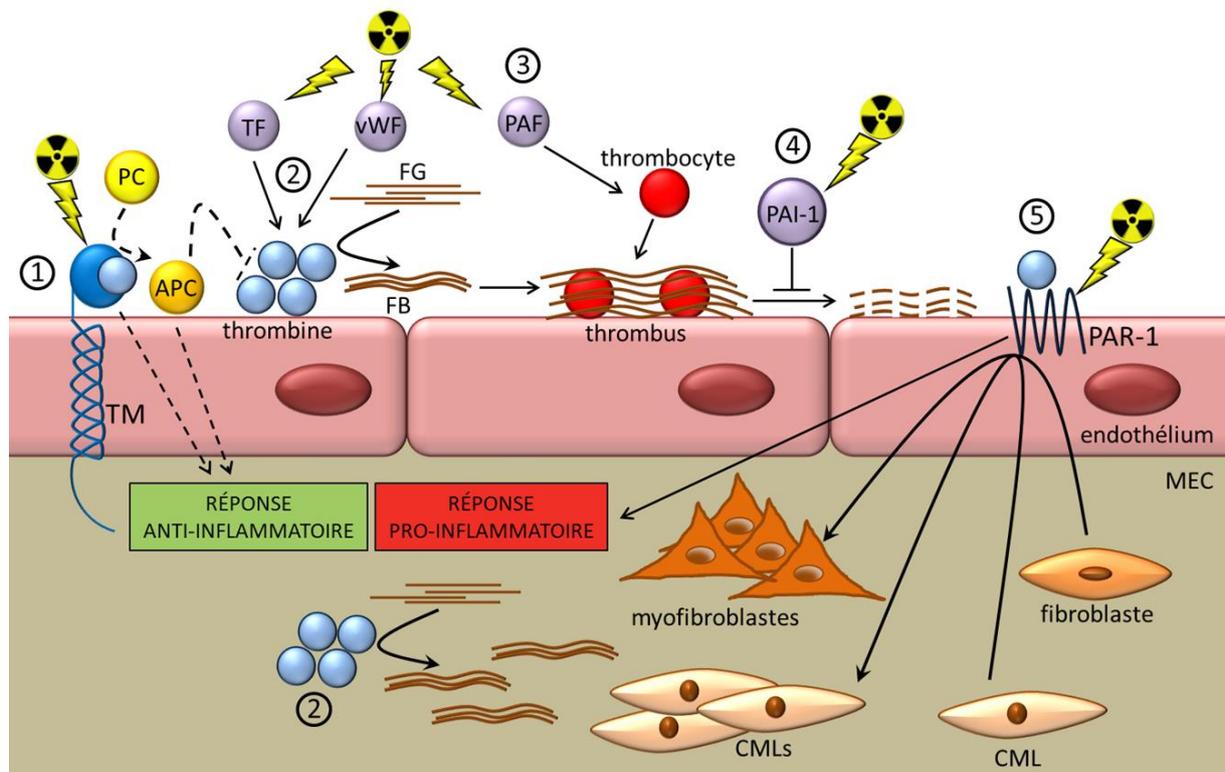


Figure 16 : Représentation schématique de la perte de la thromborésistance radio-induite
FG : fibrinogène : FB : fibrine

La présence de thrombine active dans des tissus mésenchymateux présage de l'implication de cette protéine dans des fonctions autres que la coagulation. En effet, il a été montré que la thrombine possède également des propriétés pro-inflammatoires et profibrosantes, qui sont indépendantes de son activité catalytique, mais passent par sa fixation au récepteur PAR-1 (Protease Activated Receptor-1) (Figure 16-5). Tout d'abord, il a été montré que la thrombine possède une action mitogène et chimiotactique sur des monocytes humains en culture (Bar-Shavit et Wilner, 1986), et qu'elle peut de surcroît induire la production d'IL-8 par des HUVECs, à des concentrations suffisantes pour induire le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles (Ueno et al., 1996). De plus, il a été montré dans un modèle de fibrose pulmonaire chez le rat, ainsi que sur des cultures de fibroblastes humains, que la thrombine est capable d'induire la prolifération des fibroblastes, le dépôt de collagène dans les tissus lésés, l'expression par ces fibroblastes des gènes CTGF et α_1 ProCollagène, ainsi que leur différenciation myofibroblastique (Howell et al., 2001; Bogatkevich et al., 2001) (Figure 16-5). Enfin, il a été montré dans un modèle de lésion vasculaire chez le singe, ainsi que sur des cultures cellulaires humaines et murines, que la thrombine est capable d'induire la prolifération des CMLV, ainsi que la sécrétion de

collagène (Stouffer et al., 1998; Dabbagh et al., 1998) (Figure 16-5). De par ses actions sur les fibroblastes et sur les CML, cette protéine semble ainsi favoriser la mise en place des processus fibrotiques. Ces résultats sont par ailleurs appuyés par la surexpression radio-induite transcriptionnelle et protéique de PAR-1, au niveau des cellules endothéliales mais aussi au niveau des cellules musculaires lisses, après irradiation localisée de l'intestin chez le rat (Wang et al., 2002). A la lumière de ces résultats, la modulation radio-induite des principaux acteurs de la cascade de coagulation semble donc se situer à l'interface avec l'inflammation et la fibrose radio-induite, et pourrait potentiellement constituer un lien entre les atteintes vasculaires précoces et tardives.

Enfin, en plus de l'orientation phénotypique procoagulante des cellules endothéliales irradiées, il a été montré dans différents modèles animaux que les rayonnements ionisants réduisent drastiquement les propriétés fibrinolytiques du sang et des cellules endothéliales (Henderson et al., 1983; Mouthon et al., 2003). Cette diminution de l'activité fibrinolytique peut s'expliquer par la forte surexpression radio-induite de PAI-1 (Figure 16-4), au niveau transcriptionnel et protéique, démontrée à la fois chez des patients souffrant de rectite radique, dans un modèle d'entérite radique chez la souris, ainsi que sur des HUVEC en culture (Milliat et al., 2008). Comme nous le verrons plus en détail dans la partie qui lui est consacrée, la fonction principale de PAI-1 est de s'opposer à l'activation du plasminogène, et donc de limiter la dégradation de la fibrine. Par ailleurs, il est intéressant de constater que l'APC est capable d'inactiver directement PAI-1 (Aoki et al., 2000). L'inhibition radio-induite de l'activation de la protéine C, via l'inhibition de la TM, participe donc indirectement au développement d'un phénotype endothélial antifibrinolytique.

En résumé, l'irradiation entraîne la perte de la thromborésistance des cellules endothéliales, via l'acquisition d'un phénotype procoagulant et anti-fibrinolytique. Par ailleurs, cette perte de la thromborésistance semble potentiellement exacerber les mécanismes pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques mis en place par les rayonnements ionisants.

3) Implication des dysfonctions vasculaires dans le développement des lésions tissulaires radio-induites

L'endothélium vasculaire contrôle de nombreuses fonctions physiologiques, qui sont régulièrement impliquées dans de nombreuses pathologies. Il est donc aisé d'envisager que les effets des rayonnements ionisants sur les cellules endothéliales puissent jouer un rôle clé

dans la pathogénèse des lésions radio-induites. Ce concept, né il y a une cinquantaine d'années (Rubin et Casarett, 1968), tend à être conforté par les nombreux travaux qui montrent que les atteintes vasculaires sont impliquées dans le développement des lésions tissulaires radio-induites, notamment au niveau de l'intestin.

Depuis une quinzaine d'année, un certain nombre d'études ont montré l'implication de la mort radio-induite des cellules endothéliales dans le développement et la sévérité du SGI. La première étude sur le sujet a été publiée par l'équipe de Richard Kolesnick. Cette étude démontre d'une part que les souris *ASPMase* ^{-/-} (qui sont protégées de la mort radio-induite des cellules endothéliales) sont protégées de la mort par SGI après une irradiation TBI de 15Gy. D'autre part, la protection des cellules endothéliales par l'action spécifique du bFGF améliore la survie des cryptes intestinales et des animaux, sans pour autant influencer la mort des cellules souches intestinales (Paris et al., 2001). Ces premiers résultats ont ainsi posé les bases d'un dogme selon lequel la mort radio-induite des cellules endothéliales serait l'évènement initiateur de la mort radio-induite des cellules souches épithéliales et du SGI.

D'autres travaux sont depuis venus étayer cette hypothèse. Il a par exemple été montré que la protection spécifique des cellules endothéliales par une forme recombinante de l'Angiopoïétine-1 prolonge la survie des souris après une irradiation TBI de 15Gy (Cho et al., 2004). Bien que le suivi de la survie des animaux ne soit pas associé à la pratique d'autopsies pour confirmer l'origine de la mort, il a été montré qu'après une irradiation de 15Gy TBI, la quasi-totalité des souris succombent à un SGI (Paris et al., 2001). L'amélioration de la survie des animaux serait donc le reflet d'une protection contre ce syndrome. Un autre exemple de protection pharmacologique des cellules endothéliales concerne l'utilisation d'agonistes du TLR5 chez la souris, exprimé principalement par les entérocytes et les cellules endothéliales au niveau de l'intestin. Dans cette étude, l'utilisation de ces agonistes protège les cellules endothéliales après une irradiation de 15Gy TBI, préservant ainsi la survie des cryptes et de leur capacité de régénération (Burdelya et al., 2008). Cette protection est également associée à un maintien ou une amélioration de la survie des animaux après irradiation, respectivement à 13 et 17Gy TBI, suggérant fortement que la survie des cellules endothéliales protège les souris de la mort par SGI. D'autres travaux, utilisant cette fois des souris déficientes pour Bax ou Bak, démontre que la protection des cellules endothéliales conférée par cette déficience génétique, améliore la survie des cryptes après irradiation de 10 à 16Gy TBI, et protège les animaux de la mort par SGI après une irradiation de 15Gy TBI (Rotolo et al., 2008). Cette

même équipe a par ailleurs obtenu des résultats similaires en utilisant un anticorps monoclonal anti-céramide, qui agit là encore en protégeant spécifiquement les cellules endothéliales (Rotolo et al., 2012). Enfin, il a également été montré que l'utilisation de la sphingosine-1-phosphate protège les souris de la mort par SGI après une irradiation de 15Gy TBI, et préserve en grande partie l'intégrité des cryptes intestinales (Bonnaud et al., 2010). Ces effets ont été associés à l'activation de la voie de survie Akt dans les cellules endothéliales, les protégeant ainsi de la mort radio-induite. Par ailleurs, des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle d'entérite radique chez la souris. En effet, il a été montré que la déficience génétique en PAI-1, qui entraîne des lésions intestinales moins sévères 3 et 14 jours après une irradiation localisée de 19Gy, est associée à une diminution drastique de la mort radio-induite des cellules endothéliales dans les heures qui suivent l'irradiation, via l'activation de la voie de survie Akt (Abderrahmani et al., 2012).

L'ensemble de ces résultats semble donc indiquer que la mort radio-induite des cellules endothéliales joue un rôle clé dans le développement des lésions intestinales radio-induites (Figure 18), et notamment dans le développement du SGI. Cependant, ce concept est régulièrement soumis à débat. D'une part, certains travaux suggèrent que la mort des cellules endothéliales après irradiation n'influence pas le développement du SGI chez la souris (Schuller et al., 2006; Kirsch et al., 2010), voire que l'irradiation, même à très forte dose, n'entraîne pas la mort des cellules endothéliales (Schuller et al., 2007). Cependant, le poids de ces résultats semble limité par des artefacts méthodologiques (absence de greffes de moelle ou d'autopsies pour les travaux de Kirsch et al.) ou techniques (détection immunohistochimique des cellules apoptotiques pour les travaux de Schuller et al.). D'autre part, il a également été montré que la protection spécifique des cellules souches intestinales par R-Spondine-1 (Bhanja et al. 2009) ou par la déficience génétique en PUMA (Qiu et al., 2008) protège également les souris du développement d'un SGI après irradiation TBI. Finalement, quel que soit l'évènement déclencheur, il semble désormais évident que les compartiments épithéliaux et endothéliaux sont l'un comme l'autre impliqués dans le développement des lésions intestinales radio-induites, et qu'une vision intégrée et interdépendante de ces deux compartiments soit la plus proche de la réalité.

Au-delà de leur radiosensibilité, les cellules endothéliales peuvent également influencer l'évolution des lésions tissulaires par leurs modifications phénotypiques, notamment via l'activation radio-induite de l'endothélium. Comme nous l'avons vu,

l'activation des cellules endothéliales après irradiation entraîne le recrutement des cellules immunitaires, ainsi que la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, mécanismes qui font partie intégrante de la pathogénèse des lésions radiques.

En effet, il a été montré dans différents modèles d'irradiation que la modulation de l'infiltrat inflammatoire peut influencer la sévérité des lésions tissulaires. Ainsi, dans un modèle d'irradiation thoracique forte dose chez la souris, la déficience génétique en ICAM-1 entraîne une diminution du recrutement des leucocytes dans le poumon 5 semaines après irradiation, associée à une amélioration des fonctions respiratoires et de la fibrose à des temps plus tardifs (Hallahan et al., 2002). Ces résultats soulignent par ailleurs un lien entre irradiation, cellules endothéliales, inflammation et fibrose. De même, dans le cadre d'un modèle d'irradiation rénale forte dose, la déficience génétique en ALK-1 (Activin receptor-Like Kinase, récepteur au TGB- β 1) entraîne un recrutement leucocytaire dans le rein plus tardif, qui est associé à un retard dans le développement des lésions tissulaires et fibrotiques (Scharpfenecker et al., 2011). De la même manière, l'amélioration des lésions cutanées par la pravastatine après irradiation forte dose chez la souris, est associée à une diminution de la densité de leucocytes dans le tissu, ainsi qu'à une diminution de la surexpression des molécules d'adhésion et des médiateurs pro-inflammatoires (Holler et al., 2009). Bien que ces résultats soient à interpréter avec prudence aux vues des actions pléiotropiques des statines, ils suggèrent là encore que la diminution du chimiotactisme et du recrutement des leucocytes limite les lésions tissulaires radio-induites.

Ce lien entre inflammation et lésions tissulaires a également pu être mis en évidence au niveau de l'intestin. Il a été montré dans un modèle d'entérite radique chez le rat que l'excrétion précoce de GMP (Granulocytes Marker Protein), qui reflète la transmigration des granulocytes dans l'intestin, est statistiquement corrélée au score lésionnel et à la fibrose radique, observés 26 semaines après irradiation (Richter et al., 1997). Là encore, ces résultats soulèvent un lien entre des événements précoces, tels que l'inflammation, et des événements plus tardifs, tels que la fibrose. De la même manière, la déficience génétique en ICAM-1 chez la souris entraîne une diminution du recrutement des leucocytes après une irradiation abdominale de 10Gy, qui est associée à une meilleure régénération de l'épithélium intestinal 2 semaines après irradiation (Molla et al., 2003).

La réponse inflammatoire à l'irradiation, notamment au niveau de l'intestin, peut également jouer un rôle bénéfique dans l'évolution des lésions tissulaires. Il a par exemple été

montré au laboratoire, dans un modèle d'irradiation colorectale forte dose chez la souris, que la déficience en mastocytes est associée à une surexpression de différents médiateurs pro-inflammatoires 3h après irradiation (notamment CXCL2, IL-1 β et TNF α), à un infiltrat de neutrophiles plus fort dans le tissu irradié 2 semaines après irradiation, mais aussi à une diminution du score lésionnel 2 et 26 semaines après irradiation (Blirando et al., 2011). En outre, la déficience génétique en TGIF1 (TG-Interacting Factor 1, répresseur de la voie TGF- β 1/SMAD) sensibilise les souris aux lésions intestinales liées à une irradiation forte dose localisée du grêle (Hneino et al., 2012). Or, cette sensibilisation a été reliée, grâce à une étude menée sur des HUVEC, à une diminution de la réponse inflammatoire aiguë (3h après exposition à une dose de 10Gy), caractérisée notamment par une diminution de la surexpression radio-induite de l'IL-8, IL-6, IL-1 β , CXCL1 et MIP-2. (Hneino et al., 2012). Ainsi, ces travaux mettent une fois de plus en évidence l'existence d'un lien entre inflammation précoce et évolution des lésions tissulaires radiques.

Ces résultats mettent en lumière l'existence d'un équilibre complexe entre les effets bénéfiques et délétères de l'inflammation dans la pathogénèse des lésions radiques. Ces données suggèrent ainsi que l'acquisition d'un phénotype endothélial pro-inflammatoire, qui favorise notamment le recrutement des cellules immunitaires, peut perturber cet équilibre, et ainsi influencer l'évolution des lésions tissulaires.

Enfin, la perte de la thromborésistance des cellules endothéliales après irradiation joue également un rôle dans la pathogénèse des lésions radiques. Tout d'abord, il a été montré dans un modèle d'entérite radique chez le rat, l'existence d'une corrélation positive entre la diminution du nombre de vaisseaux qui ont perdu l'expression de la TM, l'augmentation de l'infiltrat de neutrophiles et la sévérité des lésions fibrotiques, plusieurs semaines après irradiation (Wang et al., 2002). Cette fois encore, on devine l'existence d'un lien entre dysfonction endothéliale, inflammation, et fibrose radique. De la même manière, l'inhibition temporaire et précoce de l'adhésion plaquettaire par le clopidogrel, améliore les phases précoces de l'entérite radique chez le rat en limitant le développement des lésions tissulaires, l'infiltrat de neutrophiles, et le dépôt de collagène III 2 semaines après irradiation (Wang et al., 2002).

Comme nous l'avons préalablement décrit, une autre composante de la perte de la thromborésistance est l'augmentation de l'activité de la thrombine, qui est associée à une augmentation du dépôt de fibrine dans l'ensemble du tissu intestinal après irradiation localisée

chez le rat (Wang et al., 2004). La thrombine, en association avec PAR-1, peut de surcroît influencer la mise en place de la fibrose radique, notamment par ses effets sur le processus inflammatoire, sur les fibroblastes, et sur les CML. Par ailleurs, il a été montré que le blocage pharmacologique de ce récepteur dans un modèle d'irradiation localisée du grêle chez le rat, entraîne une amélioration des lésions radiques 2 semaines après irradiation, caractérisée notamment par une diminution du score lésionnel, de l'infiltrat de neutrophiles, et du dépôt de collagène III (Wang et al., 2013). Les auteurs indiquent que la déficience génétique en PAR-1 dans un modèle d'entérite radique, cette fois chez la souris, entraîne une amélioration significative de différents paramètres de la pathologie, également en phase chronique. Ces quelques études démontrent ainsi que la perte de la thromborésistance par les cellules endothéliales exerce une action délétère sur l'évolution des lésions radiques, notamment au niveau de l'intestin.

Il ressort de l'ensemble des études décrites une forte interconnexion entre les différents paramètres de la dysfonction endothéliale radio-induite. Ainsi, l'acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire et pro-thrombotique, qui se perpétue dans le temps, apparaît comme le point de départ d'un cercle vicieux potentiellement responsable du développement progressif de la fibrose radique (Figure 17). Dans ce contexte, l'endothélium apparaît comme le dénominateur commun de l'ensemble de ces mécanismes pathologiques, suggérant implicitement l'existence d'un continuum endothélium-dépendant entre les lésions radiques précoces et chroniques.

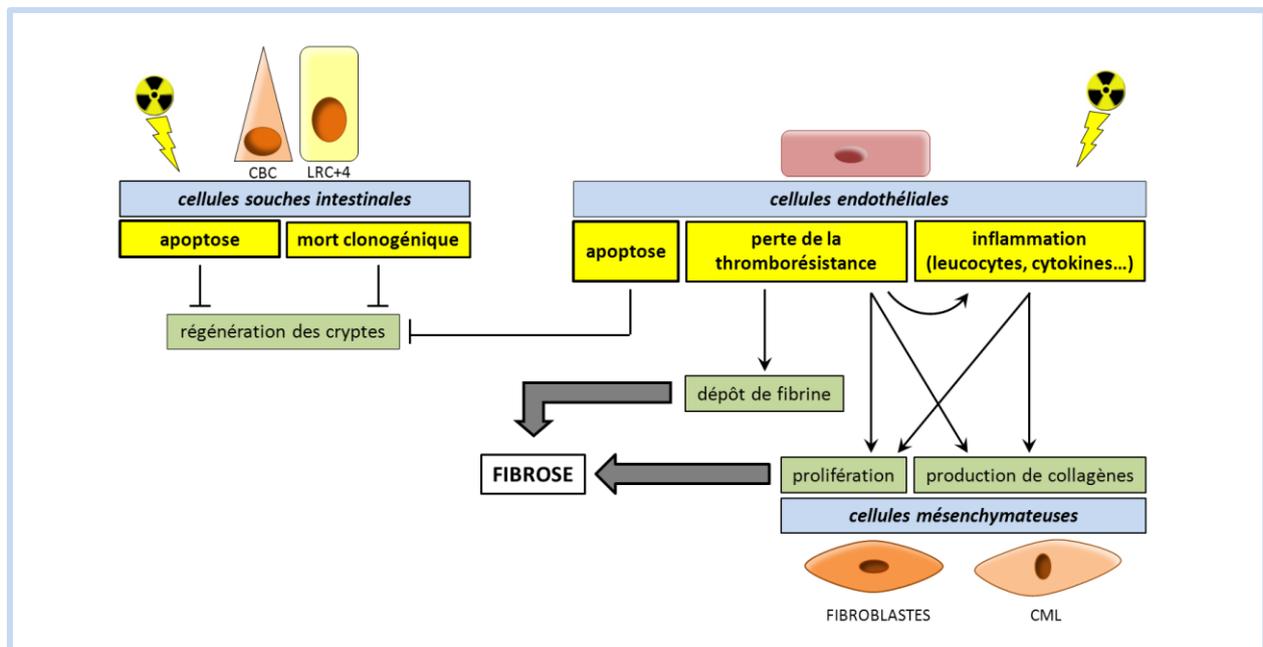


Figure 17 : Implication des cellules endothéliales dans la chronicité de l'entérite radique

Cependant, malgré ce faisceau de preuves, l'existence d'un tel lien n'a pas encore été formellement démontrée. C'est à cette question que vont tenter de répondre les travaux menés dans mon projet de thèse. Nous avons ainsi adopté une stratégie visant à étudier les conséquences de la modification phénotypique de l'endothélium sur le développement de l'entérite radique chez la souris. Comme nous allons le voir, PAI-1 apparaît comme l'outil moléculaire idéal pour mener à bien ce projet.

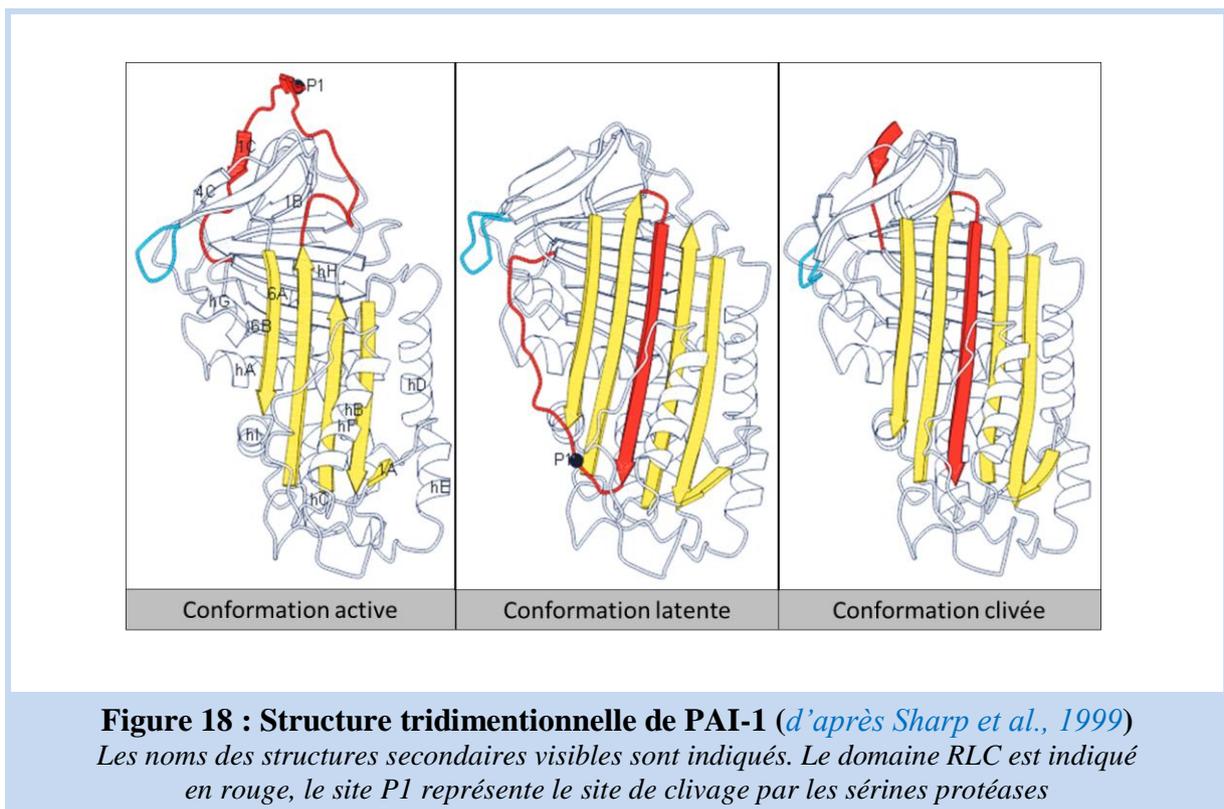
IV. L'inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1 : PAI-1

1) Généralités

Le Plasminogen Activator Inhibitor-type 1 (PAI-1) appartient à la famille des **SER**ine **Pro**tease **IN**hibitors (SERPINS). Cette glycoprotéine d'environ 50kDa, codée par le gène *SERPINE1* localisé sur le chromosome 7q21.3-q22 chez l'homme, et le chromosome 5G2.5 chez la souris, se compose de 3 feuillets β et 9 hélices α (Figure 18). Elle présente 2 domaines fonctionnels hautement conservés entre les différentes SERPINS : un domaine de liaison à son cofacteur, la vitronectine (VN) (Zhou et al., 2003), présente dans le plasma et la MEC, et un domaine RCL (Reactive Center Loop), nécessaire à son activité inhibitrice. En effet, les protéases cibles de PAI-1 reconnaissent son domaine RCL comme un substrat et le clivent, entraînant ainsi un réarrangement conformationnel responsable de la création d'un complexe stable entre l'enzyme et son inhibiteur. Ces complexes sont alors rapidement éliminés au niveau du foie. De ce fait, PAI-1 constitue le principal inhibiteur biologique des serine protéases urokinase-type Plasminogen Activator (u-PA) et tissue-type Plasminogen Activator (t-PA), qui comme nous le verrons par la suite jouent un rôle clé dans le processus de fibrinolyse.

Comme d'autres membres de la famille des SERPINS, cette protéine peut subir différents changements conformationnels, et se retrouve notamment sous forme native, latente, ou clivée (Figure 18). La forme native, qui est biologiquement active, possède une demi-vie dans le plasma d'environ 30mn si elle est libre, 3 à 4h si elle est liée à la VN (Dupont et al., 2009). De plus, elle est capable de subir spontanément le changement conformationnel du domaine RCL pour devenir latente (Lindahl et al., 1989), qui est au même titre que la forme clivée, inactive. D'une demi-vie beaucoup plus courte (7mn), elle peut en revanche se réactiver sous l'action de différents facteurs, ce qui n'est pas le cas de la forme clivée. PAI-1 peut être sécrété par différents types cellulaires, tels que les cellules

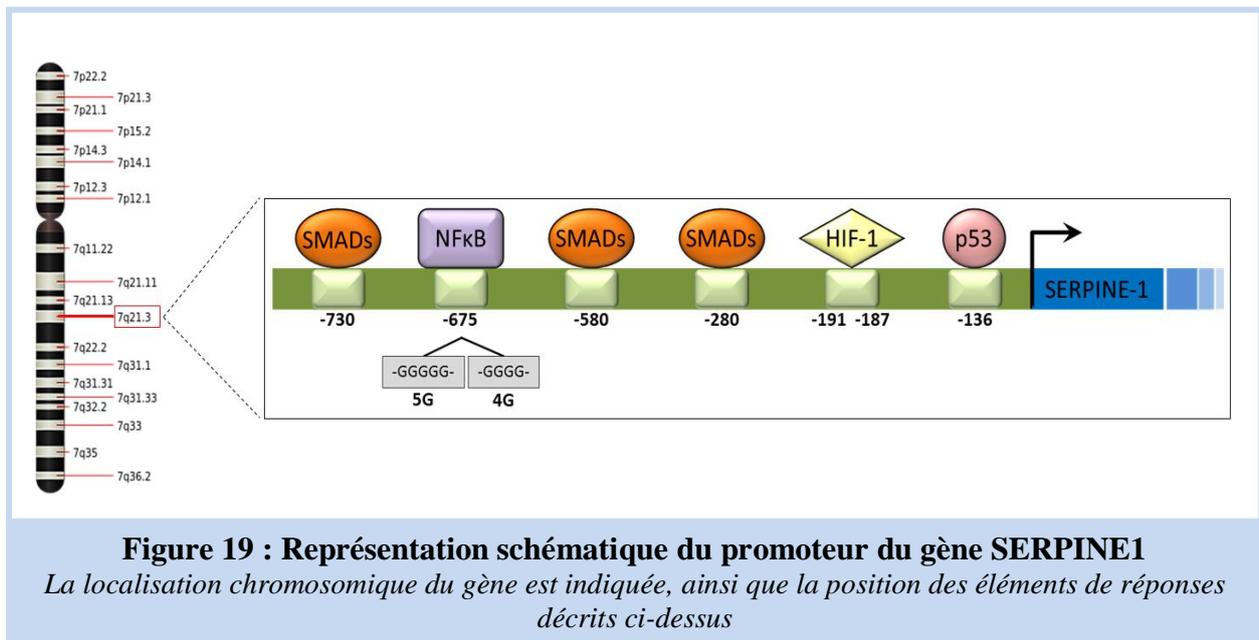
endothéliales, les macrophages, les thrombocytes, et certaines cellules mésenchymateuses comme les fibroblastes ou les CML. Très peu exprimé en conditions physiologiques, tant chez l'homme que chez la souris (10 à 20 ng.mL⁻¹ plasmatique) (Devy et al., 2002; Margaglione et al., 1998), sa synthèse peut cependant être fortement stimulée dans certaines conditions pathologiques où, comme nous le verrons, il joue des rôles biologiques multiples. C'est pourquoi l'expression de PAI-1 est finement régulée au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel par une grande variété de facteurs, notamment les hormones, les cytokines, les facteurs de croissance, ou divers type de stress (notamment le stress hypoxique).



De nombreux facteurs de transcription sont ainsi impliqués dans le contrôle de l'expression de PAI-1, en fonction du type cellulaire et du contexte physiologique ou pathologique concerné. On retrouve parmi eux certains acteurs que nous avons déjà évoqués de par leur implication dans la réponse aux rayonnements ionisants, tels que le TGF- β 1, p53, HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1), ou NF κ B. En effet, il a été découvert dans le promoteur du gène SERPINE1 des éléments de réponse aux protéines SMADs, les CAGA box, situées en positions -280, -580 et -730 (Figure 19) (Dennler et al., 1998). Ces CAGA box sont capables de lier directement SMAD 3 et SMAD 4, et sont responsables de l'induction de la

transcription de PAI-1 par le TGF- β 1. De plus, il a été montré au laboratoire une augmentation de l'expression des protéines SMAD 2 et 3 phosphorylées, au niveau des cellules endothéliales de tissus rectaux provenant de patients traités par radiothérapie (Milliat et al., 2008). Il a par ailleurs été démontré que la liaison des protéines SMAD3/4 aux CAGA box est impliquée dans la transcription de PAI-1 dans les HUVECs après une irradiation de 10Gy, et que cette surexpression radio-induite fait également intervenir un complexe SMAD3/p53. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux publiés antérieurement, qui démontrent l'implication de p53 dans la transcription de PAI-1. D'une part, il a été découvert en position -136 du promoteur de SERPINE1 un élément de réponse à p53 (Figure 19), qui est responsable de l'induction de PAI-1 par un mutagène dans une lignée de fibroblastes embryonnaires murins (Parra et al., 2001). D'autre part, il a été montré que p53 est responsable de l'induction de PAI-1 après exposition de cellules humaines d'hépatocarcinomes à une irradiation de 15Gy, mais également que ce facteur de transcription agit comme co-activateur de l'expression de PAI-1 via la voie TGF-1/SMAD (Hageman et al., 2005). L'utilisation de ces mêmes cellules a également permis de découvrir dans le promoteur de SERPINE1 la présence d'un élément de réponse à l'hétérodimère HIF-1, situé en position -194 à -187, qui est nécessaire et suffisant pour induire l'expression de PAI-1 en condition hypoxique (Figure 19) (Fink et al., 2002).

Enfin, il a été identifié en position -675 l'existence d'un polymorphisme, consistant en l'insertion ou la délétion d'une guanine (respectivement 5G et 4G), dont la répartition dans la population est sensiblement identique (Dawson et al., 1993). Ce polymorphisme semble influencer l'expression de PAI-1 en condition basale ou après stimulation. En effet, la prévalence de l'allèle 4G est plus élevée chez des patients ayant souffert d'un infarctus du myocarde avant 45ans, et est associée à une augmentation significative de l'activité plasmatique de PAI-1 chez ces patients (Dawson et al., 1993; Eriksson et al., 1995). En outre, l'allèle 4G a été associé à une activité basale plus importante du promoteur au regard de l'allèle 5G. Cette différence d'expression semble liée à la fixation différentielle des facteurs de transcription: un facteur activateur sur les allèles 4G et 5G, et un facteur supplémentaire en position 5G qui semble limiter la fixation du facteur activateur par encombrement stérique (P. Eriksson et al. 1995). Ce facteur activateur a ultérieurement été identifié comme NF κ B, dont la fixation en position -664 à -680 (Figure 19) est responsable de l'activation de l'expression de PAI-1 par le TNF α dans des HUVECs (Swiatkowska et al., 2005).



2) PAI-1 et physiologie

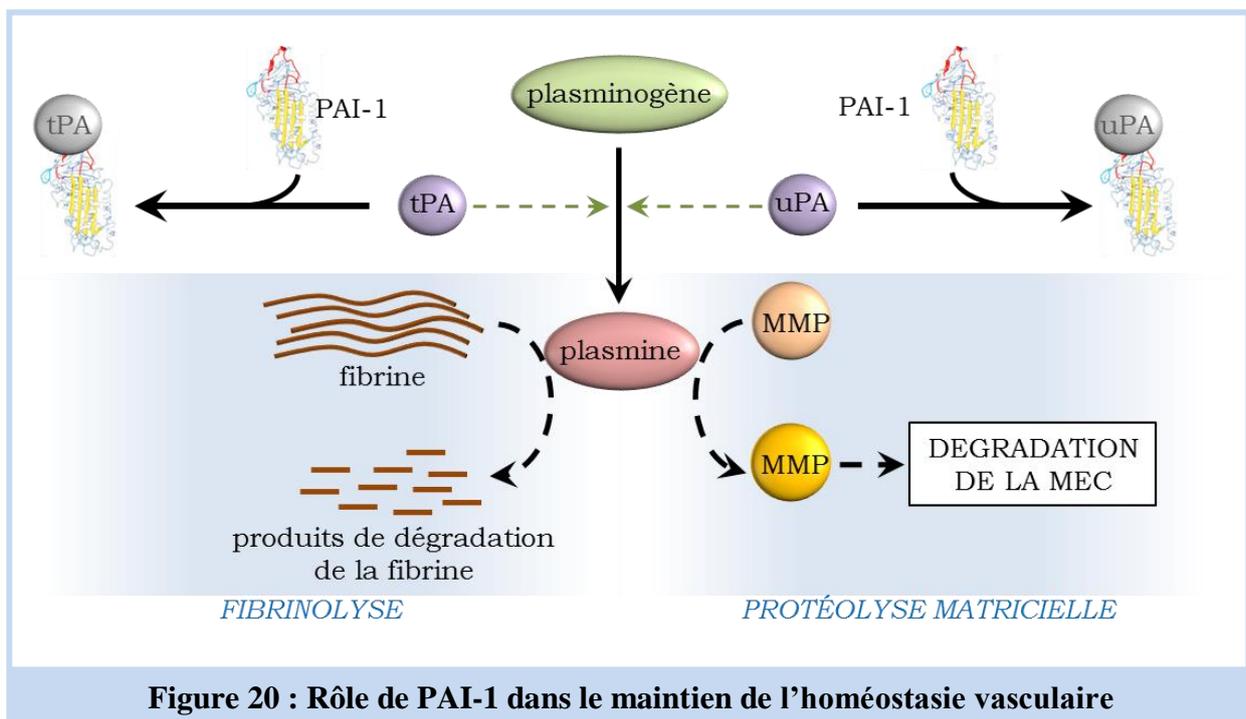
a) Homéostasie vasculaire

Le dépôt de fibrine au niveau de l'endothélium est régi par un équilibre entre sa synthèse et sa dégradation, cette dernière correspondant au processus de fibrinolyse. L'enzyme responsable de la dégradation de la fibrine en produits de dégradation de la fibrine (FDPs) est la plasmine. Cette protéine est sécrétée par le foie sous la forme d'un zymogène, le plasminogène, qui est incorporé au thrombus lors de la phase de coagulation. Sous l'action des activateurs du plasminogène que sont uPA et tPA, le plasminogène est alors clivé en plasmine, qui va alors dégrader la fibrine contenu dans le thrombus, et par conséquent, le thrombus lui-même. La fibrinolyse est un processus finement régulé, qui implique notamment :

- α 2-antiplasmine (α 2-AP) et α 2-macroglobuline, qui inhibent directement la plasmine (Levi et al., 1993)
- Le TAFI (Thrombine-Activable Fibrinolysis Inhibitor), qui est une protéine activée par la thrombine, seule ou complexée à la TM, et qui limite l'activation du plasminogène par différentes actions (Mosnier et al., 2006)
- Les inhibiteurs des activateurs du plasminogène, dont PAI-1, qui est considéré comme le membre le plus spécifique et le plus rapide. (Vaughan et al., 2001). PAI-1 limite donc la fibrinolyse en s'opposant à l'activation du plasminogène, notamment afin de prévenir la dégradation trop précoce des thrombus au cours du processus cicatriciel (Figure 20).

De par son action sur la formation de la plasmine, PAI-1 interagit également avec d'autres systèmes protéolytiques, tels que celui des MetalloProtéinases Matricielles (MMPs), qui sont une famille d'enzymes capables de dégrader la plupart des composants de la MEC (Newby et al., 2005). Sécrétées elles aussi sous forme de zymogènes, elles sont activées dans le milieu extracellulaire par différentes protéinases, dont la plasmine, qui est capable d'activer la plupart des composants de cette famille (MMP-1, 3, 9, 10, 12). De plus, la plasmine possède elle aussi des activités protéolytiques matricielles qui lui sont propres, puisqu'elle est capable de dégrader notamment la fibronectine, la laminine, et le collagène IV (Deryugina et Quigley, 2012). PAI-1 influence donc également de manière indirecte le remodelage matriciel sous l'action des MMPs et de la plasmine (Figure 20).

Ainsi, de par ses actions à l'interface entre les systèmes fibrinolytiques et protéolytiques, PAI-1 joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie vasculaire et tissulaire.



Au-delà de son rôle direct sur la régulation de la fibrinolyse et de la protéolyse matricielle, PAI-1 est également impliqué, par le biais de différents partenaires moléculaires, dans la modulation d'autres fonctions physiologiques, telles que la mort cellulaire, l'adhésion, la migration et la sénescence.

b) Mort cellulaire

Le déclenchement de l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, peut passer par 2 voies de signalisation différentes : **la voie intrinsèque**, qui implique les mitochondries ainsi qu'un ensemble de protéines de la superfamille Bcl-2, et **la voie extrinsèque**, qui implique des récepteurs de mort de la superfamille du TNF au niveau de la membrane plasmique. L'une comme l'autre de ces voies aboutissent à l'activation en cascade de protéines de la famille des cystéine protéases, les caspases. La caspase-3, qui est l'un des membres les plus en aval de cette cascade, est responsable de la mise en œuvre des mécanismes morphologiques et biochimiques de l'apoptose.

La dérégulation du processus apoptotique est un phénomène fréquent dans de nombreuses pathologies. Un certain nombre d'études ont par ailleurs mis en évidence un rôle de PAI-1, fréquemment surexprimé en condition pathologique, dans la modulation de ce mécanisme, tantôt en favorisant, tantôt en inhibant la mort cellulaire. Il a par exemple été montré que PAI-1 exerce un effet anti-apoptotique sur certains types cellulaires, tels que les cellules cancéreuses. En effet, l'ajout ou la présence de PAI-1 dans le milieu de culture ou le milieu extracellulaire, protège les cellules HL-60, PC-3, PC-12, ainsi que des cellules de fibrosarcomes et urothéliales cancéreuses, de l'apoptose spontanée ou induite, notamment par des agents chimiothérapeutiques (Kwaan et al., 2000; Soeda et al., 2001; Lademann et al., 2005; Gomes-Giacoaia et al., 2013). La présence de PAI-1 dans le milieu extracellulaire exerce également un rôle sur la survie *in vivo* et *in vitro* de cellules neuronales (Gabriel et al., 2003), ainsi que sur la survie des fibroblastes/myofibroblastes, là aussi *in vivo* et *in vitro* (Rossignol et al., 2004; Horowitz et al., 2008; Huang et al., 2012; Zhang et al., 2012). En revanche, son action sur les cellules vasculaires, en d'autres termes les cellules endothéliales et les CMLV, semble plus ambiguë. Il a été montré que les CMLV isolées de souris déficientes pour PAI-1 sont plus sensibles à l'apoptose induite par la plasmine (Rossignol et al., 2006), alors que des CMLV surexprimant spécifiquement PAI-1 sont protégées de l'apoptose induite par différents stimuli (Chen et al., 2004). De même, l'ajout de PAI-1 exogène ou la stimulation de sa synthèse par le TGF- β 1, limite l'apoptose des cellules endothéliales induite par la privation de sérum (Kwaan et al., 2000; Higgins et al., 2009), et son inhibition par siRNA entraîne une augmentation de l'apoptose spontanée de HBMEC (Human Brain Microvascular Endothelial Cell) (Bajou et al., 2008). D'autre part, il a également été montré, à contrario, que l'ajout de PAI-1 dans le milieu de culture induit l'apoptose des HUVECs et des CMLV cultivées sur VN (Al-Fakhri et al., 2003), et que des cellules endothéliales isolées d'aortes de souris

déficientes pour PAI-1 présentent une augmentation de l'apoptose spontanée (Balsara et al., 2006). En outre, cette même déficience génétique améliore la survie des cardiomyocytes en condition ischémique chez le rat (Xiang et al., 2005), et celle de pneumocytes de souris exposées à la fumée de cigarette (Shetty et al., 2012). Ces résultats suggèrent donc, cette fois, un rôle pro-apoptotique de PAI-1 sur ces cellules.

Un certain nombre de mécanismes reliant PAI-1 à l'apoptose ont d'ores et déjà pu être mis en évidence. Tout d'abord, il a été montré que PAI-1 est capable de promouvoir l'anoïkis de par sa liaison avec la VN (Figure 21). En effet, la liaison de PAI-1 à son cofacteur inhibe par encombrement stérique la liaison de la VN aux intégrines, mécanisme qui a pu être démontré de différentes manières. D'une part, l'ajout de PAI-1 recombinant dans le milieu de culture favorise l'apoptose spontanée de CMLV humaines si celles-ci sont cultivées sur VN (et non sur fibronectine) (Al-Fakhri et al., 2003). D'autre part, l'utilisation de CMLV isolées à partir de souris déficientes pour la VN a permis de démontrer que l'effet pro-apoptotique de PAI-1 nécessite bien la liaison avec son cofacteur (Wu et al., 2009).

L'effet pro-apoptotique de PAI-1 peut également passer par la modulation des voies de survie. Il a par exemple été montré dans un modèle murin que l'exposition au tabagisme passif entraîne une diminution de la phosphorylation du facteur Akt lié à l'activation de son inhibiteur PTEN dans les pneumocytes de type II. Cette diminution de l'activation de la voie de survie Akt s'accompagne entre autre d'une augmentation de l'expression des facteurs pro-apoptotiques Bax et Bak, et d'une augmentation de l'activation des caspase-8 et 10. Ces effets sont inhibés par la déficience génétique en PAI-1, suggérant que celui-ci est capable d'inhiber la voie de survie PI3K/Akt (Figure 21), et d'induire l'apoptose des pneumocytes par les voies intrinsèques et extrinsèques (Shetty et al., 2012). Cette inhibition de la voie PI3K/Akt par PAI-1 a également été démontrée par la culture de cellules endothéliales isolées à partir d'aortes de souris déficientes pour PAI-1, qui présentent une augmentation de la phosphorylation d'Akt liée à une diminution de la phosphorylation de PTEN. Cette activation d'Akt s'accompagne d'une diminution du clivage des caspase-9 et 3, montrant là encore que PAI-1 peut inhiber cette voie de survie, et ainsi favoriser l'apoptose spontanée ou radio-induite des cellules endothéliales (Balsara et al., 2006; Abderrahmani et al., 2012). Il est intéressant de constater que PAI-1 peut également, de manière paradoxale, activer cette voie de survie PI3K/Akt (Figure 22). En effet, il a été montré que des cellules de fibrosarcome pulmonaire provenant de souris déficientes pour PAI-1 présentent une diminution de la

phosphorylation d'Akt, les rendant plus sensibles à l'étoposide (Romer et al., 2008). Cet effet est par ailleurs réversé par la restauration de l'expression de PAI-1 par transfection. Des résultats similaires ont été obtenus par ajout de PAI-1 dans le milieu de culture de neutrophiles murins (Zmijewski et al., 2011), et par l'inhibition de l'expression de PAI-1 par siRNA dans des fibroblastes de poumons fibrotiques de rats (Zhang et al., 2012).

Les travaux de Zhang et al. ont permis de démontrer que PAI-1 peut activer dans ces fibroblastes une autre voie de survie, la voie Erk. L'activation de cette voie a également été mise en évidence dans des cellules endothéliales de rat, où la stimulation de l'expression de PAI-1 par le TGF- β 1 entraîne une augmentation de la phosphorylation de Erk, rendant ces cellules plus résistantes à l'apoptose induite par la privation de sérum (Higgins et al., 2009). De plus, la présence de PAI-1 dans le milieu de culture des cellules tumorales PC-12 entraîne l'activation d'un facteur de croissance neuronal, qui active la voie Erk et limite l'apoptose spontanée de ces cellules nerveuses (Soeda et al., 2001). Ainsi, l'activation ou l'inhibition des voies de survie par PAI-1 représente un autre mécanisme de régulation de la mort cellulaire.

Cette modulation des voies de survie aboutit donc en aval l'activation ou l'inhibition des voies apoptotiques intrinsèques (Soeda et al., 2001) ou extrinsèques (Gomes-Giaccoia et al., 2013), et notamment à une augmentation ou une inhibition du clivage de la caspase-3. Il est intéressant de noter que PAI-1 est également capable d'interagir directement avec cette protéase (Figure 21). Il a notamment été montré que l'apoptose de CMLV surexprimant PAI-1 est inhibée, au moins en partie, par une diminution de l'activation de la caspase-3, qui est liée à une interaction directe avec PAI-1 (Chen et al., 2004).

Enfin, il a été montré que les effets anti-apoptotiques de PAI-1 peuvent également passer par l'inhibition de la génération de la plasmine, qui exerce elle-même des effets pro-apoptotiques (Figure 21). En effet, les CMLV isolées à partir de souris déficientes pour PAI-1 sont capables d'activer deux fois plus rapidement le plasminogène à leur surface, et présentent en parallèle une induction de l'anoïkis deux fois plus rapide comparées aux CMLV isolées à partir de souris contrôles (Rossignol et al., 2006). De plus, la surexpression de PAI-1 par des fibroblastes ovariens de hamster, ou son ajout dans le milieu de culture de fibroblastes embryonnaires humains, limite dans un cas comme dans l'autre la dégradation de la MEC induite par la plasmine, et donc l'anoïkis de ces cellules (Rossignol et al., 2004; Horowitz et al., 2008). En outre, au-delà de son activité protéolytique sur la MEC, il a également été montré que l'inhibition de PAI-1 par siRNA dans les HBMEC favorise l'apoptose spontanée

de ces cellules par augmentation de la génération de plasmine, qui clive alors FasL, et induit l'apoptose par la voie extrinsèque (Bajou et al., 2008).

Il ressort de l'ensemble de ces résultats que les effets de PAI-1 sur la régulation de l'apoptose semblent parfois paradoxaux, voire contradictoires. Cette hétérogénéité provient en fait de la grande diversité des conditions expérimentales, dont certains paramètres apparaissent déterminants. Tout d'abord, le statut cancéreux ou non cancéreux de la cellule semble influencer l'action de PAI-1 sur l'apoptose, puisqu'il apparaît quasi exclusivement anti-apoptotique sur les lignées tumorales, alors que les résultats sont plus mitigés sur les lignées non cancéreuses. Ce concept a par ailleurs été confirmé par l'utilisation de fibroblastes pulmonaires isolés de souris déficientes ou non pour PAI-1, et qui deviennent spontanément tumoraux après un certain nombre de passage en culture (Lademann et al., 2005). Dans cette étude, l'expression de PAI-1 n'influence pas l'apoptose des fibroblastes non cancéreux induite par l'étoposide, alors qu'elle limite la sensibilité des fibroblastes devenus cancéreux. Un autre paramètre qui semble influencer les effets de PAI-1 sur l'apoptose est le support utilisé pour la culture cellulaire. Alors que PAI-1 favorise l'anoïkis des cellules vasculaires cultivées sur VN (Al-Fakhri et al., 2003), ce dernier semble au contraire ne pas influencer, voire inhiber l'apoptose sur ces mêmes cellules cultivées sur plastique ou sur fibronectine (Al-Fakhri et al., 2003; Kwaan et al., 2000). Cependant, ces paramètres n'expliquent pas à eux seuls l'hétérogénéité des résultats obtenus, notamment au niveau des cellules endothéliales, et il est important de considérer que l'action de PAI-1 est dépendante du type cellulaire, du tissu et contexte physiopathologique.

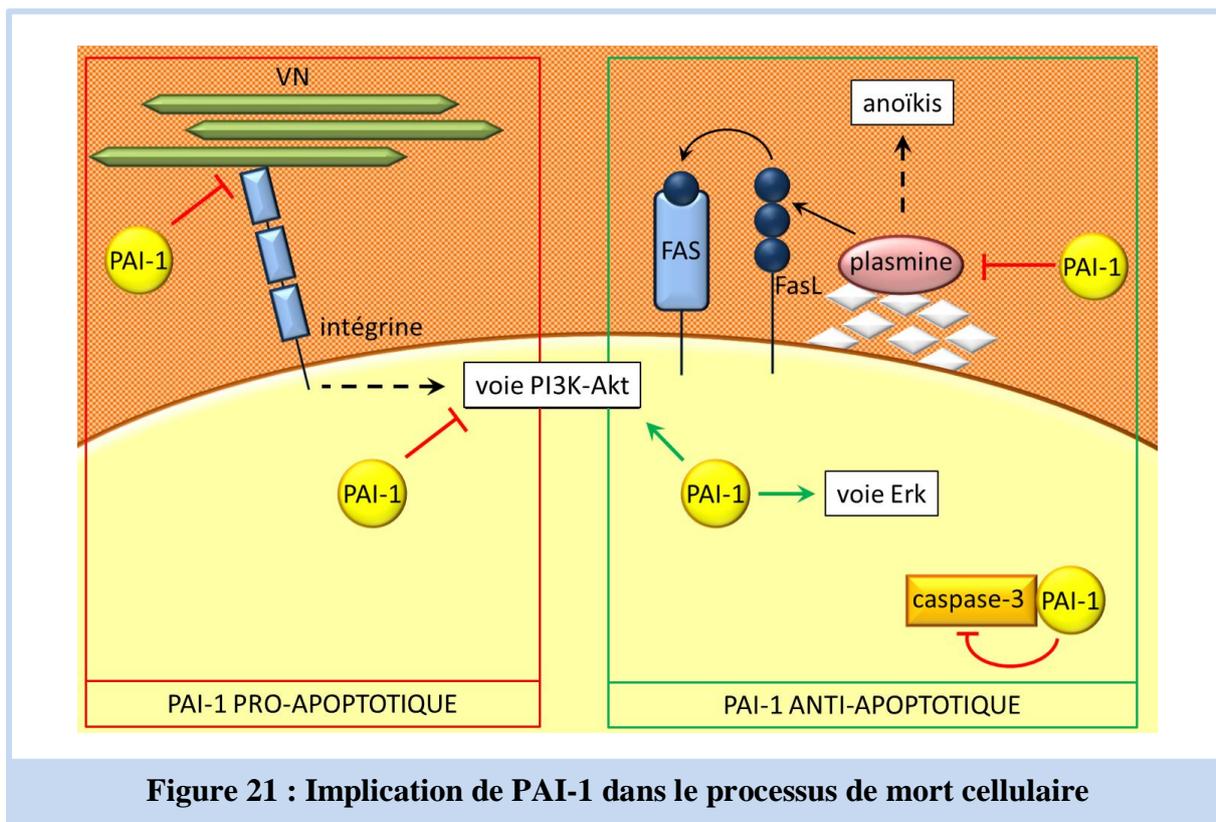


Figure 21 : Implication de PAI-1 dans le processus de mort cellulaire

c) Adhésion et migration cellulaire

La capacité d'une cellule à effectuer des mouvements spontanés ou réactionnels, également appelée motilité cellulaire, intervient dans de nombreux processus physiologiques tels que le développement embryonnaire, la cicatrisation, l'angiogenèse, ou encore l'inflammation. La motilité cellulaire intervient également dans un certain nombre de processus physiopathologiques, comme par exemple la néoangiogenèse, la métastatisation ou encore la croissance tumorale.

Le processus de migration, qui correspond à la locomotion d'une cellule sur la MEC ou sur d'autres types cellulaires, nécessite une régulation fine des mécanismes d'adhésion et de détachement du substrat. Il a en effet été montré, par une approche transcriptionnelle globale menée après sur un tapis de kératinocytes après un « scratch assay », qu'il existe un contrôle spatio-temporel précis de la protéolyse extracellulaire ainsi que du remodelage matriciel (Fitsialos et al., 2007). Cette régulation semble entre autre nécessaire à l'intégration de la motilité cellulaire dans les mécanismes de réparation tissulaire.

Schématiquement, la migration cellulaire se déroule en plusieurs étapes. La cellule projette en avant des lamellipodes, qui sont des extensions cytoplasmiques contenant notamment des intégrines, qui adhèrent ainsi à leurs substrats situés sur la MEC. Cette

adhésion déclenche une signalisation intracellulaire, qui aboutit à la réorganisation du cytosquelette. Ce point d'adhésion permet ainsi la mobilisation du corps cellulaire vers l'avant. Simultanément, des signaux intracellulaires entraînent le découplage des interactions intégrines/MEC au niveau postérieur de la cellule, notamment grâce au système de protéolyse extracellulaire, qui permet cette dissociation par dégradation de la MEC. On comprend ainsi aisément que PAI-1, qui est le principal inhibiteur physiologique des activateurs du plasminogène, puisse jouer un rôle dans la régulation de ces mécanismes d'adhésion et de migration cellulaire. PAI-1 est en effet capable de se lier aux différents acteurs impliqués dans la motilité cellulaire, tels que la VN, uPA, uPAR ou LRP-1 (Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1).

Tout d'abord, PAI-1 est capable de réguler l'adhésion cellulaire sur la MEC, notamment via sa liaison à la VN. En effet, il a été montré que PAI-1 limite l'adhésion de différents types cellulaires (CML de lapin, cellules amniotiques humaines, lignée HepG2, cellules endothéliales bovines et humaines) sur la VN, et ce en inhibant l'interaction entre cette dernière, présente dans la MEC, et les intégrines $\alpha_v\beta_3$ situées à la surface des cellules (Stefansson et Lawrence, 1996; Kjoller et al., 1997; Isogai et al., 2001; Brandal et al., 2011). Cette propriété de PAI-1 s'explique par la grande proximité de son domaine de liaison à la VN, le domaine somatomedine B (SMB), avec le domaine RGD de celle-ci, qui se lie quant à lui aux intégrines. PAI-1 limite donc la liaison VN/intégrine par encombrement stérique (Deng et al., 2001) (Figure 23)

Outre la liaison VN/intégrines, PAI-1 peut également réguler l'interaction uPAR/VN (Figure 22). En effet, il a été montré que le domaine somatomedine B de la VN contient, en plus du site de liaison à PAI-1, un site de liaison à uPAR, qui chevauche le premier. L'affinité d'uPAR pour la VN étant très nettement inférieure à celle de PAI-1, ce dernier limite donc la liaison uPAR/VN également par encombrement stérique (Deng et al., 2001). De la même manière, l'inhibition de l'interaction entre PAI-1 et son cofacteur par l'utilisation d'aptamère, favorise l'adhésion de cellules cancéreuses du sein sur la VN (Blake et al., 2009).

L'action anti-adhésive de PAI-1 sur la MEC peut également être médiée indépendamment de sa liaison à la VN. Il a été montré sur une lignée humaine de fibrosarcome humaine, que PAI-1 entraîne une inactivation des intégrines de la famille α_v , ainsi qu'une internalisation des complexes PAI-1/uPA/uPAR/intégrines par le récepteur LRP-1 (Figure 22), limitant ainsi l'adhésion de ces cellules sur la VN (Czekay et al., 2003).

Cette capacité à réguler l'adhésion cellulaire, notamment au niveau du système cardiovasculaire, influence par extension les propriétés migratoires de ces cellules, puisque le détachement au substrat fait partie intégrante du processus. Cependant, les résultats obtenus semblent indiquer que l'effet de PAI-1 sur la migration est ambivalent. D'une part, il a été montré que PAI-1 favorise la migration de cellules de neuroblastomes humains d'une surface riche en VN (tumorale) vers une surface riche en fibronectine (stromale), en d'autres termes la métastatisation (Sugiura et al., 1999). De plus, il a été montré que PAI-1 favorise la migration de cellules endothéliales bovines sur fibronectine via les intégrines $\alpha_v\beta_1$ (Isogai et al., 2001). Il favorise également la migration de cellules endothéliales de rétine humaine sur VN en limitant l'expression des intégrines $\alpha_v\beta_3$ à leur surface (Basu et al., 2009). Ces résultats ont également été observés dans un modèle de rétinopathie chez la souris. Ces propriétés pro-migratoires de PAI-1 peuvent trouver différentes explications. Tout d'abord, l'utilisation de différentes lignées cellulaires humaines et murines a permis de montrer que PAI-1, en se liant à LRP-1, active la voie de signalisation Jak/Stat (Figure 22), et ce indépendamment de la nature de la MEC (Degryse et al., 2004). De plus, la liaison de PAI-1 avec les complexes uPA/uPAR/intégrines $\alpha_v\beta_3$ favorise le cycle « détachement-rattachement » à la MEC, et donc la motilité cellulaire (Stefansson et al., 2003). En effet, la clairance d'uPAR et des intégrines par LRP-1 entraîne leur recyclage à l'arrière de la cellule migrante, permettant de réengager la MEC, et donc de favoriser la migration (Herz et Strickland, 2001).

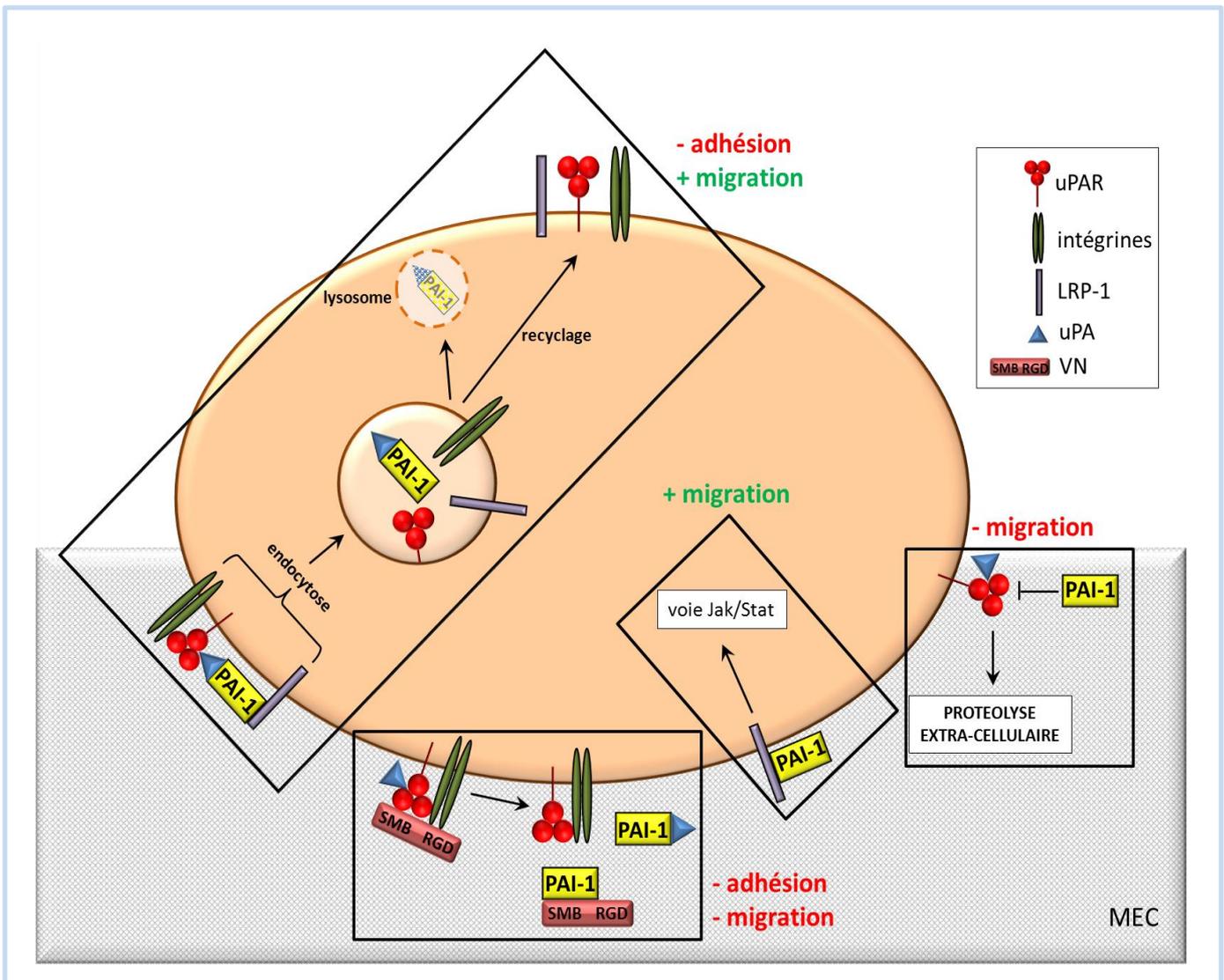


Figure 22 : Interactions moléculaires impliquées dans la régulation de l'adhésion et de la migration cellulaire par PAI-1

D'autre part, il a également été montré que PAI-1 limite la migration des cellules musculaires lisses humaines et de lapin sur VN (Stefansson et Lawrence, 1996; Redmond et al., 2001; Wu et al., 2009), ainsi que leur capacité d'haptotaxisme et de migration sur les cellules endothéliales (Proia et al., 2002; Cullen et al., 2004). De plus, l'inhibition de PAI-1 par la tiplaxtinine restaure la migration des CML humaines sur la VN (Leik et al., 2006). Ces propriétés anti-migratoires ont été attribuées à la capacité de PAI-1 à se lier à la VN, ainsi qu'à sa capacité à limiter la protéolyse extracellulaire en inhibant la production de plasmine, et donc l'activation des MMP plasmine-dépendantes (Figure 22).

L'effet de PAI-1 sur la motilité des cellules du système cardiovasculaire apparaît donc ambivalent. D'une part, il semble dépendre du type cellulaire et des caractéristiques de la MEC impliquées. D'autre part, il semble dépendre de la concentration : il a été montré que

des cellules endothéliales microvasculaires humaines exposées à une faible concentration de PAI-1 (donc plutôt physiologique) acquièrent un phénotype pro-migratoire, alors que ces mêmes cellules exposées cette fois à une forte concentration de PAI-1 (donc plutôt pathologique) acquièrent un phénotype anti-migratoire (McIlroy et al., 2006). Ces résultats ont par ailleurs été confirmés par l'utilisation d'aortes ou de cellules endothéliales provenant de souris déficientes pour PAI-1 (Devy et al., 2002; Ploplis et al., 2004), ainsi que par l'utilisation d'implants sous cutanés de matrigel associés à la tiplaxtinine (Leik et al., 2006).

Le rôle de PAI-1 sur la régulation de la motilité cellulaire s'exerce également dans un contexte inflammatoire, par le contrôle de l'adhésion et de la migration des monocytes, qui est un processus clé notamment dans la résolution de l'inflammation. En effet, il a été proposé par Cao et al. un modèle de mécanisme migratoire des macrophages sur fibrine dans un contexte inflammatoire, grâce à l'utilisation de macrophages péritonéaux de souris déficientes pour différents acteurs du système d'activation du plasminogène. Les tests d'adhésion et de migration réalisés ont permis de mettre en évidence un mécanisme en 5 phases (Figure 23) :

- 1)** Les macrophages activés adhèrent à la fibrine par des complexes tPA/Mac-1 (Macrophage-1 Antigen, faisant partie de la famille des intégrines), et se meuvent en avant. En parallèle, la fibrine située au niveau postérieur de la cellule est dégradée par tPA, permettant d'amorcer le détachement de la MEC.
- 2)** PAI-1 se lie à tPA et LRP-1, formant ainsi des complexes PAI-1/tPA/LRP-1/Mac-1.
- 3)** L'internalisation de ces complexes autorise alors le détachement de la cellule.
- 4)** LRP-1 et Mac-1 sont recyclés à la surface de la cellule.
- 5)** l'arrivée de Mac-1 à l'avant de la cellule migrante permet d'initier un nouveau cycle. Ainsi, par sa liaison à LRP-1, PAI-1 favorise le détachement des macrophages, et donc leur migration sur un support riche en fibrine (Cao et al., 2006). L'implication du couple PAI-1/LRP-1 dans l'adhésion et la migration des macrophages a également été démontrée dans un modèle de migration au niveau péritonéal chez la souris, ainsi que dans un modèle de glomérulonéphrite chez le rat associé à l'utilisation de l'inhibiteur de PAI-1, TM5275 (Ichimura et al., 2013). Dans ces deux modèles, l'inhibition de PAI-1 limite la migration des macrophages *in vivo*, et des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence que l'interaction directe de PAI-1 avec LRP-1 était impliquée dans ce phénomène. De même, il a été montré dans un modèle *in vitro* de migration des THP-1 sur des HUVECs activées par le GlyLDL, que ce dernier stimule la production de PAI-1 par les HUVECs via l'activation des facteurs de transcription HSF1 et p22phox. Cette surexpression stimule alors l'adhésion des THP-1 sur les cellules endothéliales via le complexe PAI-1/LRP-1 (Zhao et al., 2014).

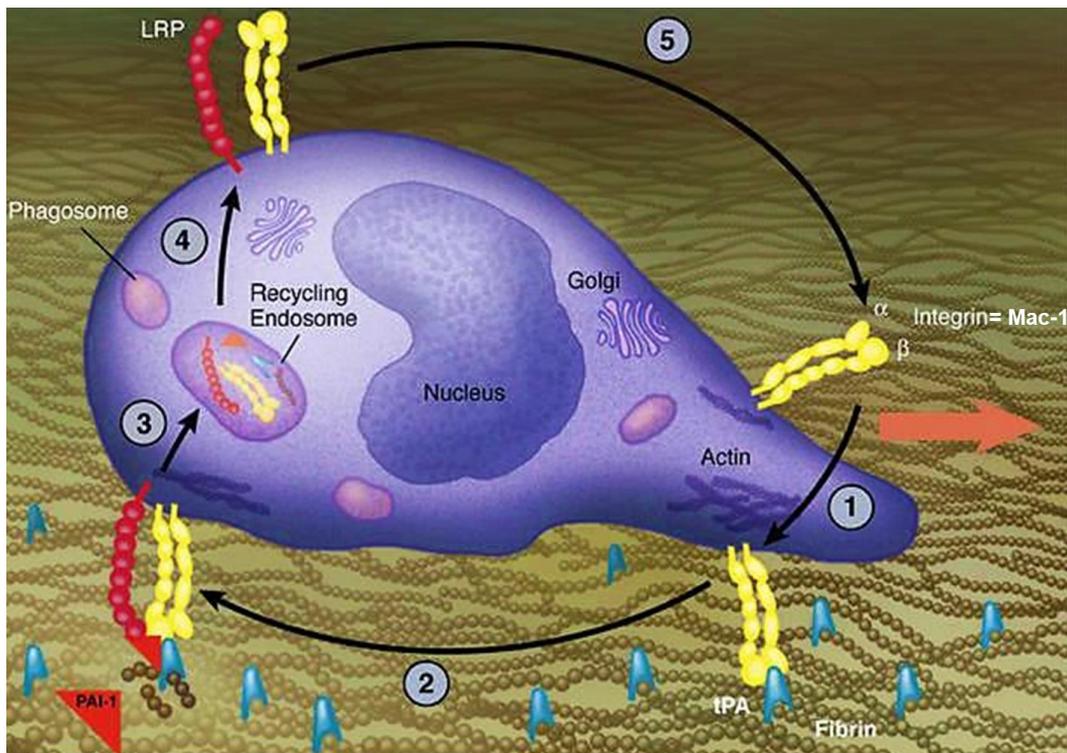


Figure 23 : La migration des macrophages dans un contexte inflammatoire

Le modèle proposé implique un cycle de cinq étapes qui se répète (*d'après Cao et al., 2006*)

D'autre part, il a également été montré que la liaison de PAI-1 à son cofacteur, la VN, peut également réguler l'adhésion et la migration des macrophages, *in vivo* et *in vitro*. En effet, dans un modèle d'atteinte pulmonaire chez la souris ciblée sur les cellules épithéliales alvéolaires de type II, PAI-1 favorise le recrutement des monocytes Ly6C high au niveau du site de lésion (Osterholzer et al., 2012). Bien que l'implication de la VN n'ait pas été montrée directement dans ces travaux, ces derniers peuvent être mis en parallèle avec une étude publiée l'année précédente. Dans un autre modèle de pneumopathie chez la souris, il a été montré que les effets pro-fibrosants de PAI-1, liés entre autre à l'infiltrat des macrophages, impliquent sa capacité à lier la VN (Courey et al., 2011). En outre, il a également été montré *in vitro* par l'utilisation de macrophages humains ou murins, déficients ou non pour uPA, que PAI-1 limite, via son action sur uPA, l'adhésion des macrophages sur la VN, et ainsi favorise leur migration (Fleetwood et al., 2014).

Ainsi, l'ensemble de ces travaux démontre que PAI-1 est un acteur important de la motilité cellulaire, tant au niveau du système cardiovasculaire qu'immunitaire.

d) Sénescence

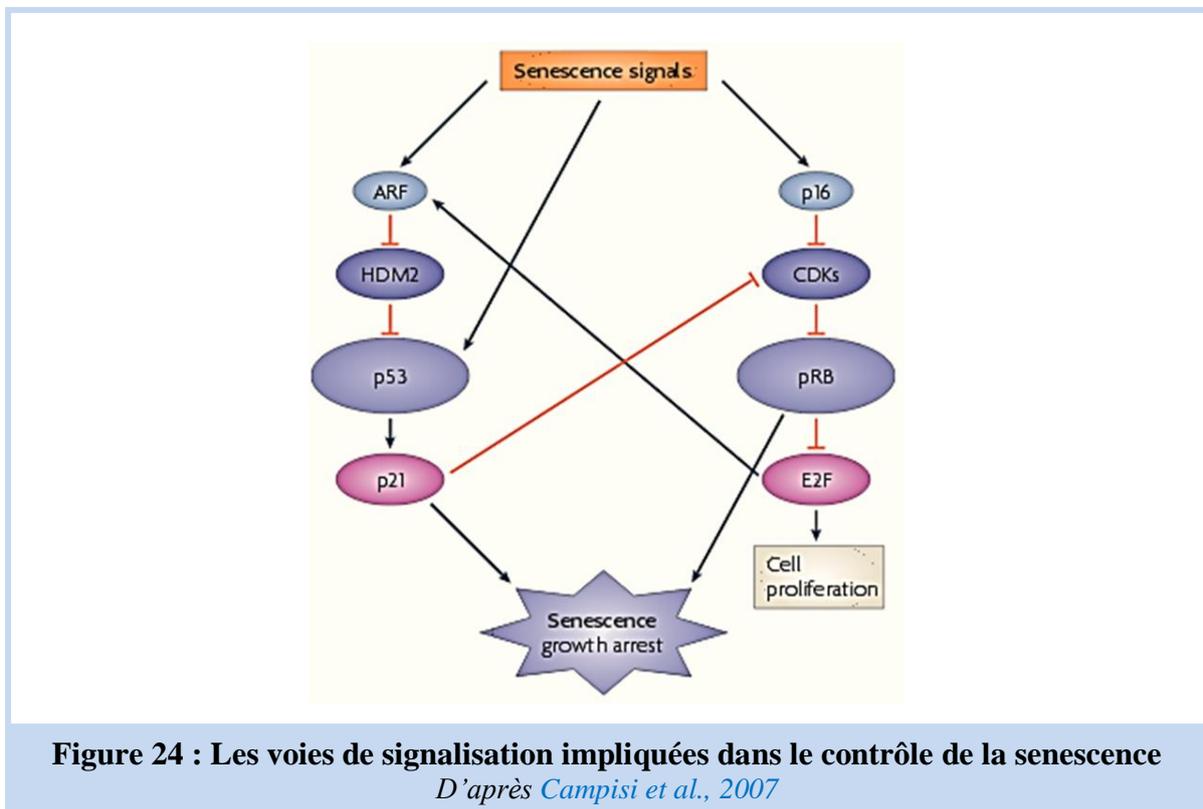
La sénescence est un mécanisme physiologique, qui correspond à la perte des capacités de prolifération cellulaire, quel que soit le stimulus mitogénique. Les cellules sont alors bloquées en phase G1 du cycle cellulaire, mais restent malgré tout viables et métaboliquement actives. Les cellules sénescents présentent un phénotype spécifique qui inclut, en plus de l'arrêt définitif de la prolifération, une morphologie élargie et aplatie, une biogénèse des lysosomes accrue, l'apparition de l'activité β -Gal, une augmentation de l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire, ainsi qu'un raccourcissement des télomères (Campisi et al., 2007; Kuilman et al., 2010). En outre, la sénescence entraîne une altération du profil de synthèse et de sécrétion protéique, avec notamment une augmentation de la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et de régulateurs de croissance. Les protéines sécrétées forment ainsi le SASP (Sénescence-Associated Secretory Phenotype) (Coppé et al., 2010), également appelé SMS (Sénescence Messaging Secretome, Tableau 4) (Kuilman et al., 2009).

COMPOSANT DU SMS	MODÈLES CELLULAIRES	OBSERVÉ <i>IN VIVO</i>
IGF1	musculaires squelettiques (<i>murin</i>)	non
IGF2/IGF2R	fibroblastes (<i>murin</i>)	non
IGFBP3	endothéliales (<i>humain</i>)	oui
IGFBP5	endothéliales (<i>humain</i>)	non
IGFBP7	mélanocytes et fibroblastes (<i>humain</i>)	oui
PAI-1	fibroblastes (<i>humain-murin</i>)	oui
TGF- β	kératinocytes (<i>murin</i>)	oui
WNT2	épithéliales et fibroblastes (<i>humain</i>)	non
IL-1 α	endothéliales et CMLV (<i>humain</i>)	non
IL-6/IL-8	fibroblastes (<i>humain</i>)	oui
CXCR2 binding chemokines	fibroblastes (<i>humain</i>)	oui

Tableau 4 : Composants du SMS, mis en évidence *in vitro* et *in vivo*
D'après Kuilman et al., 2009

L'apparition de la sénescence peut être liée à différents facteurs. **La sénescence répllicative** apparaît lors du maintien prolongé de cellules en culture (Stanulis-Praeger et al., 1987), alors que **la sénescence liée au stress** apparaît lors de l'exposition à différents stress, tels que les lésions à l'ADN, l'induction d'oncogène, ou le stress oxydant (Campisi et al., 2007). D'un point de vue moléculaire, les stimuli initiateurs de la sénescence entraînent l'activation des voies p19-p53-21 et p16 (Figure 24). p21 et p16 sont des inhibiteurs des CDKs (Cycline-Dependant Kinase), et vont de ce fait augmenter l'activation des protéines du rétinoblastome (pRB), et ainsi favoriser la séquestration du facteur de transcription E2F, et

donc la sénescence par arrêt du cycle en phase G1 (Campisi et al., 2007; Lundberg et al., 2000; Sherr et McCormick, 2002). D'un point de vue fonctionnel, la sénescence semble servir de mécanisme de sécurité contre la croissance aberrante ou la transformation oncogénique, et se trouve ainsi impliquée dans les processus de vieillissement et de suppression tumorale. En effet, les cellules cancéreuses sont résistantes à la sénescence grâce à l'expression de la télomérase. Or, les cellules cancéreuses de nombreux tissus deviennent sénescents après traitements chimiothérapeutiques ou radiothérapeutiques (Roninson et al., 2003; Shay et Roninson, 2004). Par exemple, l'exposition de cellules cancéreuses du sein (MCF-7) à la doxorubicine entraîne leur entrée en sénescence, et la mise en contact de leur milieu de culture avec des cellules MCF-7 naïves entraîne le même effet (Di et al., 2008). L'induction et la propagation de la sénescence des cellules cancéreuses semblent donc contribuer à l'activité anticancéreuse des agents chimiothérapeutiques.



Au-delà des voies de signalisation régulant la prolifération et le cycle cellulaire, d'autres systèmes physiologiques sont également touchés par l'entrée en sénescence. Par exemple, il a été montré que le système d'activation du plasminogène est régulièrement impliqué dans l'étiologie des maladies dégénératives liées à l'âge (Dano et al., 1985). Notamment, il existe des corrélations assez fortes entre l'expression de PAI-1 dans le tissu artériel et l'athérosclérose (Schneiderman et al., 1995), entre l'âge des patients, ou la présence

d'une pathologie vasculaire, et l'élévation du taux plasmatique de PAI-1 (Yamamoto et al., 2005), ainsi qu'entre l'âge des patients et l'incidence des maladies cardiovasculaires, dont PAI-1 est par ailleurs un facteur de risque. De plus, les modifications de l'endothélium liées à l'âge ou à la pathologie athérosclérotique, sont assez similaires à celles observées au niveau de cellules endothéliales sénescents en culture (Repin et al., 1984). C'est pourquoi l'existence d'un lien entre l'expression de PAI-1 et le statut sénescents des cellules a été investigué par différentes équipes.

En effet, il a été montré *in vitro* une augmentation de l'expression de PAI-1 dans les HUVECs sénescents en culture, tant au niveau ARN que protéique (Comi et al., 1995). Ces résultats ont pu être confirmés *in vivo*, au niveau du tissu carotidien de patients présentant une plaque d'athérome, qui montre une augmentation de l'expression de PAI-1 au niveau protéique associée à une augmentation de l'expression de p21, en comparaison avec un tissu carotidien sain (Wan et al., 2014). Des résultats similaires ont été obtenus au niveau de la carotide de souris âgées, qui présentent de surcroît une augmentation de la concentration plasmatique de PAI-1 (Wan et al., 2014). L'expression de PAI-1 est également plus élevée chez des fibroblastes humains ou murins sénescents que chez les mêmes fibroblastes jeunes (Mu et Higgins, 1995; Martens et al., 2003; Kortlever et al., 2006), une surexpression qui est liée à p53 (Figure 25). De la même manière, l'exposition de cellules MCF-7 à la doxorubicine pendant 2h entraîne leur sénescence 2 jours après l'exposition, et est associée à une augmentation de la sécrétion de PAI-1 (Elzi et al., 2012). L'exposition de ces cellules à d'autres inducteurs de la sénescence tels que le peroxyde d'hydrogène, l'étoposide, ou les UV, confèrent les mêmes résultats, démontrant que l'induction de l'expression de PAI-1 est un facteur important de la sénescence. De la même manière, ces résultats ont pu être confirmés *in vivo*. Ainsi, il a été montré une augmentation de l'expression de PAI-1 dans les fibroblastes humains en fonction de l'âge des donneurs, ainsi que chez les patients atteints du syndrome de Werner (vieillesse prématurée de l'enfant) (Goldstein et al., 1994). De plus, il a été observé que des fibroblastes prélevés à partir d'escarres présentent une forte proportion de cellules sénescents (environ 50%) comparé à des fibroblastes prélevés en zone saine. En outre, la mise en culture de ces fibroblastes issus d'escarres révèle une arrivée plus précoces de la sénescence, associée à une augmentation de la sécrétion de PAI-1 dans le milieu de culture, en comparaison à des fibroblastes prélevés en zone saine (Vande Berg et al., 2005).

L'ensemble de ces résultats permet donc de considérer PAI-1 comme un marqueur de la sénescence. Cependant, les travaux réalisés sur ce sujet ont permis de déterminer que le rôle de PAI-1 dans la sénescence dépasse celui du simple marqueur. En effet, il a été montré que l'inhibition de l'expression de PAI-1 par ARN interférants dans des fibroblastes humains et murins prévient l'apparition de la sénescence répliquative (Kortlever et al., 2006). De la même manière, l'inhibition de l'expression de PAI-1 par shRNA dans des cellules MCF-7 prévient l'apparition de la sénescence induite par la doxorubicine, alors que l'ajout de PAI-1 recombinant dans le milieu de culture est quant à lui suffisant pour induire la sénescence (Elzi et al., 2012). Le même constat a pu être fait sur les cellules endothéliales. En effet, l'ajout de PAI-1 recombinant dans le milieu de culture d'HUVECs pendant 72h induit la sénescence de 40% d'entre elles, alors que l'ajout de tiplaxtinine dans le milieu de culture induit à contrario une diminution dose-dépendance de la proportion de cellules sénescents (Wan et al., 2014.). Ces résultats démontrent donc que PAI-1 est nécessaire et suffisant à l'induction de la sénescence cellulaire *in vitro*.

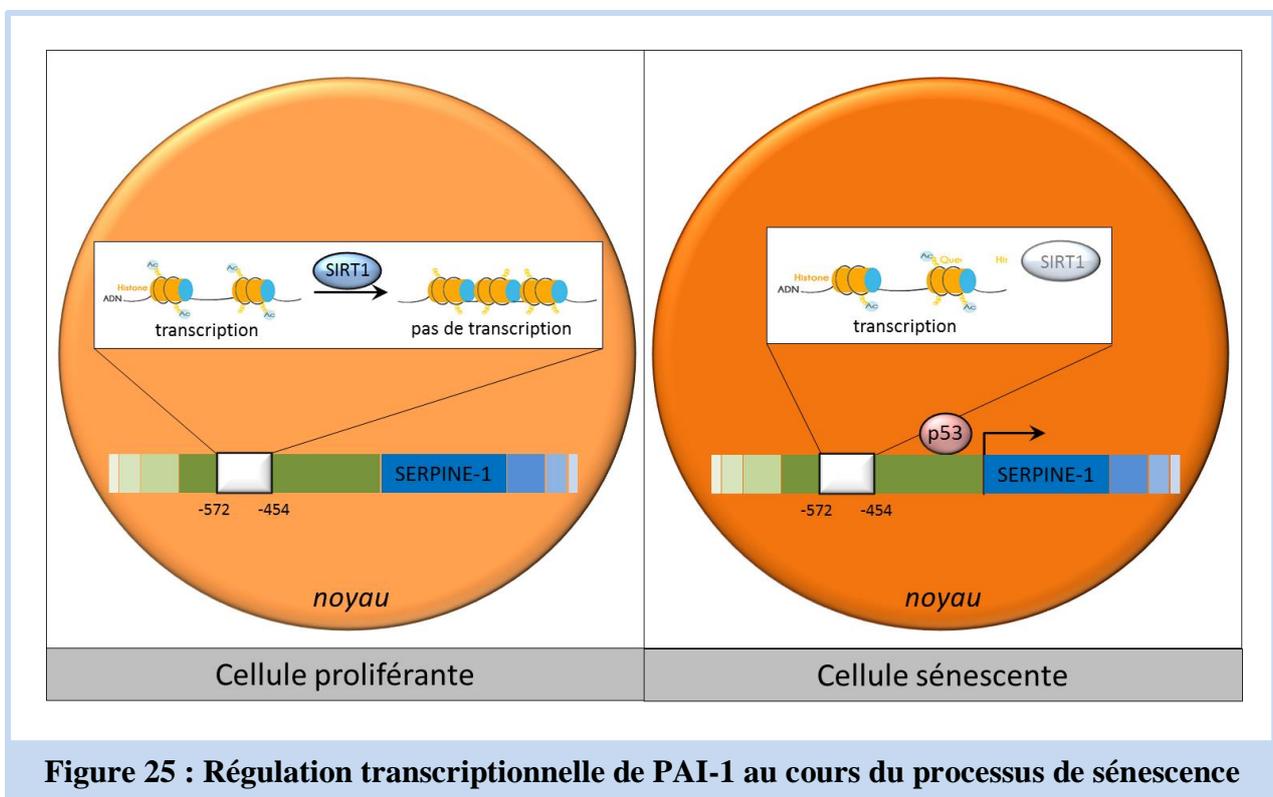


Figure 25 : Régulation transcriptionnelle de PAI-1 au cours du processus de sénescence

Le rôle prépondérant de PAI-1 dans la mise en place de la sénescence a par ailleurs pu être vérifié *in vivo*. D'une part, il a été montré que la sénescence vasculaire induite chez la souris par traitement de 8 semaines au L-NAME pouvait être contrecarrée par le co-traitement de ces animaux avec un inhibiteur de PAI-1. En effet, le TM5441 induit une diminution de

l'expression de p21 dans l'aorte de ces souris, ainsi qu'une diminution du raccourcissement des télomères, établie par mesure de l'ATLR (Average Telomere Length Ratio) par PCR, toujours dans l'aorte (Boe et al., 2013). Ces résultats montrent donc que PAI-1 est un acteur important de la sénescence vasculaire induite par l'inhibition de la synthèse de NO, et renforce l'hypothèse d'un lien entre PAI-1, la sénescence et les maladies cardiovasculaires. D'autre part, il a été montré dans un modèle de vieillissement prématuré chez la souris, que l'inactivation partielle ou totale de PAI-1 entraîne une diminution plasmatique de l'IGFBP3 et de l'IL-6, d'autres marqueurs de la sénescence, ainsi qu'une diminution du raccourcissement des télomères au niveau de différents organes (Eren et al., 2014). Ces résultats placent ainsi PAI-1 comme un acteur important de la sénescence *in vivo*, et démontrent qu'il n'en est pas seulement un marqueur, mais aussi un acteur clé.

Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent le rôle de PAI-1 dans la sénescence cellulaire sont encore peu connus. Cependant, certaines études récentes nous apportent quelques éléments de réponse. Tout d'abord, les travaux de Wan et al. publiés en 2014 ont permis de mettre en évidence l'existence d'une régulation transcriptionnelle de PAI-1 lors du processus de sénescence. Les auteurs se sont intéressés à SIRT1, qui est une histone déacétylase de classe III qui a déjà démontré des propriétés anti-sénescences sur des HUVECs en culture (Ota et al., 2007; Kao et al., 2010). Dans cette étude, ils ont tout d'abord montré que la modulation de l'expression de SIRT1 par transfection adénovirale dans des HUVECs influençait l'induction ou la répression de la sénescence, en association avec une augmentation ou une diminution de l'expression de PAI-1, respectivement. En outre, l'utilisation de souris surexprimant SIRT1 spécifiquement dans les cellules endothéliales a permis la même observation *in vivo*. Le lien de causalité direct entre PAI-1, SIRT1, et l'induction de la sénescence a pu être démontré par la modulation conjointe de l'expression de PAI-1 et de SIRT1 dans des HUVECs, et a révélé une corrélation inverse entre l'expression de SIRT1 et celle de PAI-1, qui a également été vérifiée *in vivo*. En outre, l'immunoprécipitation de la chromatine réalisée sur des HUVECs après différents traitements a permis de démontrer que SIRT1, en se liant au promoteur du gène SERPINE1 en position -572 à -454, limite la présence d'histones acétylés dans cette région, et donc par extension la transcription du gène (Wan et al., 2014). De ce fait, SIRT1 est responsable de la régulation épigénétique de l'expression de PAI-1 dans le processus de sénescence (Figure 25).

Concernant les voies de signalisation impliquées dans la mise en place de la sénescence, il a été montré par transfection de fibroblastes murins avec différents mutants de la voie PI3K/Akt, que la sénescence est associée à une diminution de l'activation de la voie PI3K/Akt/GSK3 β /cycline D1, et que la modulation de cette voie est nécessaire et suffisante à l'induction ou l'inhibition de la sénescence (Kortlever et al., 2006). De plus, l'inhibition de PAI-1 par transfection rétrovirale ou l'ajout de PAI-1 recombinant dans le milieu de culture de fibroblastes humains ont permis de mettre en évidence que l'induction de la sénescence par PAI-1 passait par l'inhibition de cette voie PI3K/Akt (Kortlever et al., 2006). Les auteurs proposent ainsi un modèle qui implique une augmentation de l'expression de PAI-1 via p53, qui va alors limiter l'activation d'uPA. Par un mécanisme impliquant la biodisponibilité des facteurs de croissance (GF, Growth Factor) contenus dans la MEC, cette diminution de l'activité d'uPA entraîne une diminution de l'activation de la voie PI3K/Akt/GSK3 β , qui favorise l'exclusion nucléaire de CDK1. Cette cascade signalétique aboutit alors à la sénescence par blocage de la cellule en phase G1 (Kortlever et al., 2006) (Figure 26).

Dans une autre étude, l'analyse du sécrétome de cellules MCF-7 traitées à la doxorubicine par ICAT (Isotope Coded Affinity Tag) a révélé une augmentation de la sécrétion de l'IGFBP3 (Insulin Growth Factor-Binding Protein 3) par les cellules sénescents. Cette protéine, en formant des complexes avec IGF (Insulin Growth Factor), limite sa liaison à son récepteur IGFR (Insulin Growth Factor Receptor), et ainsi limite la transduction des signaux par ce facteur de croissance. Ainsi, la transfection lentivirale de l'IGFBP3, ou l'ajout de protéines recombinantes dans le milieu de culture des cellules MCF-7, induit leur sénescence, alors que l'inhibition de l'expression de cette protéine par shRNA inhibe la sénescence induite par la doxorubicine. IGFBP3 est donc nécessaire et suffisante à l'induction de la sénescence, et son action passe là encore par la diminution de l'activation de la voie PI3K/Akt. En outre, des tests de transfection réalisés sur des cellules 293T ainsi que des tests de protéolyse *in vitro* ont démontré que PAI-1 protège IGFBP3 de la protéolyse médiée par tPA, favorisant de ce fait la sénescence par un mécanisme impliquant IGFBP3 et la voie de survie PI3K/Akt (Figure 26). En effet, l'inhibition de PAI-1 par shRNA dans des cellules MCF-7 exposées à la doxorubicine entraîne une diminution de la concentration d'IGFBP3 dans le milieu de culture associée à une diminution de la sénescence, alors que l'ajout de PAI-1 recombinant entraîne cette fois une augmentation de la concentration d'IGFBP3 associée à une augmentation de la sénescence (Elzi et al., 2012). Bien que ce ne soit pas le cas dans cette étude, il a été montré que uPA est également capable de dégrader IGFBP3 *in vitro* (Bang et

Fielder, 1997), suggérant que cette serine protéase pourrait de la même manière être impliquée dans ce mécanisme (Figure 26). Cette hypothèse serait par ailleurs tout à fait cohérente avec le modèle établi par Kortlover et al. Ainsi, IGFBP3 apparaît comme une cible critique de PAI-1 dans l'induction de la sénescence.

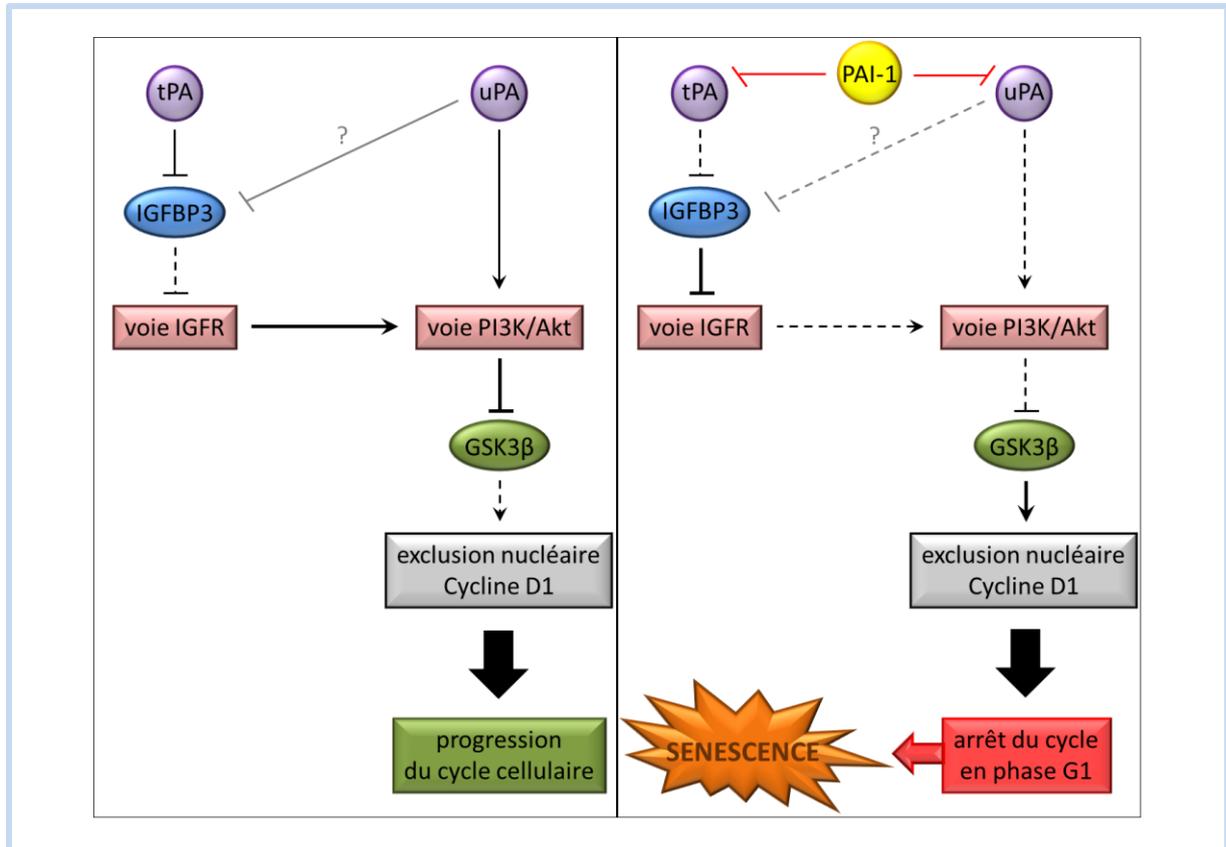


Figure 26 : Implication de PAI-1 dans la régulation du processus de sénescence

Il ressort donc de l'ensemble de ces travaux que PAI-1, en plus d'être un marqueur de la sénescence cellulaire, est également un acteur clé de ce mécanisme physiologique, notamment en modulant l'activation des voies de survie, et donc la progression du cycle cellulaire.

3) PAI-1 et pathologies

Comme nous venons de le voir, bien que PAI-1 soit impliqué dans de nombreux mécanismes physiologiques, son taux plasmatique et son niveau d'expression demeurent faibles chez un individu en bonne santé. On comprend donc que l'augmentation de l'expression de cette protéine soit à la fois marqueur et acteur d'un certain nombre de processus pathologiques.

a) Pathologies non radio-induites

Inflammation. Le sepsis est un syndrome clinique complexe, qui résulte d'une réponse inflammatoire systémique liée à la présence de bactéries ou de produits bactériens dans le sang, et qui implique entre autre l'activation du système de coagulation. Ainsi, l'une des complications les plus courantes est la CIVD (Coagulation IntraVasculaire Disséminée), qui favorise notamment l'évolution vers le syndrome de défaillance multiviscérale. Un certain nombre d'études cliniques ont été menées sur le sujet, et ont montré :

- que les patients souffrant de sepsis lié à un méningocoque (bactérie Gram -) présentent une augmentation du taux plasmatique de PAI-1, qui est positivement corrélé au taux plasmatique de LPS (LipoPolySaccharide) ([Brandtzaeg et al., 1990](#)).

- que le taux plasmatique de PAI-1 augmente fortement au cours du sepsis, de manière concomitante avec la réponse inflammatoire, et fait office de facteur prédictif fiable de son évolution vers le syndrome de défaillance multiviscérale ou l'issue fatale du sepsis ([Mesters et al., 1996](#); [Raaphorst et al., 2001](#)). Cette augmentation du taux plasmatique est fortement corrélée à la sévérité de la CIVD qui peut l'accompagner, et constitue également un facteur prédictif puissant de son issue fatale ou non ([Madoiwa et al., 2006](#)). Il est intéressant de noter que l'augmentation du taux plasmatique de PAI-1 est également observée chez des patients souffrant de pathologies à composante inflammatoire chronique, telles que la microangiopathie thrombotique rénale ([Xu et al., 1996](#)), la maladie de Kawasaki ([Senzaki et al., 2003](#)), ou l'asthme ([Cho et al., 2011](#)).

Le rôle de PAI-1 dans le processus inflammatoire, notamment dans le cadre des sepsis, a donc été investigué grâce à l'utilisation de modèles cellulaires et animaux. Comme chez les patients atteints de sepsis, l'administration de LPS entraîne une augmentation importante du taux plasmatique de PAI-1 quelques heures après injection, chez le rat ou la souris ([Emeis et Kooistra, 1986](#); [Zhang et al., 1997](#)), ainsi qu'une augmentation de l'expression du gène SERPINE1 dans différents tissus chez la souris ([Sawdey et Loskutoff, 1991](#)). De même, l'ajout de LPS dans le milieu de culture de cellules endothéliales humaines ou bovines induit une augmentation transitoire de l'expression de PAI-1 ([Sawdey et al., 1989](#); [Zhang et al., 1997](#)).

L'utilisation d'animaux transgéniques ou d'inhibiteurs de PAI-1 a permis de déterminer que ce dernier n'est pas seulement un marqueur du sepsis, mais joue un rôle dans

l'évolution de la pathologie. En effet, l'inhibiteur oral T686 limite l'hypercoagulation et la mortalité liée à l'injection de LPS chez la souris (Murakami et al., 1997). Ces résultats corroborent les observations faites chez les patients, qui montrent qu'une diminution du taux plasmatique de PAI-1 est associée à une meilleure survie des patients présentant un sepsis sévère (Matsuno et al., 2001; Tani et al., 2001). Cependant, il a également été montré que les souris PAI -/- sont plus sensibles à l'infection par *Klebsiella Pneumoniae* (Gram -), du fait d'une diminution de l'infiltration de neutrophiles dans les poumons (Renckens et al., 2007), alors que la même déficience génétique n'influence pas l'évolution des pneumonies liées à des bactéries Gram + (Rijneveld et al., 2003). Ces résultats démontrent ainsi que le rôle de PAI-1 dans l'inflammation systémique dépend entre autre de la bactériémie, et de la présence ou non d'une coagulopathie.

Le rôle de PAI-1 dans l'évolution de cette pathologie reste à l'heure actuelle assez flou, mais pourrait être lié à la potentialisation du dépôt de fibrine, à la régulation de la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, ou encore au recrutement et/ou à la migration des leucocytes. En effet, il a été montré dans un modèle de souris surexprimant PAI-1, que ce dernier influence la phase précoce de la réponse inflammatoire durant l'endotoxémie en contrôlant le trafic de L_T , notamment des $L_T(CD25^+)$ et des $L_{Tr_{eg}}$ (Poggi et al., 2007).

Au-delà de son implication dans la pathogénèse du sepsis, PAI-1 est également considéré comme une protéine de la phase aiguë, puisque son expression augmente fortement en réponse à différents types de stimuli inflammatoires ou de lésions. En effet, il a été montré que de nombreux médiateurs inflammatoires, tels que le $TNF\alpha$, l' $IL1\beta$ ou l' $IL6$, induisent une forte augmentation de l'expression de PAI-1, au niveau ARN et protéique, et ce dans différents types cellulaires, notamment les cellules endothéliales ou les adipocytes (Kruithof, 2008). Par ailleurs, différentes études suggèrent que les effets du LPS sur l'expression de PAI-1 semblent liés, au moins en partie, au $TNF\alpha$. D'une part, l'injection de LPS à des souris CB6 entraîne une augmentation rapide du taux plasmatique de $TNF\alpha$, alors que le prétraitement de ces animaux avec un antisérum $TNF\alpha$ abolit cette augmentation, ainsi que 50 à 80% de l'activité plasmatique de PAI-1 (Fearn et Loskutoff, 1997). D'autre part, les souris C3H/HeJ, qui présentent un défaut d'expression du $TNF\alpha$ en réponse au LPS, présentent également une diminution de la surexpression de PAI-1 après injection du composant bactérien (Sawdey et Loskutoff, 1991).

Cette augmentation de l'expression de PAI-1 par les médiateurs inflammatoires peut passer par l'activation de différentes voies de signalisation, comme il l'a été montré par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 5.

TNF α		
<i>Cellules endothéliales</i>	NFKB, ERK, PPAR α , p38 MAPK	[Hamaguchi, 2003 – Hou, 2004 Mukai, 2007 – Cao, 2013]
<i>Adipocytes</i>	ERK, PKC	[Pandey, 2005]
<i>Cellules mésangiales</i>	JNK	[Kishida, 2005]
<i>Monocytes</i>	[Ca ²⁺] intracellulaire	[Peiretti, 1996]
IL-6		
<i>Adipocytes</i>	JAK/Stat	[Rega, 2006]
<i>Carcinome hépatocellulaire</i>	JAK/Stat	[Dang, 2007]
IL-1 β		
<i>Carcinome hépatocellulaire</i>	P38 MAPK, JNK, ERK	[Dang, 2007]

Tableau 5 : Voies de signalisation impliquées dans la surexpression de PAI-1 par différents stimuli pro-inflammatoires exogène

Syndrome métabolique. Comme nous venons de le voir, les adipocytes sont capables de synthétiser et de sécréter PAI-1, notamment sous l'influence de stimuli inflammatoires. Ce dernier fait ainsi parti des principales adipokines, qui sont les cytokines synthétisées par le tissu adipeux (Alessi et al., 1997). En effet, un certain nombre d'études portant sur différentes cohortes de patients ont permis d'établir des corrélations positives entre PAI-1 et de nombreuses caractéristiques du syndrome métabolique, telles que les biomarqueurs inflammatoires, l'insulinorésistance, l'hyperglycémie, l'hypercholestérolémie, l'hypertriglycéridémie et l'élévation du taux plasmatique de LDL (Mertens et al., 2005; Lira et al., 2010). De plus, une augmentation du taux plasmatique de PAI-1 est en soit considérée comme une composante du syndrome métabolique (Alessi et Juhan-Vague, 2006). Une augmentation similaire a également pu être observée chez des patients souffrants de diabète de type II (McGill et al., 1994), et les résultats obtenus sur une cohorte de patients sains montrent que cette augmentation du taux plasmatique est prédictive de l'incidence de cette pathologie dans les 5 ans (Festa et al., 2002). Enfin, il a également été établi un fort lien entre le taux plasmatique de PAI-1 et l'IMC (Indice de Masse Corporelle) : celui-ci augmente en cas d'obésité, et diminue en cas de perte de poids (Skurk et Hauner, 2004).

Cette augmentation du taux plasmatique de PAI-1 qui accompagne le syndrome métabolique semble fortement liée à l'augmentation de l'expression de cette protéine par le tissu adipeux, notamment le tissu adipeux viscéral. En effet, il a été montré une induction spécifique de l'expression de PAI-1 dans les adipocytes de patients présentant une obésité (Shimomura, 1996), qui en association avec l'excès de tissu adipeux contribue à l'augmentation du taux plasmatique de PAI-1. De même, les adipocytes isolés à partir de patients obèses sécrètent des taux 2 fois plus élevés de PAI-1 en comparaison avec des adipocytes isolés à partir de patients minces (Eriksson, 1998). En outre, le tissu adipeux viscéral sécrète davantage cette protéine en comparaison aux autres types (Alessi, 1997). De plus, cette sécrétion par le tissu adipeux viscéral est une composante importante de l'augmentation du taux plasmatique de PAI-1, chez des individus obèses ou minces (Mavri, 2001 – Giltary, 1998), et l'existence d'une corrélation entre le tissu adipeux viscéral et la sécrétion de PAI-1 persiste même après ajustement de l'IMC (Sam, 2009).

L'utilisation de modèles animaux a permis de mettre en évidence que cette augmentation de la sécrétion de PAI-1 par le tissu adipeux semble impliquer des facteurs spécifiques, tels que le $TNF\alpha$, le $TGF-\beta 1$, l'insuline, le glucose ou les triglycérides (Loskutoff et Samad, 1998; Gabriely et al., 2002). De plus, l'utilisation de modèles murins reproduisant les symptômes du syndrome métabolique, principalement les souris ob/ob déficientes en leptine ou le régime hyperlipidique, a permis de mieux comprendre le rôle de PAI-1 dans la pathogenèse de cette maladie complexe, bien que les résultats obtenus présentent certaines discordances. En effet, il a été montré que la déficience génétique en PAI-1 chez des souris ob/ob induit une diminution du poids, de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie en comparaison avec des souris ob/ob (Schafer et al., 2003; Ma et al., 2004). En revanche, dans le cadre d'un régime hyperlipidique, les souris PAI-1-/- présentent un développement plus rapide du tissu adipeux en comparaison à des souris sauvages (Morange et al., 2000), alors que les souris surexprimant PAI-1 spécifiquement dans le tissu adipeux présentent à contrario une amélioration des paramètres de prise de poids et d'augmentation du volume de tissu adipeux. Ces effets semblent notamment liés à la modification de la cellularité de ce dernier (Lijnen et al., 2003). Cette discordance des résultats peut trouver des explications dans les origines de l'obésité (génétique ou alimentaire) ainsi que dans le fond génétique des animaux.

PAI-1 pourrait également être impliqué dans le processus d'inflammation chronique du tissu adipeux lié au syndrome métabolique. En effet, il a été montré que l'obésité est

associée à une augmentation de 40% de l'infiltrat de macrophages au niveau du tissu adipeux de souris ob/ob et agouti (Weisberg et al., 2003), ainsi qu'à une modification de la polarisation de ces macrophages vers un phénotype M1 (Lumeng et al., 2007), ces deux mécanismes pouvant être potentiellement imputés à PAI-1.

Il est intéressant de constater que cette protéine pourrait constituer le lien moléculaire entre le syndrome métabolique et les accidents cardiovasculaires, qui surviennent préférentiellement chez les patients souffrant d'obésité ou de diabète. En effet, une augmentation de la concentration de PAI-1 a été observée au niveau du plasma et des plaques d'athérome coronaires de patients souffrant de syndrome métabolique (Zorio et al., 2008), et cette élévation est associée à une augmentation du risque d'accident cardiovasculaire (Anand et al., 2003).

Maladies cardiovasculaires. Ainsi, PAI-1 semble intimement lié aux maladies cardiovasculaires. Parmi elles se trouve l'athérosclérose, qui est l'une des principales atteintes cardiovasculaires dans les pays occidentalisés. L'athérogénèse est un processus pathologique complexe, qui inclut entre autre des lésions vasculaires, une accumulation lipidique accompagnée d'un dépôt de fibrine et de plaquettes, ainsi qu'un infiltrat de macrophages spumeux, autant de mécanismes qui semblent liés à PAI-1. En effet, de nombreuses études menées sur des cohortes de patients ont montré la présence excessive de PAI-1 au niveau des plaques d'athérome, ainsi qu'une augmentation de son expression au niveau des vaisseaux sévèrement touchés, en comparaison à des vaisseaux sains ou modérément atteints (Schneiderman et al., 1992; Lupu et al., 1993; Tipping et al., 1993). De plus, les souris ApoE^{-/-}, qui développent spontanément des plaques d'athérome, présentent un taux plasmatique de PAI-1 trois fois plus élevé en comparaison à des souris sauvages (Schafer et al., 2003). PAI-1 peut potentiellement contribuer au processus d'athérogénèse par plusieurs mécanismes, en relation directe avec les différentes propriétés de la protéine notamment sur l'adhésion et la migration cellulaire. D'une part, PAI-1 peut modifier la cellularité des plaques d'athérome en limitant la migration des CMLV, comme nous l'avons vu par l'inhibition des interactions VN/intégrines $\alpha_v\beta_3$ (Stefansson et Lawrence, 1996). Cette modification du nombre de CMLV au niveau des lésions rendrait ainsi les plaques plus fines, et donc plus susceptibles à la rupture. Cette hypothèse semble par ailleurs confortée *in vivo* par l'utilisation de souris ApoE^{-/-} surexprimant PAI-1 spécifiquement dans les CML. Ces souris, soumises à un régime hyperlipidique, présentent une diminution du nombre de CMLV au niveau des lésions

néointimales, en association avec une diminution de 27% de leur capacité migratoire (Schneider et al., 2004). D'autre part, PAI-1 peut faciliter la migration et l'infiltration des macrophages spumeux au niveau des plaques d'athérome. En effet, comme nous l'avons également vu, PAI-1 peut favoriser la migration des macrophages, notamment sur un substrat inflammatoire riche en fibrine, mécanisme qui implique la formation de complexes Mac1/PAI-1/tPA/LRP-1 (Cao et al., 2006).

Les coagulopathies font également partie des pathologies cardiovasculaires courantes, et conduisent à des phénotypes hémophiles ou au contraire thrombotiques, notamment du fait de la dérégulation de la fibrinolyse. Comme nous l'avons vu au préalable, PAI-1 est l'un des principaux inhibiteurs de l'activation du plasminogène, et entraîne de ce fait une diminution de la dégradation de la fibrine. Il semble donc logique que son absence, ou sa présence en excès, conduise à des saignements anormaux ou des pathologies thrombotiques.

Les mutations du gène SERPINE1 sont des cas très rares chez les patients, et peuvent impliquer la synthèse de protéines dysfonctionnelles (Schleef et al., 1989) ou l'absence de sécrétion de la protéine (Diéval et al., 1991; Lee et al., 1993). Ces mutations conduisent à des saignements anormaux, notamment liés à la chirurgie ou aux menstruations, ainsi qu'à des dysfonctions cicatricielles, de par l'instabilité des clous plaquettaires et les perturbations de l'homéostasie liées à l'augmentation de la fibrinolyse (Diéval et al., 1991; Fay et al., 1997; Ghosh et Vaughan, 2012). Contrairement aux patients, les souris déficientes pour PAI-1 ne présentent ni saignements spontanés, ni saignements excessifs après chirurgie, soulignant de surcroît des différences de régulation de l'homéostasie vasculaire entre l'homme et la souris (Carmeliet et al., 1993).

La thrombose est une pathologie multifactorielle complexe, impliquant à la fois des facteurs environnementaux et génétiques, et qui conduit à la formation spontanée de thrombi. En cas d'occlusions vasculaires, ces thrombi peuvent conduire à des infarctus du myocarde, des accidents vasculaires cérébraux (AVC), ou des thromboses veineuses. Chez les patients, une augmentation du taux plasmatique de PAI-1 a pu être associée à différentes pathologies thrombotiques telles que les thromboses artérielles et veineuses (Yamamoto et al., 2005b; Meltzer et al., 2010), les AVC (Tuttolomondo et al., 2009), les maladies artérielles périphériques (Killewich et al., 1998), les thromboses veineuses profondes (Taberner et al. 1989) ou la CIVD (Pralong et al. 1989).

L'utilisation de modèles animaux semble par ailleurs indiquer un rôle de PAI-1 dans la pathogénèse de la thrombose. D'une part, 90% des souris surexprimant PAI-1 spécifiquement dans la paroi vasculaire développent des thrombi coronariens, qui conduisent à l'occlusion vasculaire (Eren et al., 2002). De la même manière, les souris surexprimant la forme humaine de PAI-1 présentent une hausse de sa concentration plasmatique associée à des thromboses occlusives (Eriksson, 1990). D'autre part, les souris déficientes pour PAI-1 présentent, malgré l'absence de perturbations homéostatiques majeures, une résistance accrue à la thrombose, qu'elle soit induite par lésions photochimiques (Eitzman et al., 2000), injection de chlorure de fer (Konstantinides et al., 2001) ou injection d'endotoxines (Carmeliet et al., 1993). De plus, l'utilisation en parallèle de souris déficientes pour la VN semble indiquer que ces propriétés sont liées à la capacité de liaison de PAI-1 à cette protéine matricielle, qui favoriserait la stabilisation des thrombi et l'occlusion (Eitzman et al., 2000; Konstantinides et al., 2001).

Comme nous venons de le voir, les pathologies thrombotiques peuvent conduire, entre autre, à l'infarctus du myocarde, qui là encore semble étroitement corrélé à l'expression et l'activité de PAI-1. En effet, de nombreuses études épidémiologiques ont montré que l'augmentation du taux plasmatique de PAI-1 est un facteur prédictif du développement d'infarctus (Juhan-Vague et al., 1996; Thøgersen et al., 1998), et est également une caractéristique des patients qui ont survécu à ce type d'accident cardiaque (Vaughan, 2005; Zorio et al., 2008). Dans ce cas, cette augmentation du taux plasmatique de PAI-1 est un marqueur prédictif de récurrence, et de mauvais pronostic à court terme (Vaughan, 2005; Zorio et al., 2008; Collet et al., 2003). De plus, des souris surexprimant PAI-1 spécifiquement au niveau de la paroi vasculaire, développent spontanément des infarctus du myocarde liés à l'âge (Eren et al., 2002), suggérant ainsi qu'au-delà d'être un marqueur, PAI-1 semble également jouer un rôle dans la pathogénèse de ce type d'accident. En outre il a également été montré que PAI-1 joue un rôle dans le développement des fibroses cardiaques, qui sont l'une des principales causes de mortalité liées à une défaillance cardiaque, et font souvent suite à un infarctus du myocarde.

Enfin, comme nous venons également de l'évoquer, la présence de thrombi au niveau des artères cérébrales peut être à l'origine d'ischémies locales, principales causes d'AVC, qui entraînent la perte provisoire ou définitive de certaines fonctions cérébrales, voire le coma ou le décès du patient. L'évolution des lésions cérébrales après un AVC implique de nombreux

paramètres, tels que la thrombose vasculaire, les lésions ischémiques, l'inflammation et la régénération tissulaire, qui sont autant de mécanismes dans lesquels PAI-1 est impliqué. De plus, l'induction chirurgicale d'une ischémie cérébrale permanente chez la souris entraîne une surexpression de PAI-1 24h à 3 jours plus tard, spécifiquement dans les astrocytes (Docagne et al., 1999).

Contrairement au compartiment vasculaire où PAI-1 exerce plutôt un rôle délétère en favorisant la formation et le maintien des thrombi, son effet au niveau cérébral semble plutôt protecteur. Tout d'abord, comme nous l'avons précédemment décrit, PAI-1 exerce un rôle anti-apoptotique sur des cultures neuronales *in vitro* (Soeda et al., 2008). De la même manière, la sécrétion de PAI-1 par les astrocytes semble limiter la nécrose neuronale induite *in vitro* par l'acide *N*-méthyl-D-aspartique (Buisson et al., 1998), ainsi que l'excitotoxicité et la mort neuronale, liées à l'activité de tPA dans le parenchyme cérébral (Benchenane et al., 2004). De plus, une étude récente menée *in vitro* suggère que PAI-1 impacte positivement la barrière hémato-encéphalique en facilitant la fonction de barrière des jonctions serrées des cellules endothéliales (Dohgu et al., 2011).

Ces résultats semblent par ailleurs se retrouver *in vivo*, tant chez les patients que chez les modèles animaux. En effet, les résultats issus d'une méta-analyse semblent indiquer que le polymorphisme 4G chez les patients (qui est associé à une augmentation de l'activité plasmatique de PAI-1) confère une certaine protection contre les AVC ischémiques (Bentley et al., 2010). De plus, dans un modèle d'ischémie cérébrale locale induite par occlusion artérielle chez la souris, la surexpression de PAI-1 limite le volume de l'infarctus en comparaison avec les souris WT (Nagai et al., 2005), alors que la déficience génétique en PAI-1 favorise quant à elle les lésions cérébrales (Nagai et al., 1999). Cependant, lorsque l'ischémie cérébrale est induite par thrombose photochimique, la surexpression de PAI-1 semble cette fois augmenter la taille de l'infarctus, soulignant de ce fait la complexité du rôle de cette protéine dans cette pathologie.

Enfin, l'administration de tPA afin de dissoudre le thrombus est une thérapie régulièrement proposée en cas d'AVC ischémique. Là encore, PAI-1 semble influencer l'évolution de la pathologie soumise à ce type de traitement. D'une part, il a été montré qu'une faible concentration plasmatique de PAI-1 est associée au développement d'hémorragies intracrâniennes symptomatiques consécutives au traitement par tPA (Ribo et

al., 2004). D'autre part, le polymorphisme 4G semble favoriser la ré-occlusion, ainsi qu'une évolution négative des patients traités par tPA (Fernandez-Cadenas et al., 2010).

Fibroses. Il a été observé chez des souris déficientes pour PAI-1 le développement de fibroses cardiaques spontanées chez les animaux âgés (au-delà de 12 mois), associé à une augmentation de l'infiltration des macrophages, de l'activité des MMP 2 et 9, ainsi qu'à l'activation des voies TGF β 1 Smad dépendantes et indépendantes (Moriwaki et al., 2004; Ghosh et al., 2010). Ces résultats, quoique quelque peu surprenants compte tenu de la nature pro-fibrosante de PAI-1, peuvent trouver des explications d'un point de vue moléculaire. Tout d'abord, la déficience en PAI-1 entraîne dès 12 semaines, donc bien avant le développement de la fibrose, une augmentation de la perméabilité microvasculaire, qui semble être à l'origine d'un état inflammatoire local et de la mise en place d'un remodelage matriciel, formant ainsi un environnement propice au développement de la fibrose (Xu et al., 2010). De plus, l'absence d'expression de PAI-1 entraîne en réaction une augmentation de l'activité d'uPA, or il a été montré que la surexpression de cette sérine protéase au niveau des macrophages chez la souris est suffisante pour induire l'infiltration des macrophages et la fibrose au niveau des tissus cardiaques (Moriwaki et al., 2004). Enfin, cette déficience en PAI-1 semble promouvoir la transition endothélium-mésenchyme en réponse au TGF- β 1, conduisant ainsi à une augmentation du nombre de cellules sécrétrices de collagène au niveau du myocarde (Ghosh et al., 2010).

En revanche, et de manière paradoxale, PAI-1 semble cette fois jouer un rôle délétère dans les modèles de fibroses cardiaques induites. En effet, dans un modèle d'infarctus du myocarde induit par ligature des coronaires chez la souris, il a été observé le développement de fibroses périvasculaires associées à une augmentation de l'expression de PAI-1, dont les souris déficientes pour PAI-1 sont protégées (Takeshita et al., 2004). De même, ces souris PAI-1 $-/-$ présentent une diminution de la fibrose périvasculaire induite par le L-NAME, liée à une augmentation de la dégradation du collagène (Kaikita et al., 2001).

Outre la fibrose cardiaque, PAI-1 est impliqué dans de multiples formes de fibroses, notamment au niveau rénal, hépatique ou pulmonaire (Ghosh et Vaughan, 2012). Ainsi, il a été montré dans un certain nombre d'études que l'absence d'expression de PAI-1, par déficience génétique ou inhibition, diminue la sensibilité des souris à la fibrose pulmonaire induite par instillation de bléomycine (Bauman et al., 2010; Eitzman et al., 1996; Hattori et al., 2000), alors qu'à contrario, la surexpression de PAI-1 sensibilise les animaux (Eitzman et

al., 1996). Cette protection liée à la déficience de PAI-1 peut trouver plusieurs explications d'un point de vue moléculaire. Tout d'abord, il a été montré que la transfection de siRNA(PAI-1) dans des cellules épithéliales pulmonaires de souris inhibe la transition épithélium-mésenchyme induite par le TGF- β 1, suggérant que l'inhibition de PAI-1 améliore le processus fibrotique au moins en partie par ce mécanisme (Senoo et al., 2010). Cette protection semble également, au moins en partie, liée à l'augmentation de l'activité de la plasmine. En effet, les souris PAI-1 $-/-$ présentent, en plus d'une diminution de la fibrose induite par la bléomycine, une diminution du dépôt de fibrine au niveau du poumon, or l'inhibition de la plasmine par l'acide tranexamique reverse l'effet protecteur conféré par l'absence d'expression de PAI-1 (Hattori et al., 2000). De même, il a été montré que la plasmine est responsable de l'activation protéolytique de l'HGF (Hepatocyte Growth Factor), qui en retour est responsable de l'augmentation de l'expression de Cox2, et donc de la synthèse de PGE2, médiateur lipidique anti-fibrosant, au niveau des cellules épithéliales alvéolaires (Bauman et al., 2010). Cette hypothèse semble par ailleurs confortée par l'étude de fibroblastes provenant de patients souffrant de fibrose pulmonaire idiopathique, qui sont incapables de stimuler la synthèse de PGE2 en réponse à la plasmine ou au HGF (Bauman et al., 2010).

La fibrose rénale est une conséquence courante de l'hypertension ou du diabète. Bien que très peu exprimé au niveau du rein sain, une surexpression de PAI-1 est observée chez des patients présentant différentes pathologies rénales à composante fibrotique (Hamano et al., 2002; Yamamoto et al., 1996; Xu et al., 1996). De plus, l'utilisation de modèles animaux a permis de renforcer le lien entre PAI-1 et la fibrose rénale. Ainsi, la ligature unilatérale de l'uretère chez la souris entraîne le développement d'une fibrose interstitielle, associée à une augmentation de 8 à 16 fois de l'expression de PAI-1 en comparaison aux reins sains. Or, les souris déficientes pour PAI-1 présentent une diminution de la fibrose associée à une diminution de l'infiltration des macrophages et du nombre de myofibroblastes au niveau des reins (Oda et al., 2001). De la même manière, des souris surexprimant le TGF- β 1 au niveau des reins développent spontanément des fibroses, associées à une augmentation de l'expression de PAI-1 (Clouthier et al., 1997; Krag et al., 2000). Or, la déficience génétique en PAI-1, là encore, limite l'expression des gènes codant les collagènes I et III, ainsi que le dépôt interstitiel de collagène (Krag et al., 2005). Cette dernière étude démontre ainsi que PAI-1 est l'effecteur principal des effets pro-fibrosants du TGF- β 1 au niveau du rein.

La fibrose hépatique est quant à elle une composante de la plupart des maladies chroniques du foie, et là encore PAI-1 semble intimement lié à ce processus. En effet, il a été montré que la surexpression du TGF-1 au niveau du foie chez la souris entraîne, tout comme pour le rein, le développement d'une fibrose hépatique spontanée associée à une augmentation de l'expression de PAI-1 (Clouthier et al., 1997). De la même manière, les modèles de fibrose hépatique chez le rat (ligature des canaux biliaires ou intoxication au Ccl4) sont associés à une augmentation de l'expression de PAI-1 au niveau hépatique (Bueno et al., 2000; García et al., 2002), tandis que les souris déficientes pour PAI-1 sont quant à elles plus résistantes à la fibrose hépatique induite par ligature des canaux biliaires (Wang et al., 2007). Cette protection semble liée à une augmentation de l'activité de tPA, qui en retour active le HGF, anti-fibrosant.

Progression tumorale. PAI-1 est désormais reconnu comme l'un des marqueurs biochimiques les plus informatifs dans le pronostic de différents types de cancers. Pour cause, de nombreuses données cliniques démontrent que la forte expression de PAI-1 détectée au niveau de biopsies tumorales est corrélée à un mauvais pronostic, en terme de survie et de rechute, entre autre pour les cancers du sein (Harbeck et al., 2004), gastriques (Allgayer et al., 2000) et colorectaux (Halankova et al., 2011).

PAI-1 est au cœur de différentes fonctions physiologiques qui peuvent influencer la progression tumorale. Ainsi, PAI-1 peut tout d'abord favoriser la survie des cellules cancéreuses, comme nous l'avons préalablement vu dans la partie consacrée au rôle de PAI-1 dans la régulation de l'apoptose. De plus, la présence ou l'absence de cette protéine dans l'environnement tumoral semble influencer la croissance des tumeurs, bien que les résultats obtenus par l'utilisation de modèles animaux puissent sembler paradoxaux. En effet, il a été montré que des allogreffes ou des xénogreffes de différentes lignées cancéreuses réalisées sur des souris PAI-1 *-/-* présentent une diminution de la croissance tumorale (Bajou et al., 2008; Bajou et al., 1998; Gutierrez et al., 2000). Il a également été montré que la déficience ou la surexpression de PAI-1 est sans effet sur la croissance tumorale, dans des modèles d'allogreffes ou d'induction génétique de tumeurs mammaires chez la souris (Eitzman et al., 1996; Almholt et al., 2003). Finalement, la surexpression de PAI-1 dans des cellules PC-3 greffées chez la souris, inhibe cette fois la croissance tumorale (Soff et al., 1995). Cette disparité des résultats peut s'expliquer, entre autre, par deux paramètres. D'une part, l'origine de la protéine, en d'autres termes sa sécrétion par les cellules stromales ou les cellules

cancéreuses, semble influencer différentiellement la croissance tumorale. D'autre part, PAI-1 joue un rôle central dans la régulation de l'angiogenèse et de la néovascularisation tumorale, qui sont des paramètres clés de la croissance tumorale. En effet, l'implant sous-cutané de matrigel réalisé sur des souris déficientes pour PAI-1 montre une diminution de la néovascularisation en comparaison à des souris sauvages (Lambert et al., 2001). De plus, des tests réalisés *in vitro* à partir d'aortes de souris PAI-1 $-/-$ et sauvages montrent que l'absence de la protéine abolit totalement l'angiogenèse, qui peut être rétablie par ajout exogène de PAI-1 (Devy et al., 2002). Cependant, l'effet pro-angiogénique de PAI-1 s'observe uniquement pour des gammes de concentrations physiologiques, alors que l'ajout de quantités supraphysiologiques exerce cette fois un effet anti-angiogénique. Cette importance de la concentration de PAI-1 dans la régulation de l'angiogenèse tumorale a également pu être observée *in vivo*, par des approches impliquant des animaux transgéniques (Bajou et al., 2001) ou l'utilisation de différents types de mutants (McMahon et al., 2001). Ainsi, ces effets ont été associés à l'activité anti-protéase de la protéine, qui favorise le détachement des cellules endothéliales de la MEC. En outre, comme nous l'avons déjà évoqué, PAI-1 est également capable de limiter l'apoptose des cellules endothéliales en limitant le clivage de FasL par la plasmine (Bajou et al., 2008).

Enfin, comme nous l'avons également vu, PAI-1 peut influencer la métastatisation en régulant l'adhésion et la migration cellulaire, notamment par 3 types d'interactions moléculaires : l'inhibition d'uPA et tPA, la liaison à la VN et la liaison à uPA/uPAR, notamment avec des récepteurs d'endocytose tel que LRP-1 (partie « adhésion et migration cellulaire »).

L'implication de PAI-1 dans les différents processus pathologiques que nous venons de décrire est résumée dans la Figure 27.

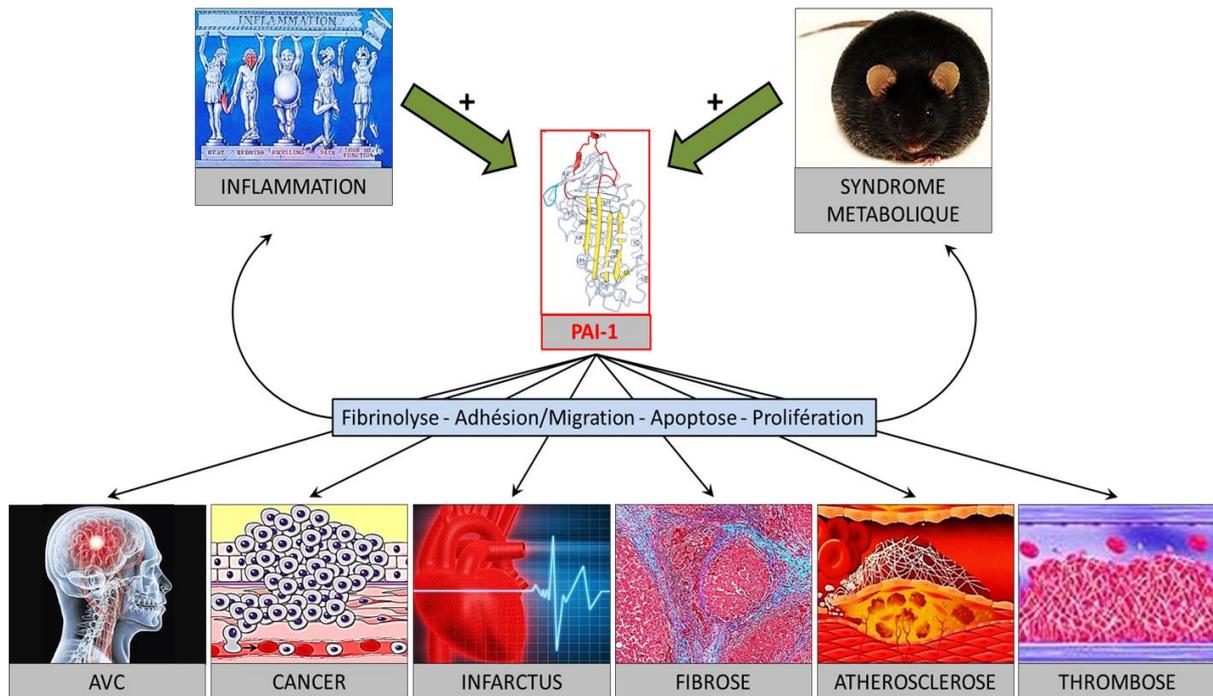


Figure 27 : Représentation schématique de l'implication de PAI-1 dans différentes pathologies

b) Pathologies radio-induites

Un certain nombre de travaux ont permis d'établir un lien entre PAI-1 et les rayonnements ionisants, notamment dans le cadre de l'exposition des tissus sains au cours de traitements radiothérapeutiques. Chez les patients, il a été montré par cDNA array que l'expression de PAI-1 est augmentée chez des patients souffrant d'entérite radique ([Vozenin-Brotons et al., 2004](#)). Il a également été décrit une surexpression de PAI-1 au niveau de la muqueuse rectale après radiothérapie pré-opératoire ([Angenete et al., 2009](#); [Angenete et al., 2009](#)), ainsi qu'au niveau de l'endothélium sur des résections de rectites radiques ou des biopsies cutanées ([Milliat et al., 2008](#); [Ebrahimian et al., 2012](#)) (Figure 28). Cette surexpression radio-induite de PAI-1 se retrouve également par l'utilisation de modèles animaux, au niveau du grêle et du côlon après irradiation abdominale de 10Gy chez le rat ([Strup-Perrot et al., 2005](#); [Strup-Perrot et al., 2006](#)), au niveau des reins après irradiation de 12 ou 16 Gy chez la souris ([Oikawa et al., 1997](#); [Kruse et al., 2009](#)), au niveau du poumon après irradiation thoracique de 16 Gy chez la souris ([Travis et al., 2011](#)), ainsi qu'au niveau de l'endothélium des vaisseaux muqueux du grêle après irradiation localisée de 19 Gy chez la souris ([Milliat et al., 2008](#)) (Figure 28). Cette surexpression, plus ou moins importante en fonction du modèle, semble survenir dans les jours qui suivent l'irradiation, et perdurer

plusieurs semaines. Enfin, l'irradiation de différentes lignées cellulaires, pour des gammes de doses allant de 2 à 20 Gy, conduit également à la surexpression de PAI-1 dans les heures qui suivent l'exposition. Cette observation a été faite sur différents types de cellules endothéliales humaines ou de rat (Milliat et al., 2008; Scharpfenecker et al., 2009; Collins-Underwood et al., 2008), sur des cellules épithéliales rénales de rat (Zhao et al., 2001) ainsi que sur différentes lignées cancéreuses humaines (Schilling et al., 2007; Artman et al., 2010; Hageman et al., 2005).

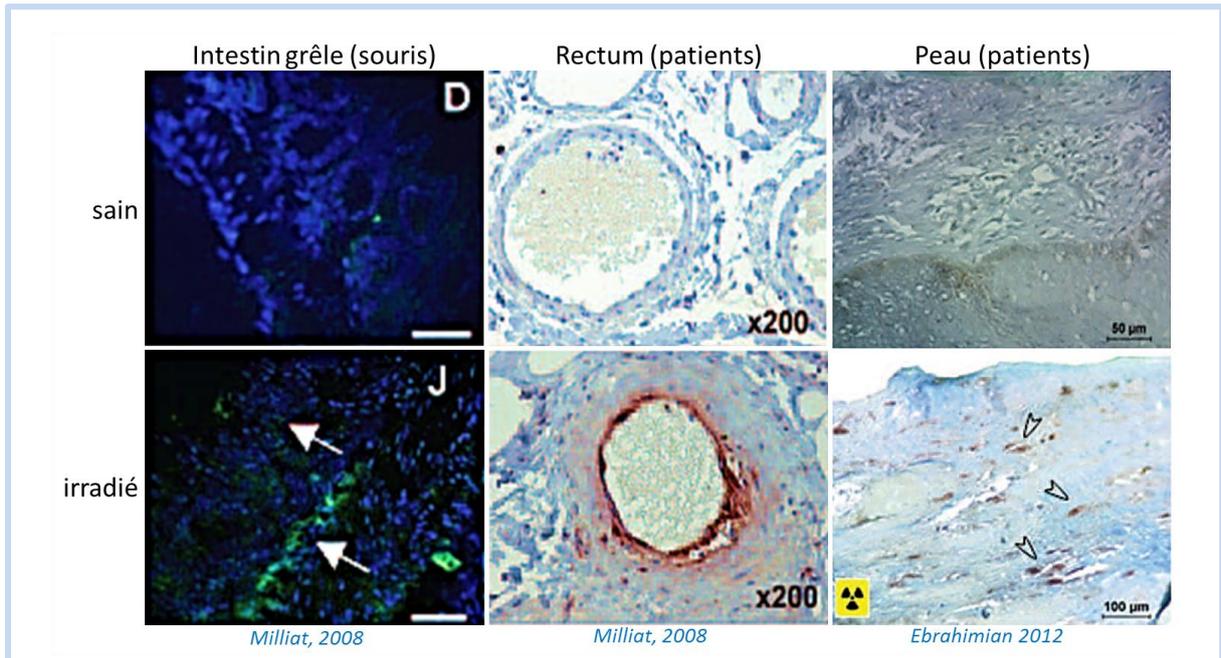


Figure 28 : Visualisation de la surexpression radio-induite de PAI-1 au niveau de l'endothélium par immunohistochimie

Différents mécanismes moléculaires impliqués dans cette surexpression ont pu être mis en évidence grâce à l'utilisation de modèles *in vitro*. Tout d'abord, la voie du TGF- β . Il a été montré sur différentes lignées cellulaires que l'irradiation (15Gy) et le TGF- β 1 (1ng.mL⁻¹) possèdent un effet synergique sur l'expression de PAI-1 dans les heures qui suivent le traitement. Cet effet synergique passe par une augmentation de l'activité du promoteur du gène SERPINE1, et implique p53 (Hageman et al., 2005). De plus, l'exposition d'HUVEC à des doses de 2 et 10 Gy entraîne une surexpression de PAI-1 par activation des voies de signalisation p53 et TGF- β /Smad, et implique la translocation nucléaire de complexes p53/Smad3/Smad4 (Milliat et al., 2008). De la même manière, il a été montré une surexpression de PAI-1 dans les heures qui suivent l'exposition d'HMVEC pulmonaire et de derme, et cette surexpression implique une voie de signalisation dépendante du TGF- β , via le récepteur ALK5 (Activin-Like Kinase-1), Smad2 et Smad3 (Scharpfenecker et al., 2009). Un

autre mécanisme qui semble impliqué dans la surexpression radio-induite de PAI-1 est l'hypoxie. Ainsi, une étude menée sur différentes lignées humaines d'adénocarcinomes montre que l'hypoxie, tout comme l'irradiation, entraîne une augmentation de l'expression et de la sécrétion de PAI-1, et que cet effet est contrecarré par la réoxygénation de ces cellules (Schilling et al., 2007). En s'appuyant sur des travaux qui mettent en évidence que l'irradiation induit la surexpression radio-induite de HIF1 α (Moeller et al., 2004; Chadderton et al., 2005), les auteurs suggèrent que cette surexpression radio-induite de PAI-1 pourrait impliquer ce facteur de transcription. De fait, cette même équipe a démontré quelques années plus tard que l'inhibition de HIF1 α par siRNA dans le même modèle cellulaire entraîne une diminution de la sécrétion de PAI-1 48h après une irradiation de 10 Gy (Artman et al., 2010). Ces travaux démontrent cette fois un lien direct entre HIF1 α et la surexpression radio-induite de PAI-1 *in vitro*. Enfin le stress oxydant a également été impliqué dans la surexpression radio-induite de PAI-1. D'une part, une étude menée sur des cellules épithéliales rénales de rat a démontré que la surexpression de PAI-1 dans les heures qui suivent l'irradiation passe, au moins en partie, par la production de ROS, principalement à partir de l'H₂O₂. En effet, l'augmentation de la concentration intracellulaire de thiols réduits par le N-Acetyl-Cysteine, ainsi que l'induction de l'expression de la catalase par ces cellules, abolit la surexpression de PAI-1 induite par une irradiation de 20 Gy (Zhao et al., 2001). D'autre part, une autre étude menée cette fois sur des cellules microvasculaires cérébrales de rat, montre que l'inhibition de la NADPH oxydase limite la surexpression radio-induite de PAI-1, reliant là aussi cette surexpression au stress oxydant (Collins-Underwood et al., 2008).

La plupart des travaux réalisés sur le sujet soulèvent le lien existant entre l'irradiation et PAI-1, mais très peu d'entre eux portent sur l'implication de cette surexpression radio-induite de PAI-1 dans la pathogénèse des lésions radio-induites aux tissus sains. Certains éléments semblent cependant relier PAI-1 à la sévérité de ces lésions. Ainsi, dans un modèle d'irradiation rénale réalisé chez le rat, l'utilisation de l'hybridation in-situ a permis de mettre en évidence l'existence d'une corrélation entre les sites de surexpression de PAI-1 et la sévérité des lésions glomérulaires (Oikawa et al., 1997). De même, une étude clinique portant sur 32 patientes traitées par radiothérapie après résection d'une tumeur mammaire, montre que l'augmentation du taux plasmatique de PAI-1 est corrélée à l'apparition de lésions cutanées érythémateuses, faisant de lui un facteur prédictif du développement de ces complications (Lincz et al., 2009).

Les résultats obtenus au laboratoire grâce à l'utilisation de souris déficientes pour PAI-1, ont permis de mieux comprendre l'implication de cette protéine dans la pathogenèse des lésions radio-induites aux tissus sains. En effet, dans un modèle de cicatrisation sur tissu cutané irradié, il a été montré que la déficience génétique en PAI-1 améliore les bénéfices thérapeutiques de l'injection de cellules souches mononuclées de la moelle osseuse (BMMNC, Bone Marrow MonoNuclear Cells), notamment au niveau de la perfusion et de la densité capillaire de la peau (Ebrahimian et al., 2012). Concernant le modèle murin d'entérite radique (Figure 29), il a été montré que ces souris PAI-1 $-/-$ présentent une meilleure survie, des lésions tissulaires précoces et tardives moins sévères, une amélioration de la fonction intestinale estimée par la capacité de transport ionique 3 jours après irradiation, une abolition des interactions cellules sanguines/endothélium 24h après irradiation (abdominale, 15Gy), ainsi qu'une fibrose radique moins sévère associée à une diminution de l'expression des gènes reliés à ce processus (Milliat et al., 2008; Abderrahmani et al., 2009). Ces souris présentent également une diminution drastique du taux de cellules endothéliales apoptotiques au niveau de la lamina propria 4 et 5h après irradiation, qui passe de 30-40% pour des souris sauvages à 5-10% pour des souris PAI-1 $-/-$ (Abderrahmani et al., 2012). De plus, des travaux menés *in vitro* ont montré que la surexpression de PAI-1 sensibilise les HUVEC à une irradiation de 10 Gy, alors que l'inhibition de cette protéine les rend au contraire plus résistantes. L'utilisation de cellules endothéliales isolées à partir d'aortes de souris sauvages ou PAI-1 $-/-$ a permis de montrer que l'inhibition de PAI-1 est associée à une augmentation de l'activation de la voie de survie Akt via l'inactivation de PTEN, ainsi qu'à la surexpression des gènes anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL (Abderrahmani et al., 2012). L'ensemble des résultats obtenus au sein du laboratoire suggère donc que, dans ce modèle expérimental, PAI-1 joue un rôle crucial dans le développement de l'entérite radique, ainsi que dans l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales.

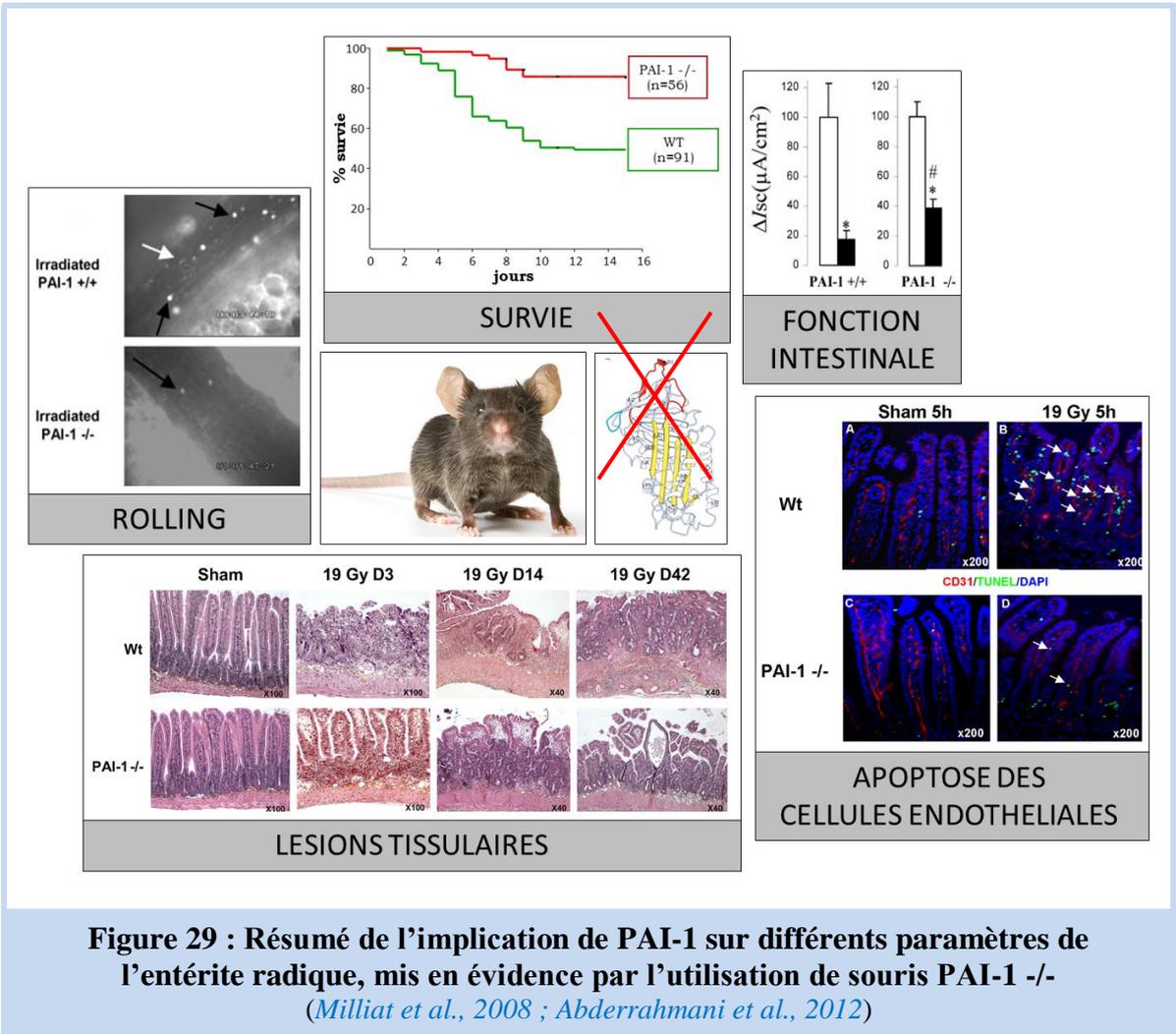


Figure 29 : Résumé de l'implication de PAI-1 sur différents paramètres de l'entérite radique, mis en évidence par l'utilisation de souris PAI-1 -/-
 (Milliat et al., 2008 ; Abderrahmani et al., 2012)

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

Les lésions radio-induites aux tissus sains consécutives aux traitements par radiothérapie représentent un réel problème de santé publique. Ils représentent l'un des principaux facteurs limitants à l'efficacité de ce type de traitement, et peuvent engager la qualité de vie voire le pronostic vital des patients. Les travaux réalisés au sein du Laboratoire de Recherche en Radiobiologie et Radiopathologie (L3R) s'inscrivent dans cette thématique, puisqu'ils visent à mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques associés aux complications des radiothérapies, notamment au niveau de l'intestin, dans le but de dégager des pistes thérapeutiques intéressantes.

Les concepts qui entourent les mécanismes d'initiation, de progression et de maintien des lésions radiques ont évolué au cours des dernières décennies, glissant progressivement du concept de la cellule cible vers une vision plus intégrée de la pathogénèse, impliquant l'ensemble des compartiments qui composent le tissu cible. Ainsi, le développement des dommages radio-induits est aujourd'hui perçu comme la résultante d'une séquence de processus reliés entre eux, et dans lesquels le compartiment vasculaire, notamment l'endothélium, semble tenir une place centrale. Cependant, il existe peu d'éléments concrets qui étayent ce concept.

L'objectif de ce travail de thèse était donc de démontrer l'existence de ce lien endothélium-dépendant entre l'apparition des lésions intestinales radiques et leur évolution vers la chronicité. Nous avons ainsi adopté une stratégie visant à modifier le phénotype endothélial, et à étudier les conséquences de ce changement sur le développement de l'entérite radique. Aux vues des résultats obtenus au laboratoire depuis plusieurs années maintenant, il est apparu que la protéine PAI-1 semblait le candidat moléculaire idéal pour mener à bien ce projet. En effet, comme nous l'avons vu dans les pages précédentes, la délétion du gène SERPINE1 chez la souris leur confère une protection contre l'entérite radique, et les données immunohistochimiques montrent que la surexpression radio-induite de cette protéine intervient principalement au niveau de l'endothélium. En outre, PAI-1 semble jouer un rôle central dans l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales via la modulation de la voie de survie Akt.

Dans ce contexte, nous avons donc choisi d'inactiver le gène SERPINE1 spécifiquement dans l'endothélium chez la souris, afin de modifier le phénotype de ce dernier. Cette délétion endothélium spécifique a été rendue possible grâce à la stratégie CreLox, qui sera plus amplement détaillée dans l'Annexe 1. Différents paramètres ont ainsi pu être abordés, tels que les processus inflammatoires et apoptotiques, ainsi que le développement des lésions tissulaires et leur évolution vers la fibrose.

ARTICLE

LA DELETION DE PAI-1 DANS L'ENDOTHELIUM PROTEGE L'INTESTIN DES LESIONS RADIQUES EN INFLUENCANT LA REPOSE INFLAMMATOIRE CHEZ LA SOURIS

Soumis le 05/01/2015

Objectifs : La radiothérapie est un protocole thérapeutique crucial dans le traitement de nombreux cancers. Bien que l'efficacité de ce type d'approche soit indéniable, son utilisation est associée à l'apparition d'effets secondaires parfois sévères, qu'ils soient systémiques ou locorégionaux. En effet, la tolérance aux rayons ionisants des tissus sains jouxtant la tumeur constitue le principal facteur limitant à l'escalade des doses utilisées. Près de la moitié des patients traités par radiothérapie souffrent d'une tumeur située au niveau de la sphère abdomino-pelvienne. Dans ce contexte, l'intestin représente l'un des principaux organes à risque dans ce type de protocoles, et joue un rôle clé dans le développement de la « pelvic radiation disease ». Cette pathologie, dont le concept émerge depuis quelques années, regroupe l'ensemble des symptômes aigus et chroniques liés à la toxicité des rayons ionisants sur les tissus sains au niveau de la sphère digestive.

La mise au point de traitements préventifs ou curatifs de ce type de complications passe par une étape indispensable de compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués. La vision conceptuelle de ces mécanismes est ainsi progressivement passée d'un rôle exclusif de la mort des cellules cibles, vers une pathogénèse impliquant l'ensemble des compartiments qui composent le tissu irradié. Notamment, l'endothélium semble désormais jouer un rôle clé dans la séquence d'évènements conduisant au développement des lésions intestinales radiques. Bien que cette notion soit admise, peu d'éléments concrets viennent à ce jour appuyer ce concept.

L'objectif de cette étude consiste donc à démontrer formellement l'existence de ce lien endothélium-dépendant entre l'initiation et la chronicité des lésions radiques. Dans ce contexte, un faisceau de preuve semblait désigner l'Inhibiteur des Activateurs du Plasminogène de type 1 (PAI-1) comme outil moléculaire idéal pour mener à bien ce projet. Cette protéine de la famille des SERPINE, constitue le principal inhibiteur des activateurs du plasminogène, uPA et tPA. De cette manière, PAI-1 limite la dégradation de la fibrine et le remodelage matriciel, deux processus liés à la plasmine. Cet inhibiteur est sécrété par de

nombreux types cellulaires en conditions physiopathologiques, et a été relié à de nombreux processus physiopathologiques tels que l'inflammation, la fibrose, ou l'adhésion et la migration des leucocytes. De plus, aux vues des résultats précédemment obtenus au laboratoire, PAI-1 semble étroitement corrélé à la sévérité de l'entérite radique. D'une part, il a été montré que cette protéine joue un rôle clé dans la pathogénèse de l'entérite radique. D'autre part, sa sécrétion et ses effets semblent intimement liés à l'endothélium.

Grace à des modèles animaux innovants mis en place au laboratoire, nous avons ainsi modifié le phénotype de l'endothélium par inactivation spécifique du gène SERPINE1 dans ce compartiment, et suivi les conséquences de ce changement phénotypique sur la pathogénèse de l'entérite radique chez ces animaux.

Résultats : Dans un modèle d'irradiation localisée de l'intestin grêle, nous avons utilisé deux types d'animaux : des souris PAI-1^{flx/flx}, qui sont les souris contrôles, et des souris PAI-1 KO^{endo}, dont le gène SERPINE1 a été délété spécifiquement dans les cellules endothéliales, grâce au système CreLox. Nous avons tout d'abord vérifié que ce KO partiel impactait bien l'expression de PAI-1 au niveau de l'intestin. L'analyse réalisée par qPCR révèle que la délétion endothéliale de PAI-1 limite en partie la surexpression radio-induite du gène à l'échelle du tissu, de 5h à 6 semaines après irradiation. Nous avons ensuite suivi la survie des animaux après irradiation. Alors que plus de 60% des souris PAI-1^{flx/flx} meurent dans les 2 semaines qui suivent l'irradiation, près de 75% des souris PAI-1 KO^{endo} survivent dans le même temps. De plus, l'analyse des lésions histologiques nous a permis d'observer des lésions muqueuses et cryptiques réduites chez les souris PAI-1 KO^{endo}, en comparaison aux souris PAI-1^{flx/flx}, 3 jours après irradiation. En outre, ces mêmes souris présentent une meilleure régénération muqueuse, ainsi qu'une inflammation musculaire réduite une semaine après irradiation. Enfin, ces animaux présentent également une fibrose radique moins sévère, 6 semaines après irradiation, toujours en comparaison aux souris PAI-1^{flx/flx}.

Afin d'expliquer ces différences dans le développement des lésions radiques, nous avons analysé le profil d'expression génique de 106 gènes au niveau de l'intestin. 5h après irradiation, nous constatons une signature moléculaire radio-induite spécifique en fonction du génotype des animaux. Notamment, la surexpression de BBC3, qui a déjà été relié aux lésions intestinales radiques, est observée uniquement chez les souris PAI-1^{flx/flx}, suggérant de ce fait des différences dans le processus apoptotique entre ces deux lignées. En effet, un double marquage E-Cadhérine/TUNEL démontre une augmentation du nombre de cellules

épithéliales apoptotiques situées dans les cryptes, 5 et 24h après irradiation, chez les deux lignées murines. Cependant, cette augmentation se révèle plus faible chez les souris PAI-1 KO^{endo}.

La signature moléculaire des gènes liés à l'immunité a également été étudiée 3 et 7 jours après irradiation. L'analyse détaillée de ces résultats souligne une signature radio-induite spécifique en fonction du génotype des animaux. Notamment, nous constatons des différences au niveau de l'expression de gènes liés au chimiotactisme des neutrophiles et des macrophages, ainsi qu'une diminution de l'expression de CD68, qui est un marqueur des monocytes et des macrophages. Ces résultats suggèrent donc que la délétion de SERPINE1 dans les cellules endothéliales influence quantitativement et qualitativement l'infiltrat de macrophages après irradiation.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons suivi cet infiltrat au cours de l'entérite radique par un marquage immunohistochimique de CD68. Les résultats révèlent, une semaine après irradiation, une diminution du nombre de cellules CD68+ chez les souris PAI-1 KO^{endo} irradiées, en comparaison aux souris PAI-1^{flx/flx}. Nous avons également suivi la polarisation des macrophages présents dans le tissu au cours de la progression du processus pathologique, facteur qui peut jouer un rôle crucial au cours de la cicatrisation. Le nombre de macrophages M1, observés par double marquage immunohistochimique CD68/iNOS, augmente progressivement après irradiation chez les souris PAI-1^{flx/flx}, de 3 à 42 jours après irradiation. Cette augmentation est en revanche fortement limitée chez les souris PAI-1 KO^{endo}, quel que soit le temps après irradiation étudié. De la même manière, le nombre de macrophages M2, cette fois observés par double marquage immunohistochimique CD68/CD206, révèle une évolution différente en fonction du génotype des animaux. Alors que ce nombre augmente 3 jours après irradiation, puis diminue progressivement jusqu'à 6 semaines après irradiation chez les souris PAI-1^{flx/flx}, ce nombre reste relativement stable chez les souris PAI-1 KO^{endo}, et devient significativement plus élevé à J42 en comparaison aux souris PAI-1^{flx/flx}.

Conclusions : Ces travaux démontrent que PAI-1 joue un rôle clé dans l'initiation des lésions intestinales radiques par un mécanisme endothélium-dépendant. En effet, le pool de PAI-1 sécrété par l'endothélium influence *in vivo*, de manière directe ou indirecte, la mort des cellules souches intestinales, les lésions tissulaires précoces et tardives, ainsi que le processus inflammatoire via le recrutement et la polarisation des macrophages. Cette étude confirme ainsi l'attractivité de PAI-1 comme cible thérapeutique dans le traitement et/ou la prévention

de l'entérite radique. Les résultats préalablement obtenus au laboratoire ont montré un bénéfice limité du tiplaxtinine dans le cadre de ces lésions radiques, probablement lié au manque d'efficacité de la molécule qui se révèle incapable d'inhiber le pool de PAI-1 lié à la vitronectine. Cependant, de nouveaux inhibiteurs ont depuis été décrits, et mériteraient d'être testés dans nos conditions expérimentales.

De manière plus conceptuelle cette fois, ces travaux apportent la démonstration directe que la modification du phénotype endothélial influence la pathogénèse de l'entérite radique. En effet, un évènement moléculaire précis, dans notre cas l'absence d'expression du gène SERPINE1, est capable de modifier l'évolution et la sévérité de la pathologie.

Endothelial PAI-1 deletion protects against radiation-induced intestinal injury and influences inflammatory response in mice.

Emilie Rannou¹, Agnès François¹, Aurore Toullec¹, Olivier Guipaud¹, Valérie Buard¹, Georges Tarlet¹, Elodie Mintet¹, Maria Luisa Iruela-Arispe², Marc Benderitter³, Jean-Christophe Sabourin⁴ and Fabien Milliat ^{1*}

¹ Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), Department of Radiobiology and Epidemiology (SRBE), Research on Radiobiology and Radiopathology Laboratory (L3R), Fontenay-aux-Roses, 92260, France

² Department of Molecular, Cell, and Developmental Biology, University of California, Los Angeles

³ Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), Department of Radiobiology and Epidemiology (SRBE), Fontenay-aux-Roses, France

⁴ Department of Pathology, Rouen University Hospital, France

***Corresponding author:**

Fabien Milliat

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN)

Radiobiology and Radiopathology Research Laboratory

BP17, 92262 Fontenay-aux-Roses, France

tel: +33 1 58 35 91 60

fax: +33 1 58 35 84 67

fabien.milliat@irsn.fr

Short title: Endothelial PAI-1 deletion reduces radiation enteritis

Conflict of Interest: None of the authors have any financial conflict of interest to be disclosed.

Abbreviations: GIS, gastrointestinal syndrome; GO, gene ontology; HIF-1 α , hypoxia inducible factor-1 α ; MPO, myeloperoxidase; NS, non-significant; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-type 1; SEM, standard error of the mean; TLDA, TaqMan low-density array.

Acknowledgements: We thank the GSEA (Groupe de Soutien à l'Experimentation Animale) of the IRSN for their excellent technical assistance with the breeding of mice and Genoway for expertise and collaboration in the design of PAI-1 floxed mice.

Grant support: This work was supported by Electricité de France EDF (Groupe Gestion Projet Radioprotection) and the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (ROSIRIS program).

Author contributions

Emilie Rannou: performed experiments and interpreted the results; helped write the manuscript, critical review of the manuscript.

Agnès François: performed experiments, interpreted the results and critical review of the manuscript.

Aurore Toullec, Valérie Buard, Georges Tarlet, Elodie Mintet: performed experiments.

Maria Luisa Iruela-Arispe: material support and critical review of the manuscript.

Olivier Guipaud, Marc Benderitter, Jean-Christophe Sabourin: critical review of the manuscript.

Fabien Milliat: Conception and design of the work, writing of the manuscript, supervising the project.

BACKGROUND & AIMS: The bowel is a critical organ at risk of injury during radiation therapy for abdominal or pelvic tumors. The pathophysiological mechanism involved in radiation enteropathy, and especially the role of the endothelium in this pathogenesis, remains unclear. Previous results showed that plasminogen activator inhibitor-type 1 (SERPINE1/PAI-1) contributes to radiation-induced intestinal injury and suggested that this role could be driven by an endothelium-dependent mechanism. However, there is no demonstration that directly links the endothelial response and the development of radiation-induced enteropathy. In this work, we investigated whether endothelial-specific PAI-1 deletion could affect radiation-induced intestinal injury. **METHODS:** We used the Cre/loxP system to create mice with specific deletion of PAI-1 in the endothelium (named PAI-1KO^{endo}). In a model of radiation enteropathy, survival and intestinal radiation injury were monitored in both control floxed (PAI-1^{flx/flx}) and PAI-1KO^{endo} mice. Intestinal gene transcriptional profile was monitored by high-throughput real-time RT-PCR as well as recruitment of inflammatory cells. **RESULTS:** Irradiated PAI-1KO^{endo} mice exhibited increased survival compared with irradiated PAI-1^{flx/flx} mice. Reduced enteritis severity was observed at 3 and 7 days after irradiation as well as an attenuated fibrosis at 6 weeks. Modifications of gene expression profiles 5 hours after irradiation showed differences between PAI-1KO^{endo} and PAI-1^{flx/flx} mice with respect to the apoptotic process. Double E-cadherin/TUNEL labeling confirmed a reduced epithelial cell apoptosis in irradiated PAI-1KO^{endo} compared with PAI-1^{flx/flx} mice. High-throughput real-time PCR combined with bioinformatic analyses revealed a putative involvement of macrophages. Immunohistochemistry experiments showed a decrease in CD68⁺ cells in irradiated intestinal tissues from PAI-1KO^{endo} mice as well as a reduced number of M1-type macrophages (CD68+/iNOS+) and modifications in the number of M2-type macrophages (CD68+/CD206+) during progression of the enteropathy. **CONCLUSIONS:** These data demonstrate that PAI-1 plays a role in the initiation of radiation-induced intestinal injury by an endothelium-dependent mechanism and influences inflammatory processes affecting macrophage recruitment and polarization. This work clearly shows that the endothelium is directly involved in the progression of radiation-induced enteritis. **Keywords:** radiation enteropathy, endothelium, PAI-1, inflammation, macrophages.

Cancer is one of the most common diseases in the world. Used for more than half of patients with tumors, radiotherapy plays a crucial role in cancer cure. The therapeutic index of radiotherapy depends on two parameters, tumor control and normal tissue tolerance. Despite huge advances in the planning of dose distribution to the target volume, toxicity of surrounding healthy tissues remains the most important radiation dose-limiting factor¹. Tumors in the abdominal cavity and pelvis account for more than half of radiation treatments, and in recent years the notion has emerged of “pelvic radiation disease”, which covers all symptoms associated with healthy tissue toxicity, from acute complications to chronic and fibrotic damage, the latter affecting 10% of patients^{2, 3}. Often underestimated, radiation enteropathy is a real clinical problem and long-term prevalence exceeds that of inflammatory bowel disease (IBD)⁴. If we want to identify relevant therapeutic approaches, the crucial scientific challenge is to improve our knowledge of the pathophysiological mechanisms involved in the progression of radiation enteropathy.

Tissue response to radiation has long been explained by the target cell concept⁵. Concerning radiation enteropathy, the severity of epithelial depletion has long been considered as the sole determinant of acute intestinal injury. The contemporary view involves several cell types and molecular mechanisms, which together form an orchestrated response, and contribute to the initiation, progression and chronicity of radiation-induced injury⁴. The concept that the microvasculature plays a central role in the radiation toxicity of many tissues, including the intestine^{6, 7}, is often described, but lacks robust demonstration. Irradiation leads to endothelial cell apoptosis, increased vascular permeability, and acquisition of a pro-inflammatory and pro-coagulant phenotype. These modifications strongly participate in the development of radiation-induced damage, notably in the bowel⁸. We have used tissue-specific knockout models to study the role of the endothelial compartment in the progression of radiation-induced intestinal injury. We hypothesized that the pool of plasminogen activator inhibitor-type 1 (PAI-1) produced by endothelial cells could be involved in the development and progression of radiation-induced intestinal damage. PAI-1 belongs to the family of serine protease inhibitors, and is the main inhibitor of plasminogen to plasmin conversion via inhibition of its targets uPA and tPA⁹. Consequently, PAI-1 limits fibrin degradation and

plasmin-dependent matrix metalloproteinase activation. PAI-1 is produced by several cell types in pathological conditions and is involved in many pathophysiological processes, including inflammation¹⁰, fibrosis¹¹⁻¹³ and macrophage adhesion/migration^{14, 15}. So far, it has been shown that PAI-1 is overexpressed in the endothelial cells of different irradiated healthy tissues in patients^{16, 17}. Moreover, PAI-1 genetic deficiency in mice limits the severity of radiation-induced intestinal injury^{17, 18}, and improves skin wound healing after irradiation¹⁹. Finally, PAI-1 is involved in radiation-induced endothelial cell death *in vitro* via an Akt signaling pathway²⁰.

There is a body of evidence to connect PAI-1 to the endothelial response to radiation and the severity of radiation-induced damage, although this link has not been demonstrated. In the present work, we investigated whether specific PAI-1 deletion in the endothelium affects the intestinal response to radiation exposure, and show that the endothelium is directly involved in the progression of radiation-induced enteritis.

MATERIALS AND METHODS

Generation of PAI-1 floxed mice and animals

The global molecular strategy for creating PAI-1 floxed mice is summarized in Figure 1. The targeting vector was created from SERPINE1/PAI-1 genomic sequences, which were isolated by PCR amplification of genomic DNA. This vector was linearized by restriction digestion with Fse I, electroporated into 129/Sv ES cells and the transformed cells were subjected to G418 selection. Of 322 G418-resistant ES cell clones, homologous recombination was confirmed in 6 by both Southern blot analysis using 2 different probes outside the region of homology, and PCR analysis with N1 and N2 primers (Supplementary Figure 1). Three of these clones were used to generate chimeras by standard procedures. Germline transmission was obtained by crossing the chimeras with C57BL/6J females. Heterozygous females were crossed with CMV-Flp males to excise the neomycin selection cassette. When excision of the neomycin selection cassette was successful, a 547-bp PCR product was amplified, using primers P2 and P4 from the genomic tail DNA of the offspring (Figure 1A). Homozygous floxed mice were finally obtained by interbreeding F2 heterozygous floxed mice. The following mice were used for this study: VE-cadherin-Cre (VECad-Cre) mice²¹, VE-cadherin-Cre-

ER^{T2} (VECad-Creⁱ) mice²², ROSA26R LacZ reporter (ROSA) mice (Jackson Laboratory), HIF-1 α floxed mice (HIF-1 α ^{flx/flx}) (Jackson Laboratory), and PAI-1 floxed (PAI-1^{flx/flx}) mice. Crossing of these lines was used to obtain the following mice: VECad-Cre^{+/-}/ROSA^{+/+}, VECad-Cre^{i +/-}/ROSA^{+/+}, VECad-Cre^{+/-}/HIF-1 α ^{flx/flx}, VECad-Cre^{+/-}/PAI-1^{flx/flx} (PAI-1KO^{endo}) and VECad-Cre^{i +/-}/PAI-1^{flx/flx} (PAI-1KO^{endo(i)}) mice. The protocol (P13-18) for animal use in this project was reviewed and approved by national ethics committee no. 81.

All other protocols for materials and experiments are described in detail in Supplementary methods.

Results

Endothelial PAI-1 deletion protects mice against acute radiation-induced intestinal injury.

In order to study the consequences of genetic inactivation of PAI-1 in endothelial cells, we generated PAI-1 floxed mice (Figure 1A and Supplementary Figure 1A-B) and crossed them with VECad-Cre mice to produce endothelial-specific PAI-1 knockout mice (Supplementary Figure 2). The specificity of endothelium recombination events in intestinal tissue was checked using ROSA26 reporter mice crossed with VECad-Cre or VECad-Creⁱ mice (Supplementary Figures 3 and 4) and a genotyping strategy was used to genotype the mice and to detect the excised allele (Figure 1B). We observed decreased expression of PAI-1 mRNA in lung and gut in PAI-1KO^{endo} mice compared with PAI-1^{flx/flx} mice (Figure 1C). We observed no differences in PAI-1 mRNA level between PAI-1^{flx/flx} mice and C57BL/6J mice (data not show). In a model of radiation enteropathy, intestinal PAI-1 expression increased from 5 h to up to 6 weeks post-exposure, while endothelial PAI-1 deletion partially limited this radiation-induced PAI-1 up-regulation (Figure 2A). We monitored survival and observed that genetic PAI-1 deletion in endothelium protects mice from death after a high dose of ionizing radiation localized to a small part of the gut (Figure 2B). More than 60% of irradiated PAI-1^{flx/flx} mice died within two weeks (P=0.0014 versus sham-IR PAI-1^{flx/flx} mice), whereas about 75% of PAI-1KO^{endo} mice survived (P=0.084 versus sham-IRPAI-1^{flx/flx} mice and p=0.014

versus irradiated PAI-1^{flx/flx} mice). We examined intestinal tissue injury in depth 3 and 7 days after irradiation (Figure 3). Mucosal injury was reduced in irradiated PAI-1KO^{endo} mice compared with irradiated PAI-1^{flx/flx} mice (Figure 3A-C), with a better index of cryptic damage at day 3 (Figure 3B) and signs of a mucosal regeneration and reduced muscle inflammation at day 7 after irradiation (Figure 3D-E).

Radiation-induced epithelial cell death is reduced in PAI-1KO^{endo} mice.

To explain the differences we observed in the acute phase, we plotted a molecular expression profile 5 h after irradiation. The mRNA levels of 106 genes were measured by real-time PCR using a TaqMan low-density array (TLDA) complemented with a panel of 12 individual genes. Biological information was extracted using both statistical and bioinformatic tools. Hierarchical clustering analyses discriminated sham-IR from irradiated mice (Supplementary Figure 5A). Statistical analyses revealed a specific molecular signature of radiation exposure according to the expression or not of PAI-1 in the endothelium. This molecular signature is shown in Figure 4A and Supplementary Figure 5B-E. We detected similar decreased expression of BIRC5 and increased expression of BAX in both irradiated PAI-1KO^{endo} and PAI-1^{flx/flx} mice (Supplementary Figure 5F). However, up-regulation of BBC3, a gene that has been implicated in radiation-induced intestinal injury²³, was only observed in irradiated PAI-1^{flx/flx} mice, suggesting differences in apoptosis-related effects in the 2 mouse lineages. Double labeling of epithelial cells and TUNEL-positive cells revealed that epithelial cell apoptosis in intestinal crypts was significantly increased in irradiated mice 5 h and 24 h after irradiation, whatever the status of PAI-1. However, the level of apoptotic cells was reduced in irradiated PAI-1KO^{endo} mice compared with irradiated PAI-1^{flx/flx} mice (Figure 4C-D).

Constitutive and inducible endothelial PAI-1 deletions protect mice from late radiation-induced intestinal injury.

As described by Zheng et al²⁴, the model of localized intestinal radiation injury offers the opportunity to study the progression of damage over several weeks. Six weeks after irradiation, we observed patches of intestinal fibrosis, as shown in a previous study by

our team¹⁷. Sirius red staining revealed that collagen deposition is reduced in irradiated PAI-1KO^{endo} mice compared with irradiated PAI-1^{flx/flx} mice, as reflected by the fibrosis score (Figure 5A-B). To confirm these results we also used an inducible knockout model using VECad-creER^{T2} mice. We observed a reduced radiation-induced fibrosis score in PAI-1KO^{endo(i)} mice compared with PAI-1^{flx/flx} mice treated with tamoxifen (Figure 5C).

Endothelial PAI-1 deletion impacts the intestinal gene expression profile following radiation exposure.

Because PAI-1 has anti-fibrinolytic properties, we hypothesized that reduced acute and late intestinal injury in PAI-1KO^{endo} mice could be due to differences concerning fibrinolysis. We observed acute and chronic fibrin deposition in irradiated animals, but no differences between the 2 genotypes were noted (Supplementary Figure 6), suggesting that the differences between the mouse lineages did not depend on fibrinolysis. Since the difference between the 2 lineages could be explained by a difference in the immune response, we next investigated the immune gene expression profile at day 3 and day 7 after irradiation by RT-qPCR using a TLDA methodology complemented with individual qPCR (Supplementary Figures 7-10). As for the 5-h time-point, hierarchical clustering analyses put sham-IR and irradiated mice into 2 different clusters, while the 2 mouse lineages PAI-1^{flx/flx} and PAI-1KO^{endo} could not be differentiated by this unsupervised statistical analysis tool (Figure 6A-C and Supplementary Figures 7A and 9A). In-depth analyses of these results using supervised statistics and bioinformatic tools revealed differences between irradiated PAI-1^{flx/flx} and PAI-1KO^{endo} mice at both 3 and 7 days after irradiation (Figure 6B-D). Volcano plots identified a specific radiation signature according to PAI-1 status in the endothelium (Supplementary Figures 7B-C and 9B-C). Bioinformatic tools were then used to establish whether a particular biological function could explain the protection of PAI-1KO^{endo} mice from radiation-induced damage (Supplementary Figures 8 and 10, and Supplementary Table 1). Interestingly, gene ontology enrichment analyses revealed clear differences between PAI-1^{flx/flx} and PAI-1KO^{endo} mice following radiation exposure (Supplementary Table 2). According to the total number of entities in each enrichment result, the “response to hypoxia” GO term was ranked first in the irradiated PAI-1 KO^{endo} mouse group, but was not ranked in the

irradiated PAI-1^{flx/flx} mouse group. These results led us to examine whether PAI-1 up-regulation could be driven by a hypoxia-dependent molecular mechanism. We therefore generated mice with a specific genetic HIF-1 α deletion in endothelial cells (VECad-Cre^{+/-}/HIF-1 α ^{flx/flx}), allowing us to show that intestinal PAI-1 overexpression after local intestine irradiation is at least partly dependent on HIF-1 α expression in the endothelium (Supplementary Figure 11). We detected overexpression at 3 and 7 days of several molecules involved in the positive chemotaxis of both neutrophils and monocytes (CCL2, TNF, VEGFA, IL6, CCL3) (Figure 6 and Supplementary Table 1), indicating that this process could be important in the observed phenomenon. MPO labeling showed no differences between irradiated mice, whatever the status of PAI-1 in the endothelium (Supplementary Figure 12). Moreover, we observed that TNF α overexpression was higher in irradiated PAI-1^{flx/flx} mice (fold change of 17.4) than in irradiated PAI-1KO^{endo} mice (fold change of 6.9) at day 7 post-exposure, compared with sham-IR mice (Supplementary Table 1). On the other hand, 3 days after irradiation, the macrophage marker CD68 gene was only overexpressed in PAI-1^{flx/flx} mice. Seven days after irradiation, CD68 overexpression was almost two times higher in irradiated PAI-1^{flx/flx} mice than in irradiated PAI-1KO^{endo} mice (fold changes of respectively 8.7 and 4.9)(Supplementary table 1). Altogether, these results suggest that PAI-1 deletion in endothelium affected radiation-induced macrophage infiltration.

Conditional endothelium-specific PAI-1 deletion limits macrophage infiltration and influences macrophage M1/M2 polarization.

We monitored macrophage infiltration and polarization during the progression of radiation enteropathy. Seven days after irradiation, immunolabeling experiments showed a decrease of CD68+ cells in irradiated PAI-1KO^{endo} mice compared with irradiated PAI-1^{flx/flx} mice (Figure 7A-B). A slight decrease of CD68+ cells was also observed at 3 days, but there were no differences after 6 weeks (Supplementary Figure 13). Because macrophage polarization is a crucial process involved in wound healing, we next monitored macrophage polarization using CD68/iNOS and CD68/CD206 double immunolabeling to quantify the levels of M1 and M2 macrophage polarization (Figure 7C- and 7E). The number of M1 macrophages increased following radiation exposure, at

3, 7 and up to 42 days after irradiation (Figure 7D). However, the increased level of M1 cells was reduced in irradiated mice with endothelial PAI-1 genetic deletion. For M2 polarization, we observed at 3 days an increased level of CD68/CD206+ cells in irradiated PAI-1^{flx/flx} mice, but not in PAI-1KO^{endo} mice (Figure 7F). While no statistical difference was noted at day 7 between the 2 mouse strains, we observed that the level of M2 macrophages was higher in PAI-1KO^{endo} mice than in PAI-1^{flx/flx} mice 6 weeks after irradiation (Figure 7F).

Discussion

This work strengthens the concept that endothelium strongly contributes to the progression of radiation-induced intestinal injury. Using a new model of transgenic mice specifically knocked-out for PAI-1 in endothelial cells, we demonstrate that this protein orchestrates the progression of enteritis by an endothelium-dependent mechanism.

Endothelium has already been described as a crucial compartment involved in gastrointestinal syndrome (GIS)²⁵⁻²⁷ in studies that used total body or abdominal irradiation. Unlike GIS models, the model of radiation enteropathy that we used allows exploration of the progression of enteritis and radiation-induced late effects. Aware that a single dose of 19 Gy is not representative of or comparable to the conventional fractionation scheme used in clinical practice, this preclinical model is nonetheless useful in providing proof of principle that a specific molecular target in a specific compartment may be associated with radiation injury. Moreover, the tendency of radiation therapy practice to move toward high doses per fraction, such as in stereotactic body radiation therapy for prostate cancer, raises the question of potentially enhanced injury to organs at risk²⁸. Clearly, this preclinical model could help to address some scientific issues in this context.

Advances in genetic engineering provide a powerful model system to study the mechanisms of normal tissue injury after irradiation²⁹. In this way, using the Cre-loxP system to delete p53, it was shown that p53 functioned in endothelial cells to protect mice from myocardial injury after whole-heart irradiation³⁰. Moreover, using Villin-Cre mice, one study demonstrated that p53 is required in epithelial cells to prevent GIS³¹. We previously showed that PAI-1 total knockout mice are protected against radiation

enteritis, but there was no evidence that this was dependent on the PAI-1 endothelial pool^{17, 18, 20}. We therefore created PAI-1 floxed mice to answer this question and we present here the first report using this transgenic model. To our knowledge, ours is the first report to demonstrate that conditional specific inactivation of one gene in the endothelium impacts global intestinal response following radiation injury.

PAI-1 is an anti-fibrinolytic and pro-fibrotic protein^{9, 32}. Here, we show that irradiation very rapidly induces fibrin deposition. Surprisingly, PAI-1 deletion in endothelium does not affect fibrin deposition, suggesting that PAI-1 contributes to intestinal injury independently of its anti-fibrinolytic action, or that another cellular pool of PAI-1 is involved.

Crosstalk between thrombosis and inflammation is an emerging concept explaining tissue homeostasis following stress or a wound healing process³³. Relationships between PAI-1 and the inflammatory process have already been described. PAI-1 knockout mice have a lower influx of neutrophils in a model of lung³⁴ or renal³⁵ injury. Moreover, PAI-1 inhibits neutrophil efferocytosis³⁶ and limits spontaneous or TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-dependent neutrophil apoptosis³⁷. In our present work, neutrophil influx was measured using MPO labeling. The results show that endothelial inactivation of PAI-1 does not affect the severity of intestinal neutrophil influx in the acute and late phases after irradiation. This result suggests that the endothelial PAI-1 radiation-induced overexpressed pool is not directly involved in neutrophil influx after irradiation. Fibrinolysis regulators are involved in adhesion of monocytes to endothelial cells *in vitro*. PAI-1 and uPA are required for GlyLDL-induced monocyte adhesion to endothelial cells¹⁵. Macrophages are highly heterogeneous cells that can adapt their functions in response to local microenvironmental signals. The protective and pathogenic functions of macrophage subsets in the fibrosis and wound healing processes after irradiation are unclear. Macrophage polarization is a mechanism that is dependent on context, such as both the tissue microenvironment and progression of the wound healing process³⁸. M1 macrophages are considered as pro-inflammatory immune cells which can exacerbate the inflammatory response by recruiting T helper type 17 lymphocytes and neutrophils, leading to persistent pro-inflammatory signals and substantial tissue damage. In contrast to the pro-inflammatory response triggered by M1

macrophages, M2 macrophages exhibit mainly anti-inflammatory actions. M2 macrophages antagonize the response of M1 macrophages, which may be crucial for the activation of the wound healing process and for restoration of tissue homeostasis. We showed that conditional endothelium-specific PAI-1 deletion limits radiation-induced macrophage infiltration (CD68+ cells) in the radiation acute phase. Levels of M1-type cell influx were also reduced in PAI-1KO^{endo} in the acute and late phases. Although a reduced number of M2-type cells was observed at day 3 after irradiation, a higher number was observed in the late phase in PAI-1KO^{endo} mice compared with floxed irradiated mice. Interestingly, this increase is associated with reduced tissue injury. Further experiments are needed to explore the putative causal links between these two observations.

In this work we used VE-cadherin Cre-recombinase mice and showed that PAI-1 deletion in PAI-1KO^{endo} mice impacts immune cell influx. The origin of these immune cells is unknown but a myeloid contribution is probable. Using VECad-Cre-ROSA26R mice, Alva et al. showed that about 50% of all hematopoietic lineages were positive for LacZ in the adult bone marrow²¹. Therefore, we cannot exclude that protection from radiation injury associated with PAI-1 deletion using VECad-cre could be due, at least in part, to recombination events in the bone marrow, leading to PAI-1 genetic inactivation in some myeloid progenitors. Interestingly, using VECad-CreER^{T2}-ROSA26R mice, Monvoisin et al. reported only 0.3% of LacZ+ cells in the bone marrow of adult mice, showing that recombination events in myeloid progenitors are minor events in this model²². We confirmed protection from radiation-induced intestinal injury using PAI-1KO^{endo} inducible mice created by crossing VECad-Cre-ER^{T2} tamoxifen inducible Cre mice with PAI-1^{fl/fl} mice. These results confirm that specific PAI-1 endothelial deletion conferred protection against radiation enteritis.

Bioinformatic tools are useful in exploring and analyzing large amounts of data. Here, we measured about one hundred genes in 3 groups of mice at several time points after irradiation, representing thousands of real-time PCR data. We used a pathway analysis tool to explain in detail the differences between mice according their PAI-1 expression in the endothelium. GO enrichment analyses revealed possible differences between mice linked to the response to the hypoxia pathway. Hypoxia response elements are present

in the PAI-1 gene promoter and the transcription factor HIF-1 α has been shown to be involved in PAI-1-dependent transcription *in vitro*^{39, 40}. We therefore hypothesized that HIF-1 α could be involved in the radiation-induced PAI-1 up-regulation. Using VECad-Cre^{+/-}/HIF-1 α ^{flx/flx}, we have shown here that PAI-1 overexpression is at least in part dependent on HIF-1 α expression in endothelium. These results suggest that a hypoxia-PAI-1 axis could be crucial in the progression of radiation-induced enteritis through the endothelium compartment. The detailed mechanisms are not yet fully understood and further experiments are needed to explore them.

In conclusion, we demonstrate in this work that PAI-1 plays a role in the initiation of radiation-induced intestinal injury by an endothelium-dependent mechanism. The endothelial pool of PAI-1 directly or indirectly influences the *in vivo* inflammatory process by affecting recruitment and polarization of macrophages. Our study confirms that PAI-1 is an attractive therapeutic target in attempts to reduce radiation-induced normal tissue injury. We previously tested the PAI-1 inhibitor tiplaxtinin, which had a small beneficial effect by conferring temporary protection against early lethality¹⁸. Tiplaxtinin inhibits free PAI-1, but not the vitronectin-bound pool of PAI-1⁴¹, thus limiting *de facto* the efficacy of this PAI-1 inhibitor. New PAI-1 inhibitors have been described⁴²⁻⁴⁴ recently and should be tested in the light of our results. More conceptually, this work supports the concept that a modification of endothelium phenotype affects the progression of radiation-induced radiation enteritis.

References

1. Bentzen SM. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nature reviews. Cancer* 2006;6:702-713.
2. Andreyev HJ, Wotherspoon A, Denham JW, et al. Defining pelvic-radiation disease for the survivorship era. *Lancet Oncol* 2010;11:310-2.
3. Andreyev HJN, Wotherspoon A, Denham JW, et al. "Pelvic radiation disease": new understanding and new solutions for a new disease in the era of cancer survivorship. *Scandinavian journal of gastroenterology* 2011;46:389-397.
4. Hauer-Jensen M, Denham JW, Andreyev HJ. Radiation enteropathy--pathogenesis, treatment and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;11:470-9.
5. Atwood KC, Norman A. On the Interpretation of Multi-Hit Survival Curves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1949;35:696-709.
6. Baker DG, Krochak RJ. The response of the microvascular system to radiation: a review. *Cancer investigation* 1989;7:287-294.

7. Hopewell JW, Calvo W, Jaenke R, et al. Microvasculature and radiation damage. Recent results in cancer research. *Fortschritte der Krebsforschung. Progrès dans les recherches sur le cancer* 1993;130:1-16.
8. Wang J, Boerma M, Fu Q, et al. Significance of endothelial dysfunction in the pathogenesis of early and delayed radiation enteropathy. *World journal of gastroenterology: WJG* 2007;13:3047-3055.
9. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *The New England journal of medicine* 2000;342:1792-1801.
10. Renckens R, Roelofs JJTH, de Waard V, et al. The role of plasminogen activator inhibitor type 1 in the inflammatory response to local tissue injury. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* 2005;3:1018-1025.
11. Bauman KA, Wettlaufer SH, Okunishi K, et al. The antifibrotic effects of plasminogen activation occur via prostaglandin E2 synthesis in humans and mice. *The Journal of clinical investigation* 2010;120:1950-1960.
12. Oda T, Jung YO, Kim HS, et al. PAI-1 deficiency attenuates the fibrogenic response to ureteral obstruction. *Kidney international* 2001;60:587-596.
13. Wang H, Zhang Y, Heuckeroth RO. PAI-1 deficiency reduces liver fibrosis after bile duct ligation in mice through activation of tPA. *FEBS letters* 2007;581:3098-3104.
14. Osterholzer JJ, Christensen PJ, Lama V, et al. PAI-1 promotes the accumulation of exudate macrophages and worsens pulmonary fibrosis following type II alveolar epithelial cell injury. *The Journal of pathology* 2012;228:170-180.
15. Zhao R, Ren S, Moghadasain MH, et al. Involvement of fibrinolytic regulators in adhesion of monocytes to vascular endothelial cells induced by glycated LDL and to aorta from diabetic mice. *J Leukoc Biol* 2014;95:941-9.
16. Halle M, Ekström M, Farnebo F, et al. Endothelial activation with prothrombotic response in irradiated microvascular recipient veins. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery: JPRAS* 2010;63:1910-1916.
17. Milliat F, Sabourin J-C, Tarlet G, et al. Essential role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation enteropathy. *The American journal of pathology* 2008;172:691-701.
18. Abderrahmani R, François A, Buard V, et al. Effects of pharmacological inhibition and genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 in radiation-induced intestinal injury. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2009;74:942-948.
19. Ebrahimian TG, Squiban C, Roque T, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 controls bone marrow-derived cells therapeutic effect through MMP9 signaling: role in physiological and pathological wound healing. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2012;30:1436-1446.
20. Abderrahmani R, François A, Buard V, et al. PAI-1-dependent endothelial cell death determines severity of radiation-induced intestinal injury. *PloS one* 2012;7.
21. Alva JA, Zovein AC, Monvoisin A, et al. VE-Cadherin-Cre-recombinase transgenic mouse: a tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 2006;235:759-767.
22. Monvoisin A, Alva JA, Hofmann JJ, et al. VE-cadherin-CreERT2 transgenic mouse: a model for inducible recombination in the endothelium. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 2006;235:3413-3422.
23. Qiu W, Carson-Walter EB, Liu H, et al. PUMA regulates intestinal progenitor cell radiosensitivity and gastrointestinal syndrome. *Cell Stem Cell* 2008;2:576-83.
24. Zheng H, Wang J, Koteliansky VE, et al. Recombinant soluble transforming growth factor beta type II receptor ameliorates radiation enteropathy in mice. *Gastroenterology* 2000;119:1286-96.

25. Cho CH, Kammerer RA, Lee HJ, et al. COMP-Ang1: a designed angiopoietin-1 variant with nonleaky angiogenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:5547-52.
26. Paris F, Fuks Z, Kang A, et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 2001;293:293-7.
27. Rotolo J, Stancevic B, Zhang J, et al. Anti-ceramide antibody prevents the radiation gastrointestinal syndrome in mice. *J Clin Invest* 2012;122:1786-90.
28. Kim DW, Cho LC, Straka C, et al. Predictors of rectal tolerance observed in a dose-escalated phase 1-2 trial of stereotactic body radiation therapy for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014;89:509-17.
29. Kirsch DG. Using genetically engineered mice for radiation research. *Radiat Res* 2011;176:275-9.
30. Lee CL, Moding EJ, Cuneo KC, et al. p53 functions in endothelial cells to prevent radiation-induced myocardial injury in mice. *Sci Signal* 2012;5:ra52.
31. Kirsch DG, Santiago PM, di Tomaso E, et al. p53 controls radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice independent of apoptosis. *Science* 2010;327:593-6.
32. Ghosh AK, Vaughan DE. PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol* 2012;227:493-507.
33. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013;13:34-45.
34. Wolthuis EK, Vlaar AP, Hofstra JJ, et al. Plasminogen activator inhibitor-type I gene deficient mice show reduced influx of neutrophils in ventilator-induced lung injury. *Crit Care Res Pract* 2011;2011:217896.
35. Roelofs JJ, Teske GJ, Bonta PI, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates neutrophil influx during acute pyelonephritis. *Kidney Int* 2009;75:52-9.
36. Park YJ, Liu G, Lorne EF, et al. PAI-1 inhibits neutrophil efferocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:11784-9.
37. Zmijewski JW, Bae HB, Deshane JS, et al. Inhibition of neutrophil apoptosis by PAI-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011;301:L247-54.
38. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011;11:723-37.
39. Fink T, Kazlauskas A, Poellinger L, et al. Identification of a tightly regulated hypoxia-response element in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-1. *Blood* 2002;99:2077-83.
40. Kietzmann T, Samoilenko A, Roth U, et al. Hypoxia-inducible factor-1 and hypoxia response elements mediate the induction of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by insulin in primary rat hepatocytes. *Blood* 2003;101:907-14.
41. Gorlatova NV, Cale JM, Elokda H, et al. Mechanism of inactivation of plasminogen activator inhibitor-1 by a small molecule inhibitor. *J Biol Chem* 2007;282:9288-96.
42. Boe AE, Eren M, Murphy SB, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 antagonist TM5441 attenuates Nomega-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension and vascular senescence. *Circulation* 2013;128:2318-24.
43. Florova G, Azghani A, Karandashova S, et al. Targeting of Plasminogen Activator Inhibitor 1 Improves Fibrinolytic Therapy for Tetracycline Induced Pleural Injury in Rabbits. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014.
44. Ibrahim AA, Yahata T, Onizuka M, et al. Inhibition of plasminogen activator inhibitor type-1 activity enhances rapid and sustainable hematopoietic regeneration. *Stem Cells* 2014;32:946-58.
45. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* 2009;10:R64.

Supplementary Material and methods

Genotyping of mice

Genomic tail DNA was analyzed by PCR. For genotyping wild-type, targeted, and recombined PAI-1 alleles, 3 primers were used: P1: 5'-CCATGTGGGGAGTCAGACATGCTTC-3' forward; P2: 5'-CAGCCATCACAGAGAAGCTATGGACC-3' reverse; P3: 5'-CCAGGCAGATGAGGCTCTTCCAATC-3' reverse. P1 and P2 detect the wild-type endogenous allele (255 bp) and the floxed allele (370 bp), whereas P1 and P3 detect Cre-excised allele (690 bp) (Figure 1A). For detection of full excision neomycin cassette alleles, two primers were used: P2 and P4: 5'-GCTGTACTGGTTCTTGCTCCTTGACAGA-3' forward. A 547-bp PCR product was detected with P1 and P4 when the Flp-mediated excised allele occurred (Figure 1A). Presence or absence of Cre recombinase was assayed with 3 primers: C1: 5'-GCAGGCAGCTCACAAAGGAACAAT-3' forward, C2: 5'-TGTCCTTGCTGAGTGACAGTGGAA-3' reverse, C3: 5'-ATCACTCGTTGCATCGACCGGTAA -3' reverse. C1 and C2 detect the endogenous VE-cadherin locus (therefore absence of Cre) (550 bp), whereas C1 and C3 detect VE-cadherin-Cre recombinase (310 bp). Presence or absence of the ROSA26 fragment was assayed with three primers: R1: 5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT -3' forward, R2: 5'-GCGAAGAGTTTGTCTCAACC-3' reverse, R3: 5'-GGAGCGGGAGAAATGGATATG -3' reverse. R1 and R2 detected the ROSA26 fragment (603 bp), whereas R1 and R3 detected the endogenous locus (therefore absence of ROSA26 fragment) (340 bp).

Experimental procedures

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 13-18). Radiation enteropathy was induced by exposure of an intestinal segment to 19 Gy of radiation as previously described¹⁷. Briefly, control PAI-1^{flx/flx} mice and PAI-1KO^{endo} mice were anesthetized with isoflurane and, after laparotomy, a 3 cm-long intestinal segment (10 cm from the ileocecal valve) was exteriorized and exposed to a single dose of 19 Gy of gamma irradiation (⁶⁰Co source, dose rate 0.8 Gy/minute). Sham-irradiation (Sham-IR) was performed by maintaining the intestinal segment exteriorized without radiation exposure. After radiation exposure or sham-irradiation, the exposed segment was returned to the abdominal cavity and peritoneum/abdominal muscles and skin were separately closed with interrupted sutures. Each animal was used for all experiments described below. Activation of CreER^{T2} recombinase was induced by daily intraperitoneal injections of 1 mg tamoxifen (diluted in 10% EtOH in sunflower oil) for 5 days²². Irradiations occurred one week after the first injection, a time point at which we checked that CreER^{T2} recombinase was functional.

Histology and immunohistochemistry

A part of the intestinal segment was assessed by histological examination and immunohistochemistry. Longitudinal pieces were fixed in 4% formaldehyde solution and embedded in paraffin. 5 µm sections were stained with hematoxylin-eosin-saffron and Sirius red. For β-Gal staining, a part of the intestinal tissues was embedded with Tissue-Tek OCT mounting media and frozen in isopentane cooled by

liquid nitrogen. Assays were performed on 16 μm frozen sections, using the β -Gal staining kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Slides were then counterstained with nuclear fast red (Sigma) according to the manufacturer's instructions. We used the following primary antibodies for immunohistochemistry: rabbit anti-human von Willebrand factor from DAKO, rabbit anti-human fibrinogen from DAKO, rabbit anti-mouse MPO from Abcam, rabbit anti-mouse CD68 from Abcam, rabbit anti-mouse CD206 from Abcam, rabbit anti-mouse iNOS from Abcam and anti-rat E-cadherin (Clone ECDD2) from Life Technology. Goat anti-rabbit Alexa fluor⁵⁶⁸, goat anti-rat Alexa fluor⁵⁶⁸ and goat anti-rabbit Alexa fluor⁴⁸⁸ (Molecular Probes) were used as secondary antibodies for immunofluorescent labeling. ImmPress Reagent anti-rabbit Ig (Vector Labs) and Histogreen (Abcys) were used for visible IHC labels.

For fluorescent labeling, all images were recorded using a Zeiss LSM 780 confocal microscope. For E-cadherin/TUNEL double staining, TUNEL staining was performed using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions. Epithelial cells and apoptotic epithelial cells were counted in about 60 crypt sections per sample from the same animals.

Semi-quantitative fibrin deposition score was determined by two authors in a blinded manner and ranged from 0 (no deposition) to 4 (strong deposition). Discrepancies were resolved by discussion.

For immune cell staining (CD68 and MPO), scoring was determined according to the number of cells present in the tissue. Following a first reading, a score was attributed to each animal, ranging from 0 (sham-IR mice) to 4 (maximum number of observed cells) or 2 (minimum number of observed cells). Score was determined in a blinded manner.

M1 type macrophages (CD68+/iNOS+) were quantified as follows. For each mouse, three images were recorded using a Zeiss LSM 780 confocal microscope and double-labeled cells were counted. For each image, the length of intestine was determined and the results were presented as the number of (CD68+/iNOS+)/length unit (here 1000 μm).

M2 type macrophages (CD68+/CD206+) were quantified as follows. For each mouse, three images were recorded using a Zeiss LSM 780 confocal microscope and for each color (red for CD68 or green for CD206) a threshold was determined and fixed. Images were processed using Zen software for automatic quantification of the pixel number of each color or both of them. Results were presented as relative quantification of M2 type macrophages, which represent the ratio between the number of pixels with the two colors and the number of pixels corresponding only to the red (CD68).

RNA isolation, reverse transcription, real-time qPCR and TLDA

Total RNA was prepared with the total RNA isolation kit (Rneasy Mini Kit; Qiagen). After quantification on a NanoDrop ND-1000 apparatus (NanoDrop Technologies), 1 μg of RNA was used for reverse transcription with the High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Pre-developed TaqMan Gene Expression Assays and TaqMan Mouse Immune Array (Applied Biosystems) were used according to the manufacturer's instructions. PCR was performed with the ABI PRISM 7900 Sequence detection system (Applied Biosystems). PCR fluorescent signals were normalized to a PCR fluorescent signal obtained from the housekeeping gene 18S. Relative mRNA quantification was

performed by using the comparative $\Delta\Delta\text{CT}$ method. Data Assist software was used for TLDA analyses to perform hierarchical clustering analyses (heat map) as well as volcano plots with a fold change cut-off of 1.5 and an adjusted p-value < 0.05 using the Benjamini-Hochberg false discovery rate. Normalization was performed using a global normalization method, *i.e.* the software first finds the common assays among all samples and the median CT of those assays is used as the normalizer, on a per sample basis⁴⁵. Pathway Studio 10.0 along with ResNet 11.0 from Elsevier, the database of functional relationships and pathways of mammalian proteins (www.elsevier.com/pathway-studio), was used for pathway analysis and gene ontology enrichments.

Statistical analysis

Data are given as means \pm SEM. Statistical analyses were performed by analysis of variance with a level of significance of $p < 0.05$. Mouse survival curves were calculated by the Kaplan Meier method and compared using the log rank test.

Figure 1

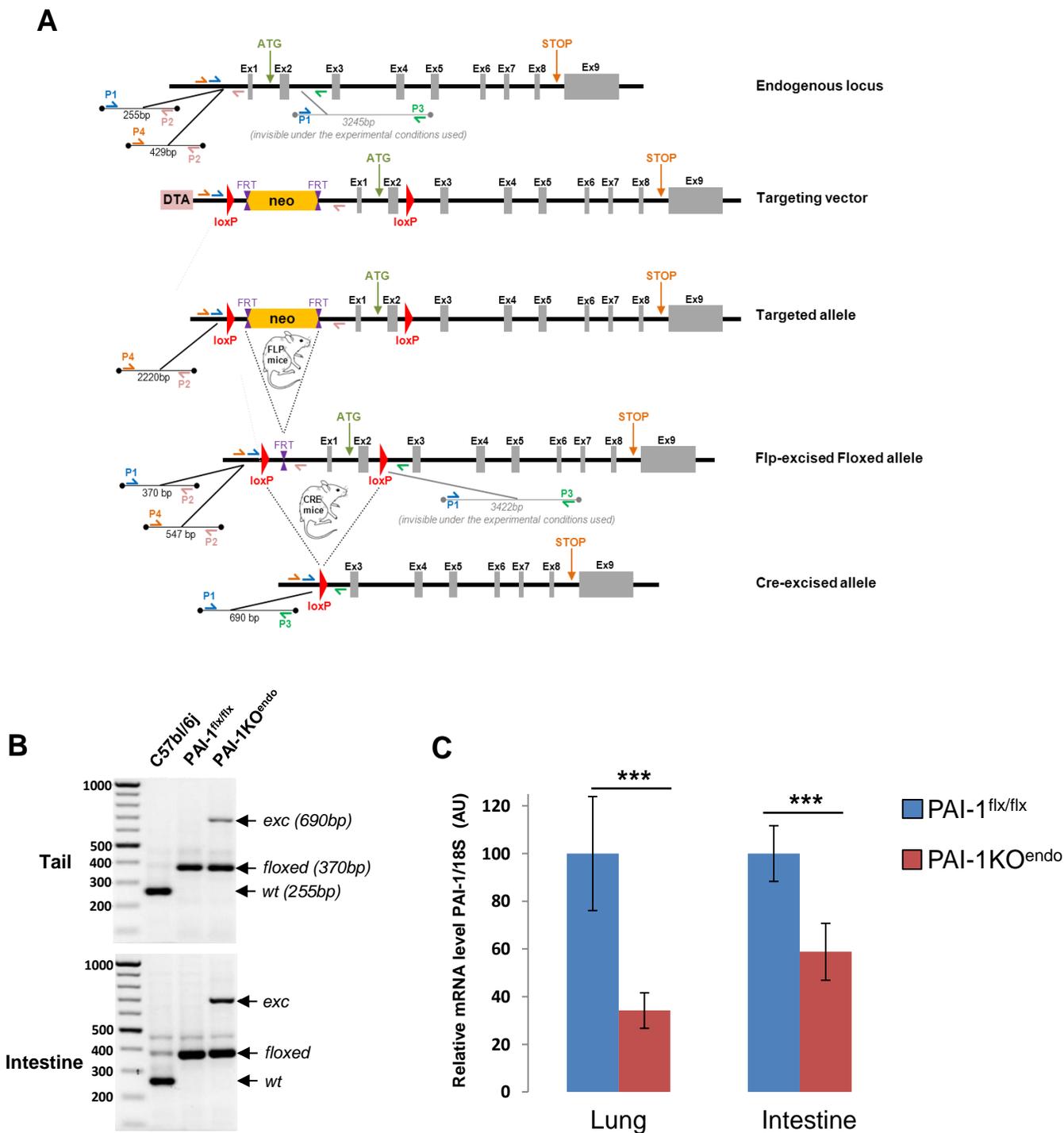


Figure 1. Generation of endothelium-specific PAI-1 knockout mice.(A) Molecular targeting strategy. Primers P1 to P4 used for PCR analysis are indicated on alleles. P1-P2 and P1-P3 products are used for mice genotyping, while P2-P4 products are used for neo-cassette excision checking. ex=exon; DTA=diphtheria toxin A fragment gene; neo= neomycin cassette; FLP=flip-flop recombinase; FRT=Flp recognition target; loxP=locus of X-over P1; Cre=cyclic recombinase; ATG=start codon; STP=stop codon. (B) Genotype identification from DNA tail by PCR to discriminate wild-type, floxed (floxed) and excised (exc) PAI-1 alleles. Genotype was also checked in gut. (C) Relative PAI-1 mRNA level was measured by RT-qPCR in lung and intestinal tissue in PAI-1^(flx/flx) and PAI-1KO^{endo} mice (n=10 mice per group). Results are means \pm SEM; ***, t-test $P < 0.01$.

Figure 2

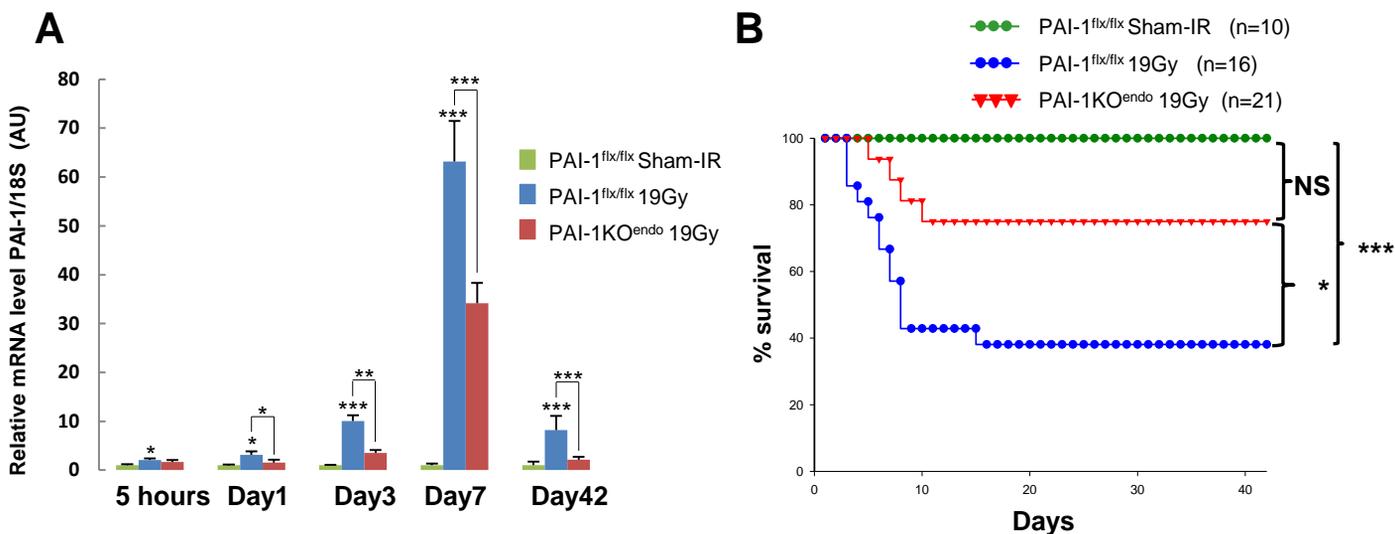


Figure 2. PAI-1 endothelial deletion limits radiation-induced up-regulation of intestinal PAI-1 expression and protects mice from death in a radiation-induced enteritis model. (A) Relative PAI-1 mRNA level was measured by RT-qPCR in intestinal tissue in PAI-1^{flx/flx} sham-IR, and in irradiated PAI-1^{flx/flx} and PAI-1KO^{endo} mice. Results are means \pm SEM with * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ with $n = 8$ to 12 mice per group. (B) Kaplan-Meier analyses representing the percent survival of irradiated PAI-1^{flx/flx} mice and PAI-1KO^{endo} mice. The log rank test was used for statistical analyses with NS, non-significant, *, $P < 0.05$ and ***, $P < 0.001$

Figure 3

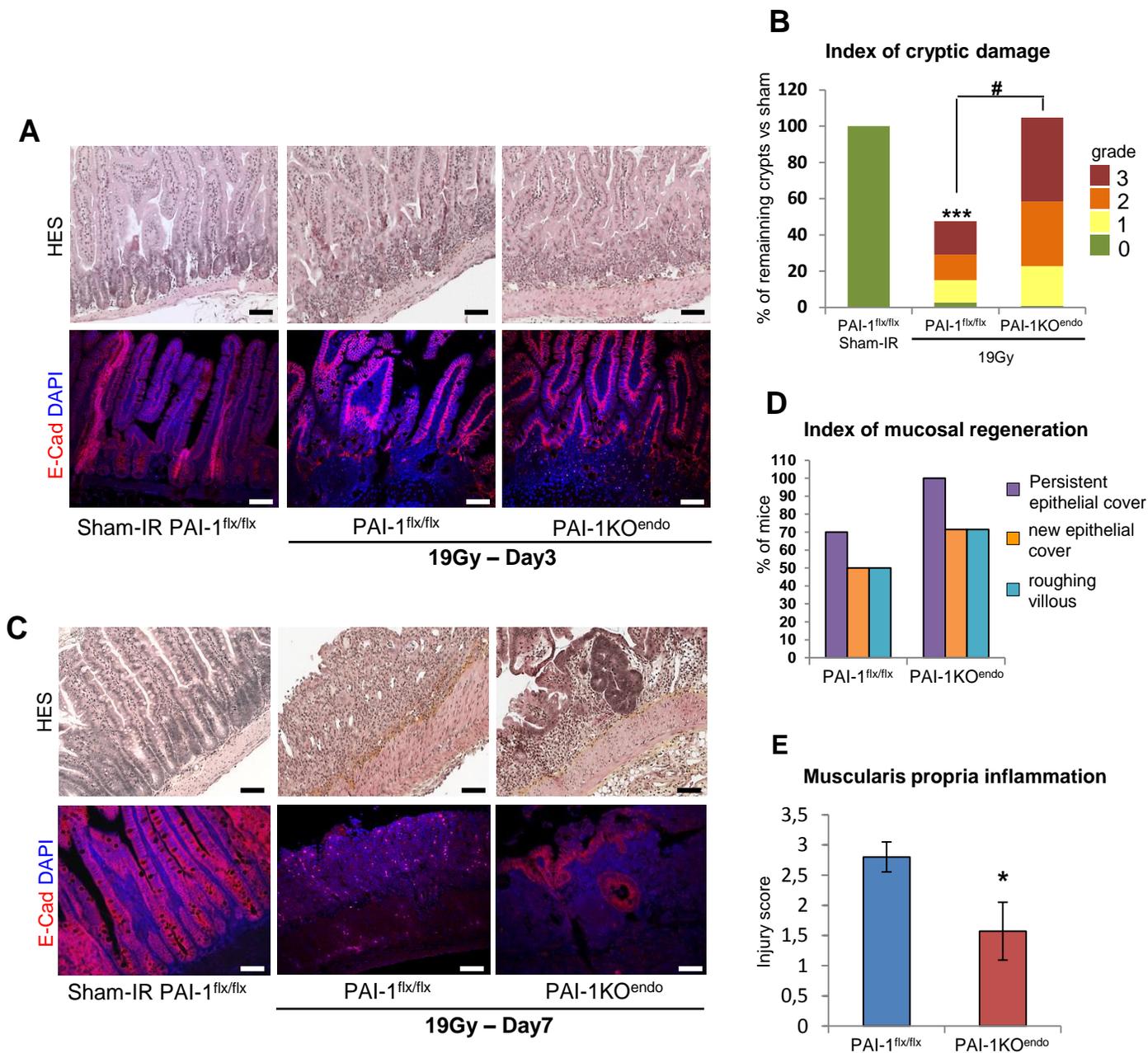


Figure 3. Endothelial-specific PAI-1 deletion limits acute radiation enteritis. (A) Representative microscopic alterations obtained in PAI-1^{flx/flx} and PAI-1^{KOendo} 3 days after irradiation. Slides were stained with hematoxylin-eosin-saffron (upper panels) or with antibody against E-cadherin (red) and counterstained with DAPI (blue) (lower panels). Scale bar = 100 μ m. (B) The number of crypts as well as the severity of cryptic damage were evaluated for each group. The number of crypts is expressed as a percentage of sham-IR mice. *** $P < 0.001$ versus PAI-1^{flx/flx} sham-IR mice; # $P < 0.01$ versus PAI-1^{flx/flx}/19 Gy mice (8 to 12 mice per group). For each group, crypts are categorized according to severity of their damage. Lesions range from grade 0 (no lesion) to 3 (phantom crypt). Results are expressed as a percentage of total crypts. (C) Representative microscopic alterations obtained in PAI-1^{flx/flx} and PAI-1^{KOendo} 7 days after irradiation. (D) Parameters of mucosal regeneration were evaluated. Results are expressed as a percentage of mice showing these parameters with 8 to 12 mice per group. (E) Evaluation of the severity of muscularis propria inflammation. Scoring ranges from 0 (no lesion) to 4 (loss of muscularis propria). * $P < 0.01$.

Figure 4

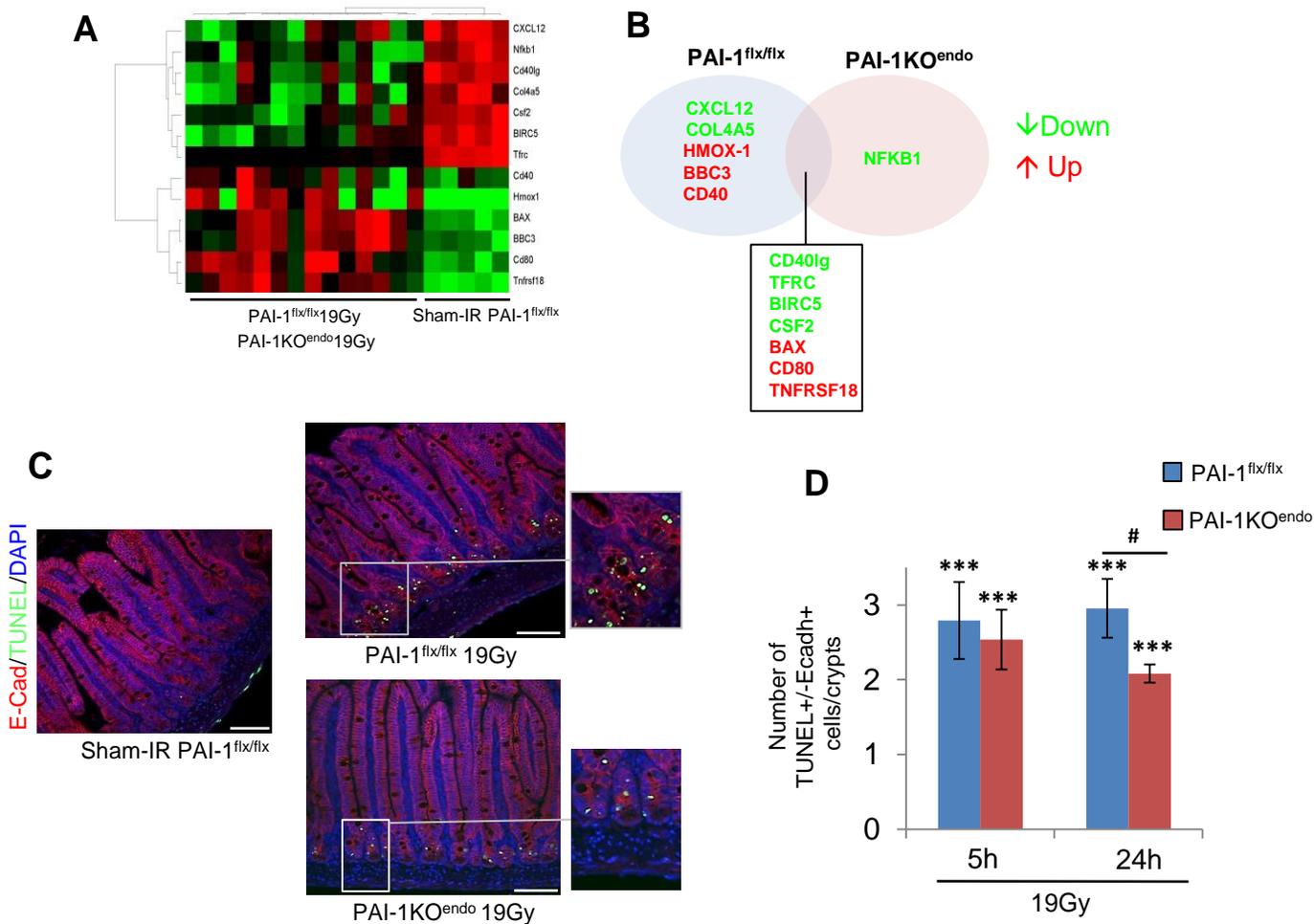


Figure 4. Endothelial-specific PAI-1 deletion reduces acute radiation-induced epithelial cell death. (A) Gene expression profiles (5 hours after irradiation) with significant differences between sham-IR and irradiated mice were visualized by a heat map. (B) Venn diagram of genes with a significant mRNA level modification in irradiated PAI-1^{flx/flx} and PAI-1KO^{endo} mice compared with the sham-IR group. (C) Representative microscopic alterations obtained in PAI-1^{flx/flx} mice and PAI-1KO^{endo} mice, irradiated or not. Slides were double-stained with antibody against E-cadherin (red) and TUNEL labeling (green), then counterstained with DAPI (blue). Scale bar = 100 μm. (D) The number of apoptotic cells in crypts was evaluated for each group (n=6 mice per group). Results are expressed as number of epithelial apoptotic cells per crypt. *** P<0.001 versus PAI-1^{flx/flx} sham mice; # P<0.01 versus PAI-1^{flx/flx} 19 Gy.

Figure 5

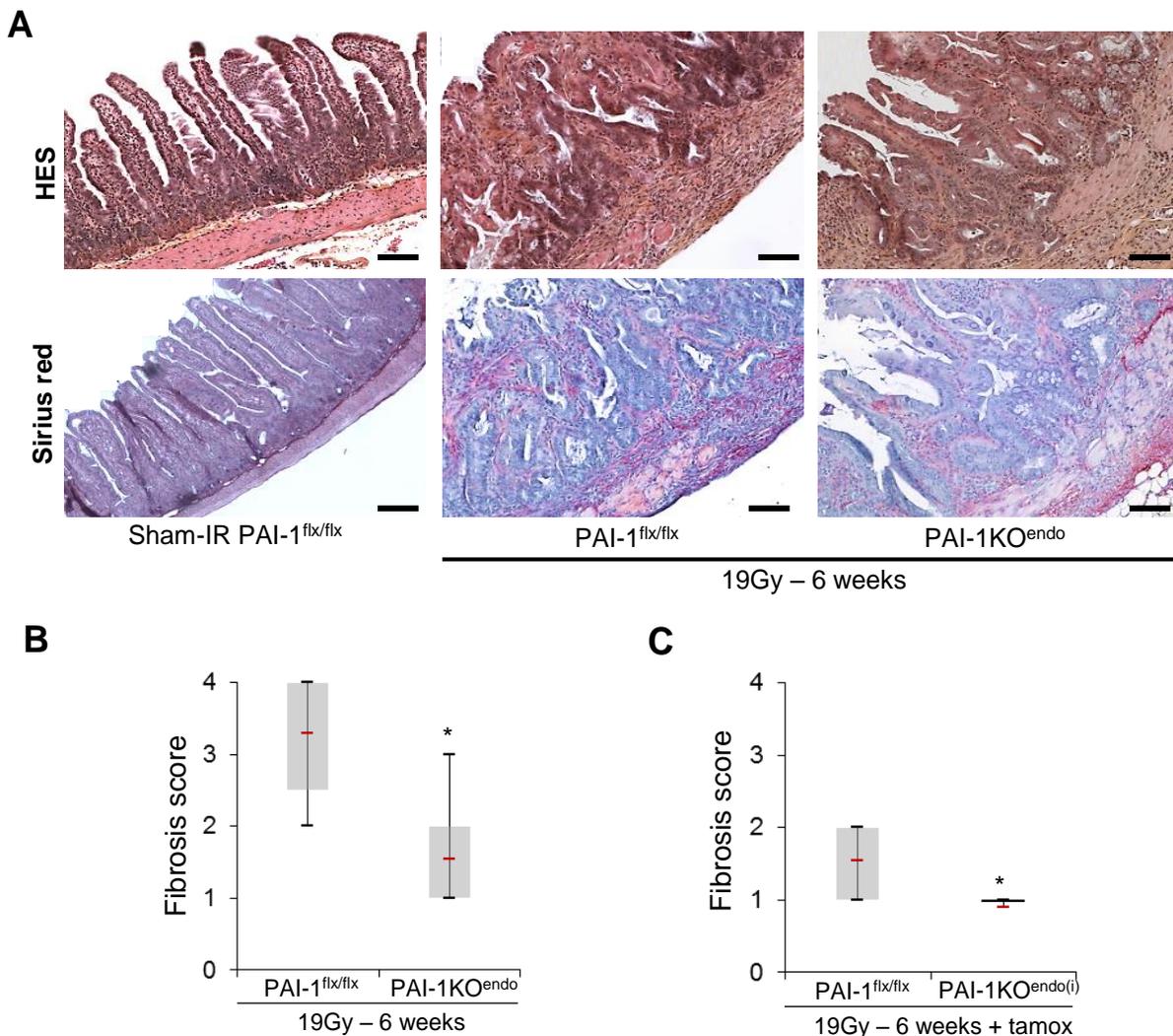


Figure 5. Constitutive and inducible endothelial-specific PAI-1 deletion limits fibrosis following a single high-dose radiation exposure. (A) Representative microscopic alterations obtained in PAI-1^{flx/flx} mice and PAI-1KO^{endo} mice 6 weeks after irradiation. Slides were stained with hematoxylin-eosin-saffron (upper panels) or Sirius red (lower panels). Scale bar = 100 μ m n=5 for PAI-1^{flx/flx}sham-IR mice; n=8 for other groups. Fibrosis score in constitutive (B) or inducible (C) PAI-1KO^{endo} mice (named PAI-1KO^{endo(i)}). Scores ranged from 0 (no damage) to 4 (severe fibrosis). All sham-IR mice displayed a score of 0 (not shown). For experiments with inducible mice, the 3 groups were treated in the same conditions with tamoxifen. n=5 for PAI-1^{flx/flx}sham-IR mice (scores of 0 are not shown) and n=8 to 11 for the other groups. * P<0.05.

Figure 6

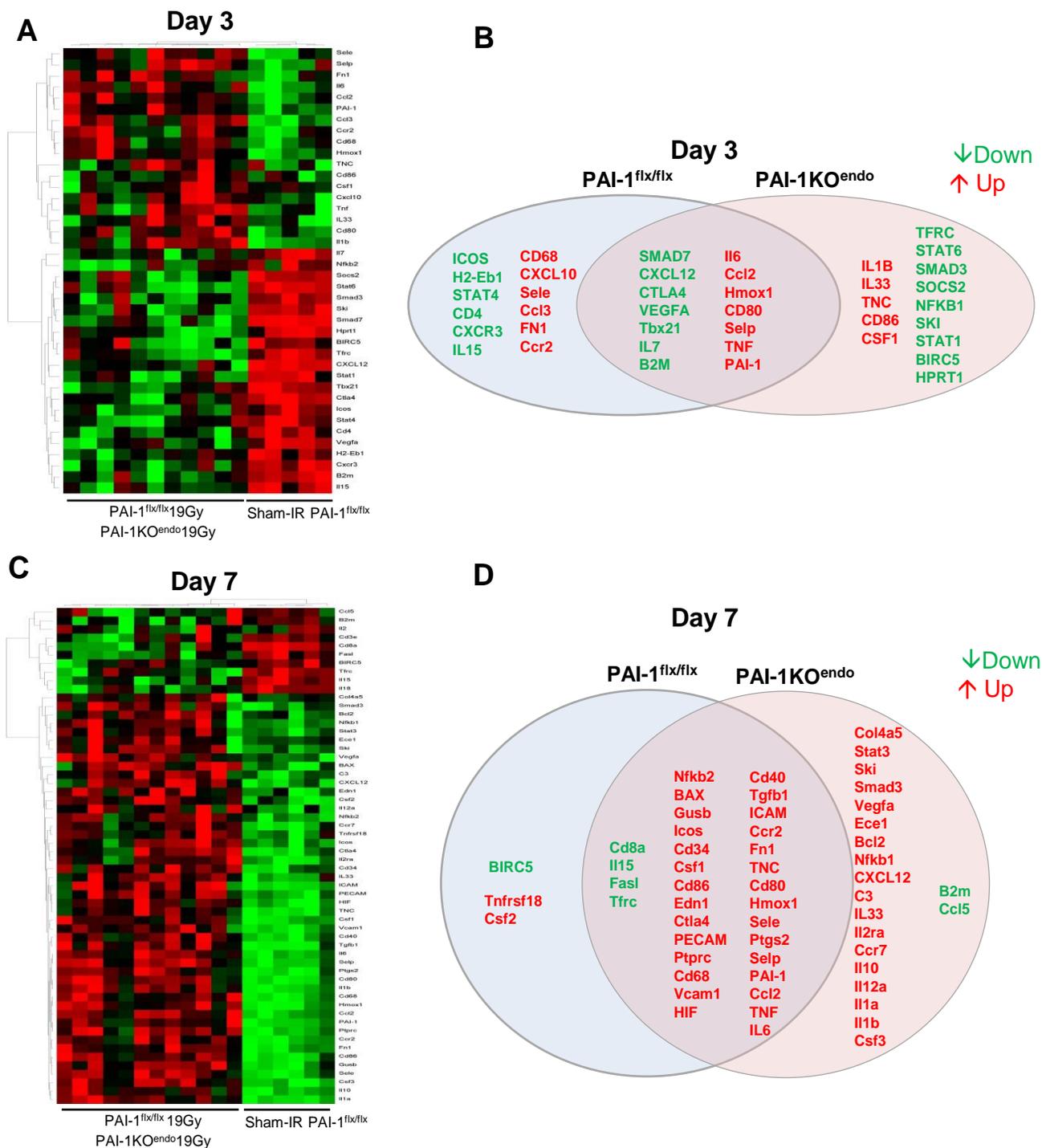


Figure 6. Endothelial-specific PAI-1 deletion impacts the molecular profile associated with immune-related genes in irradiated intestinal tissue. Gene expression profiles 3 days (A) and 7 days (B) after irradiation showing significant differences between sham-IR and irradiated mice are visualized in the heat map. (C) and (D) Corresponding Venn diagrams of genes with a significant change in mRNA level in irradiated PAI-1^{flx/flx} mice and PAI-1KO^{endo} mice compared with the sham-IR group.

Figure 7

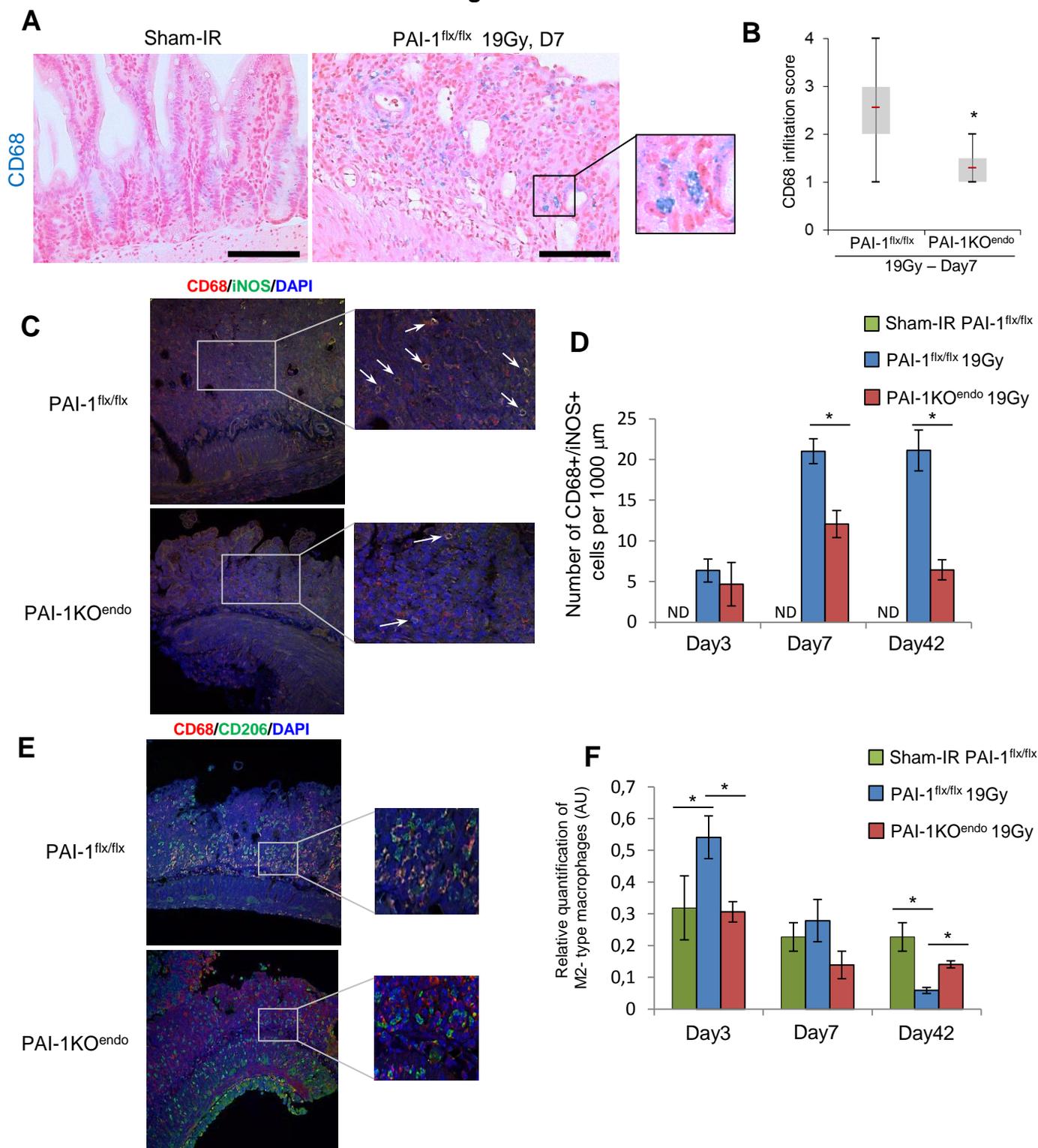
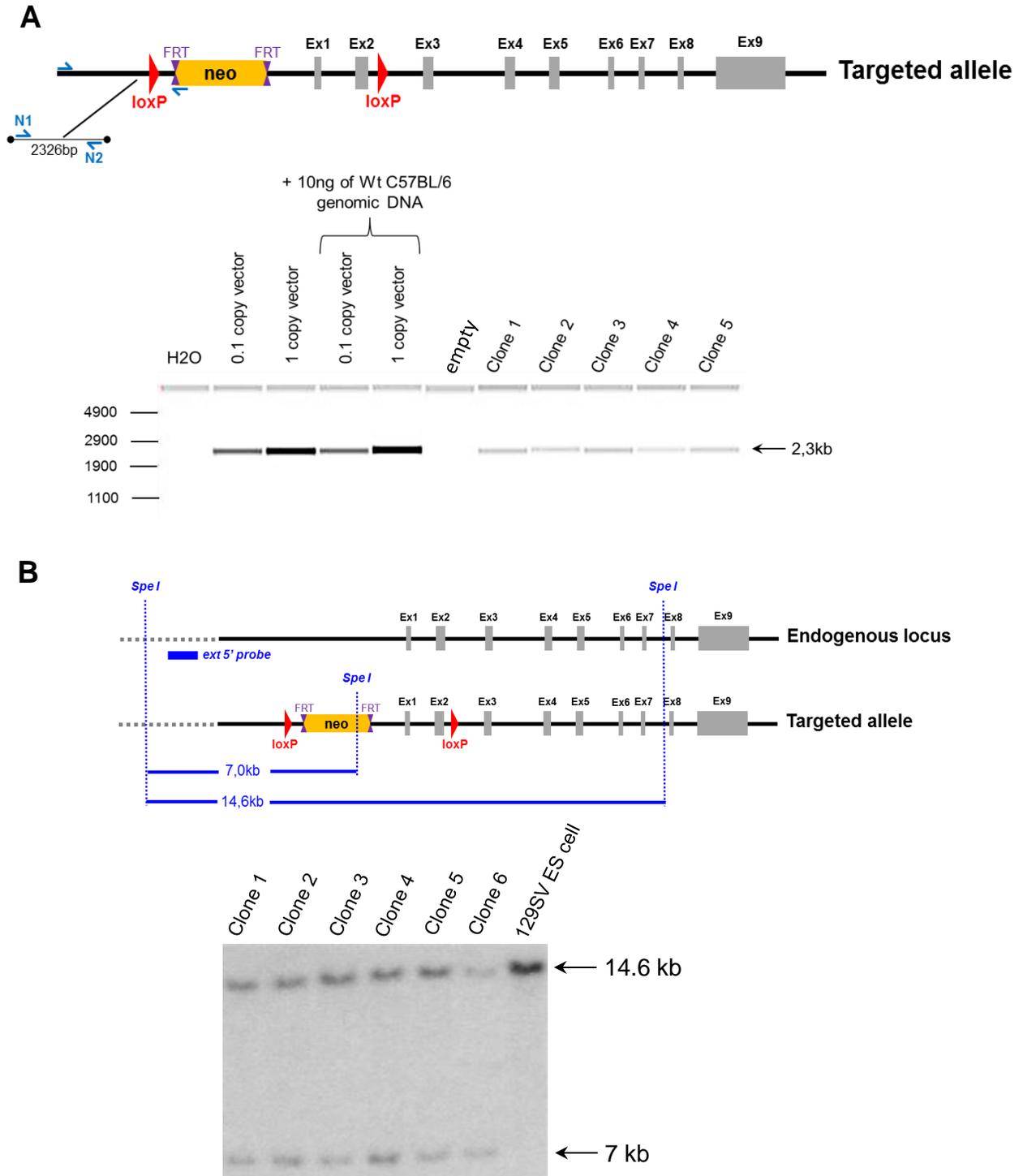


Figure 7. Conditional endothelium-specific PAI-1 deletion limits macrophage infiltration and influences macrophage M1/M2 polarization. (A) Representative labeling of macrophages in intestinal tissue 7 days after irradiation. Slides were stained with antibodies against CD68 (blue) and counterstained with nuclear fast red (pink). Scale bar = 100 μ m. (B) Macrophage scoring. Scores ranged from 0 (sham-IR) to 4 (maximum macrophage count). $n=6$ for sham-IRPAI-1^{flx/flx} mice, $n=8$ for PAI-1^{flx/flx} 19 Gy mice, and $n=6$ for PAI-1KO^{endo} 19 Gy mice. * $P<0.01$; (C) Representative double labeling of M1 macrophages in intestinal tissue 1 week after irradiation. Slides were stained with antibodies against CD68 (red) and iNOS (green) and counterstained with DAPI. (D) Quantification of M1 macrophages (yellow merging signal) in sham-IRPAI-1^{flx/flx} mice, PAI-1^{flx/flx} 19 Gy mice and PAI-1KO^{endo} 19 Gy mice at 3, 7 and 42 days after irradiation. * $P<0.05$ ND: not detected in sham-IR mice. (E) Representative double labeling of M2 macrophages in intestinal tissue 7 days after irradiation. Slides were stained with antibodies against CD68 (red) and CD206 (green) and counterstained with DAPI. (F) Quantification of M2 macrophages (yellow merging signal) in sham-IR PAI-1^{flx/flx} mice, PAI-1^{flx/flx} 19 Gy mice and PAI-1KO^{endo} 19 Gy mice at 3, 7 and 42 days after irradiation. For all experiments, $n=6$ for sham-IRPAI-1^{flx/flx} mice, $n=8$ for PAI-1^{flx/flx} 19 Gy mice, and $n=6$ for PAI-1KO^{endo} 19 Gy mice. * $P<0.05$

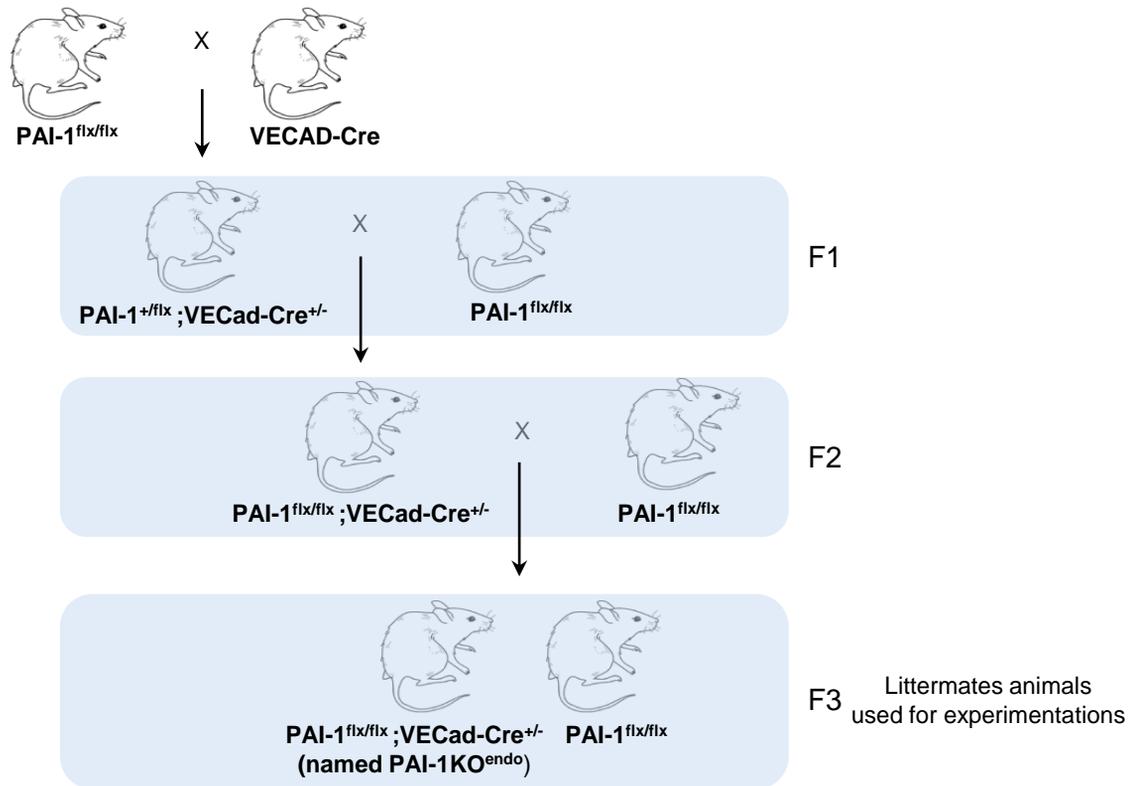
Supplementary Figures S1 to S13
Supplementary Table 1 and 2

Supplementary Figure 1



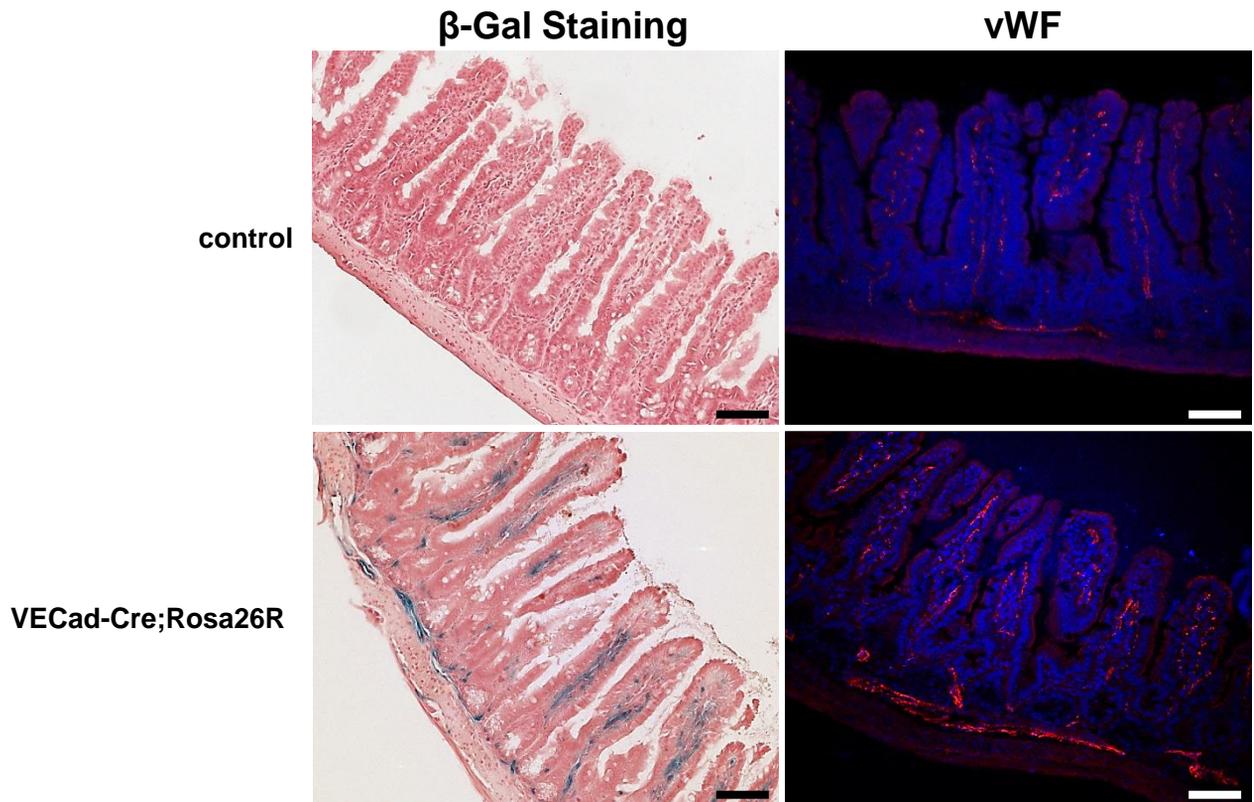
Supplementary Figure 1: Screening of isolated ES-positive clones. (A) Representative screening of G418-resistant ES cell clones. The 2.3 kb band, using primers N1 and N2, represents the targeted allele. Targeted vectors were used as positive control with two quantities loaded 0.1 or 1 copy alone or in the presence of 10 ng of C57BL/6 genomic DNA, which serves as a negative control. (B) A representative southern blot of six G418-resistant ES clones digested with *SpeI* is shown. The 14.6 kb band for the endogenous allele and the 7 kb band for the targeted allele are indicated. 129SV ES cell serves as a negative control for the targeted allele.

Supplementary Figure 2



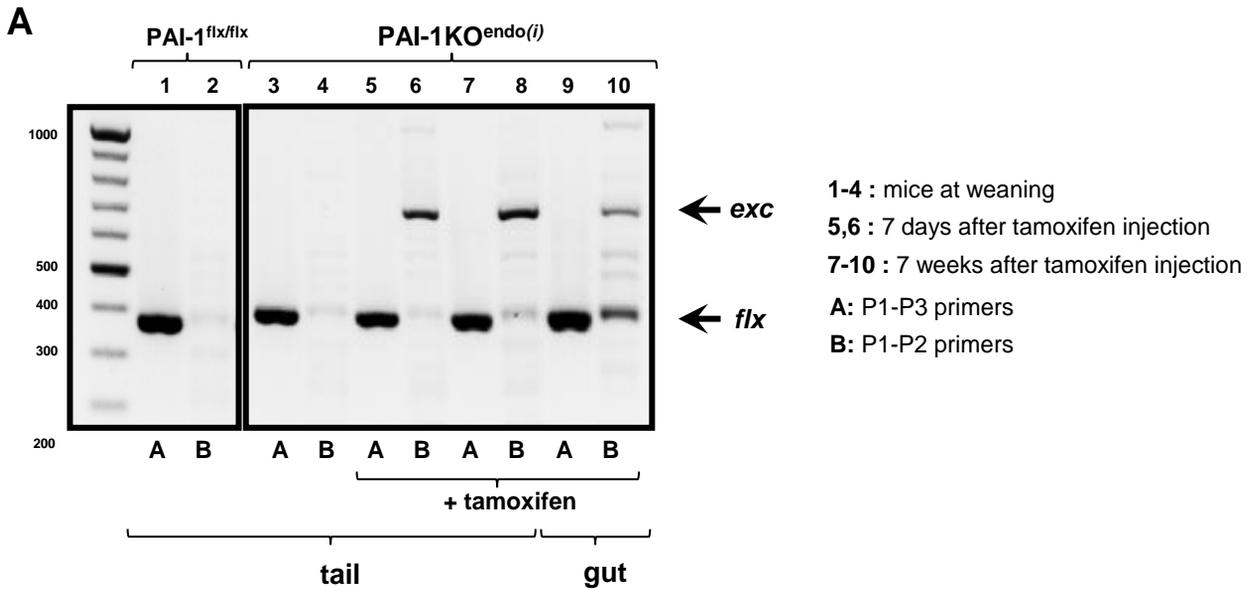
Supplementary Figure 2. Global breeding scheme for producing transgenic mice for experiments.

Supplementary Figure 3



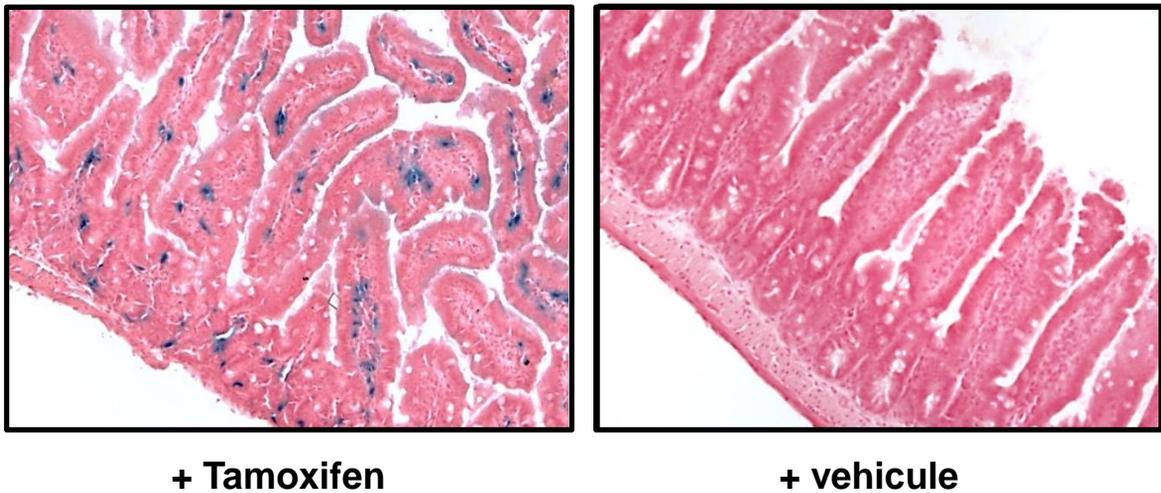
Supplementary Figure 3. Specific recombination events in endothelium in intestinal tissue. Recombination events were checked using ROSA26R reporter mice. LacZ staining (left) of gut from control ROSA26R (up) or VeCad-Cre/ROSA26R (down). Immunolabeling of von Willebrand factor is shown (right). Scale bar = 100 μ m.

Supplementary Figure 4



B

VECad-CreER^{T2};Rosa26R



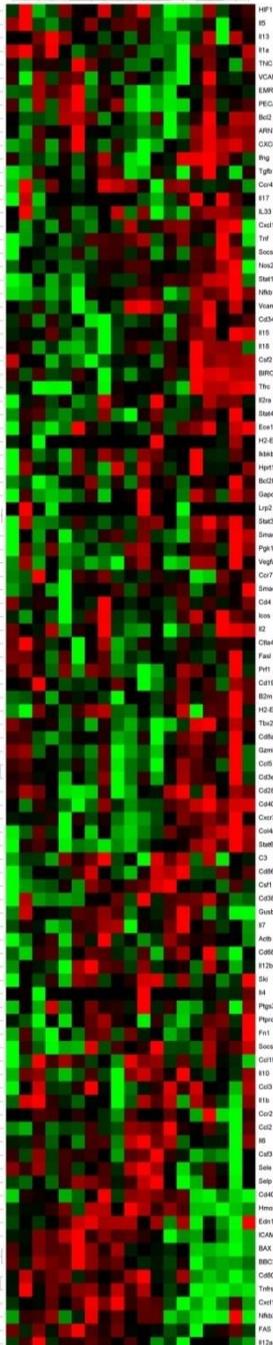
Supplementary Figure 4. (A) Genotype identification from DNA tail by PCR to discriminate PAI-1 floxed or excised allele in PAI-1^{KO^{endo(i)}} mice, 1 and 7 weeks after the first tamoxifen injection. The excised allele was also checked in gut. (B) LacZ staining of gut from control VECad-CreER^{T2}/ROSA26R 14 days after the first tamoxifen injection (left) or treated with vehicle solution (right).

Supplementary Figure 5

A

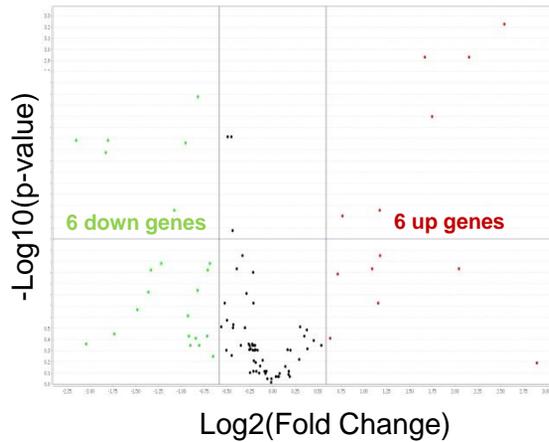
PAI-1^{flx/flx} 19Gy n=8
PAI-1 KO^{endo} 19Gy n=6 Sham-IR PAI-1^{flx/flx} n=5

1 2 1 2 3 3 4 4 5 5 6 6 1 2 3 4 5

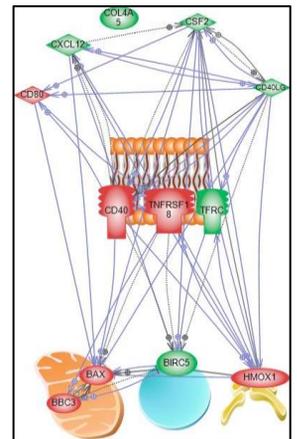


B

PAI-1^{flx/flx} 19Gy versus Sham-IR PAI-1^{flx/flx}

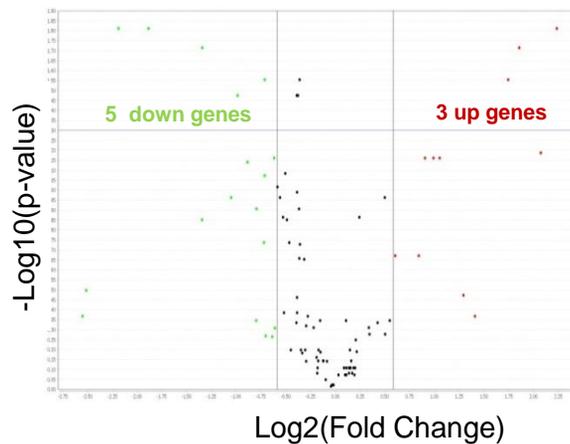


C

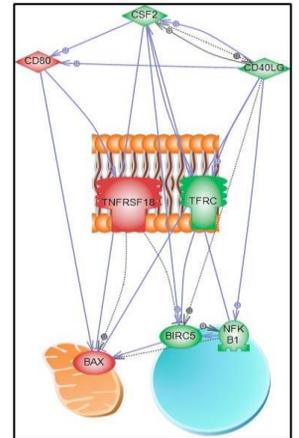


D

PAI-1KO^{endo} 19Gy versus Sham-IR PAI-1^{flx/flx}



E

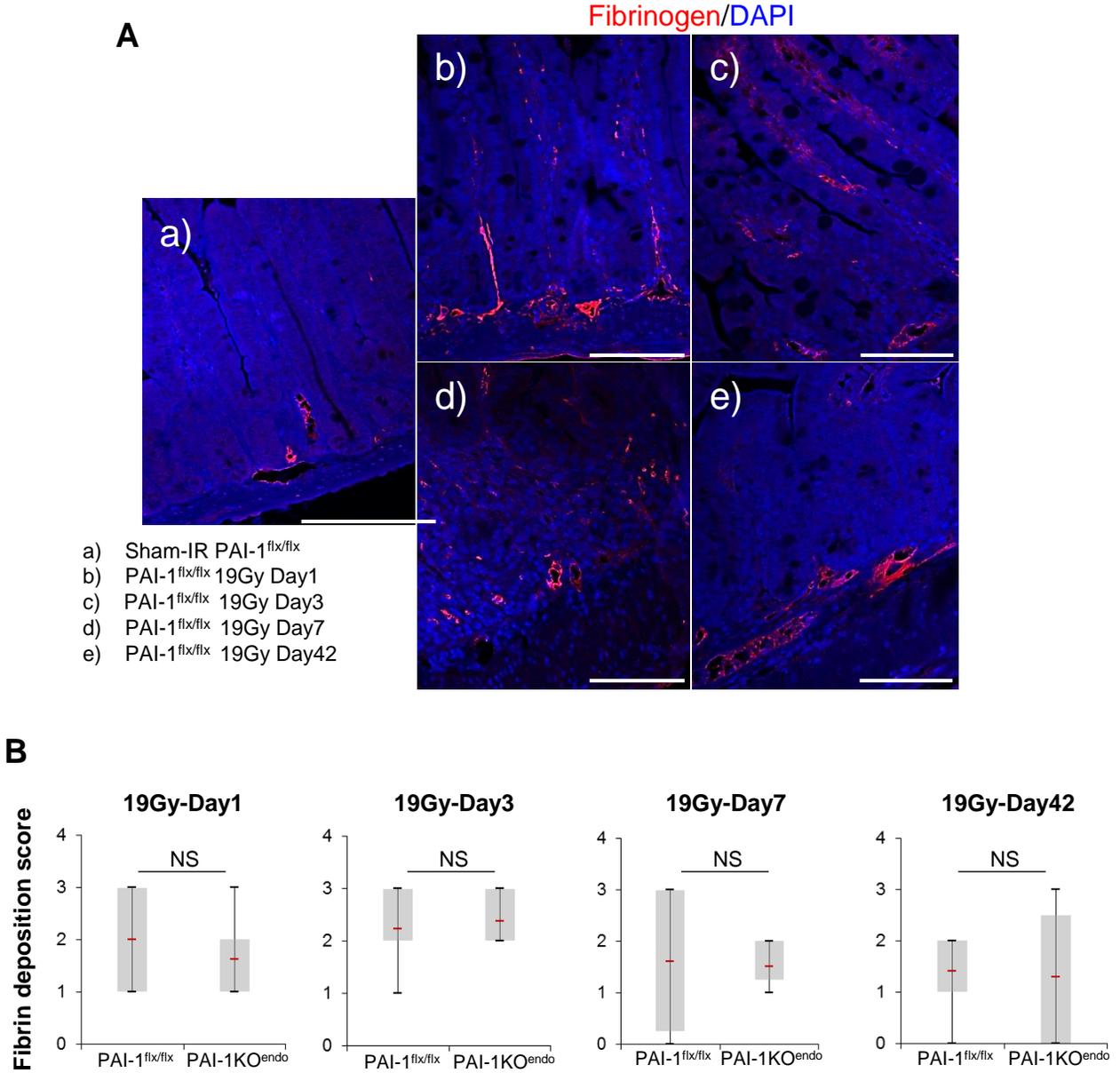


F

gene	5 hours after irradiation			
	PAI-1 ^{flx/flx} 19 Gy vs Sham-IR PAI-1 ^{flx/flx}	P-value (FDR)	PAI-1KO ^{endo} vs Sham-IR PAI-1 ^{flx/flx}	P-value (FDR)
BAX	3,13	0,001	3,35	0,028
BBC3	3,31	0,003		
BIRC5	0,22	0,007	0,27	0,016
CD40	1,68	0,041		
CD40lg	0,28	0,007	0,50	0,034
CD80	4,40	0,002	3,61	0,019
CSF2	0,46	0,019	0,39	0,019
CXCL12	0,56	0,003		
Hmox1	2,24	0,033		
NFKB1			0,61	0,028
TNFRSF18	5,73	0,001	4,70	0,016
Co14A5	0,51	0,009		

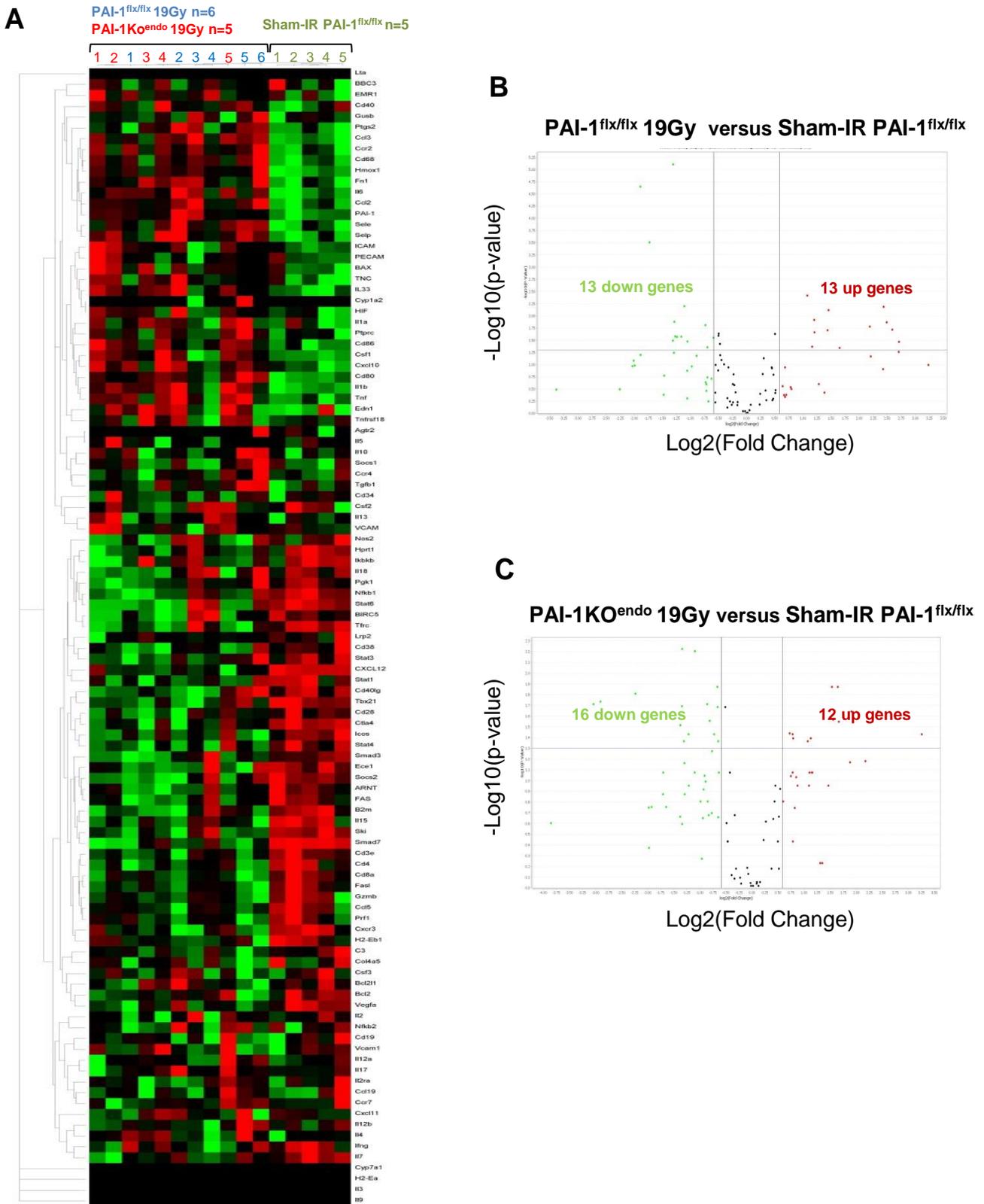
Supplementary Figure 5. Differential expression of inflammation/immune-related genes in the mouse intestine 5 hours after irradiation. (A) Hierarchical clustering analyses were performed and the results were visualized in the heat map. (B-D) Volcano plot analyses with a fold change boundary of 1.5 and an adjusted P-value ≤ 0.05 using the Benjamini-Hochberg false discovery rate. (C-E) Molecular pathways were built using Pathway Studio software based on differential expression of inflammation/immune-related genes in the mouse intestine 5 hours after irradiation. Pathways obtained in irradiated PAI-1^{flx/flx} mice (C) and irradiated PAI-1KO^{endo} mice (E) compared with sham PAI-1^{flx/flx} mice. (F) Table of fold changes and adjusted P-values of differentially expressed genes.

Supplementary Figure 6



Supplementary Figure 6. Endothelial inactivation of PAI-1 does not affect the radiation-induced microvascular fibrin deposition (A) Fibrin deposition was visualized by immunolabeling with antibodies against fibrinogen/fibrin (red) and counterstaining with DAPI (blue). Representative images obtained in PAI-1^{flx/flx} mice at 1, 3, 7 and 42 days after irradiation. (B) Fibrin deposition score in PAI-1^{flx/flx} mice and PAI-1^{KO^{endo}} mice 1 to 42 days after irradiation with n=7 to 10 mice per group. For all sham group mice (not shown) scores were 0.

Supplementary Figure 7

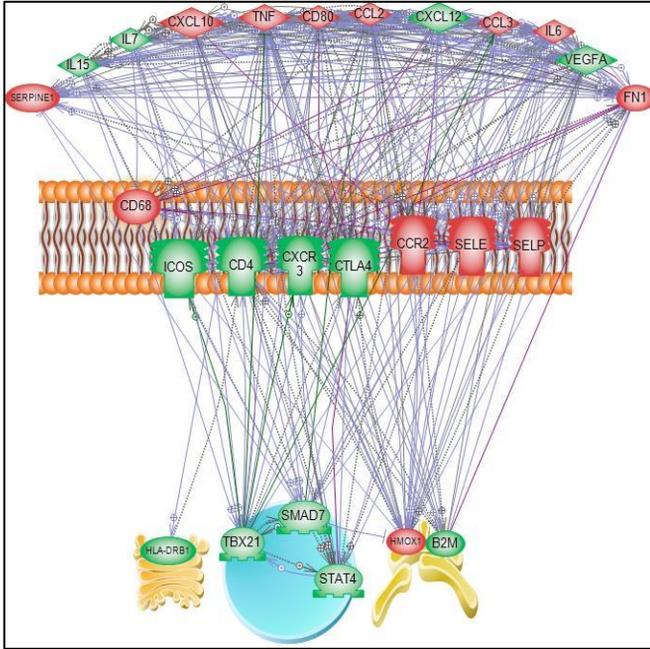


Supplementary Figure 7. Differential gene expression of inflammation/immune-related genes in the mouse intestine 3 days after irradiation. (A) Hierarchical clustering analyses were performed and results were visualized in the heat map. (B-C) Volcano plot analyses with a fold change boundary of 1.5 and an adjusted p-value ≤ 0.05 using the Benjamini-Hochberg false discovery rate.

Supplementary Figure 8

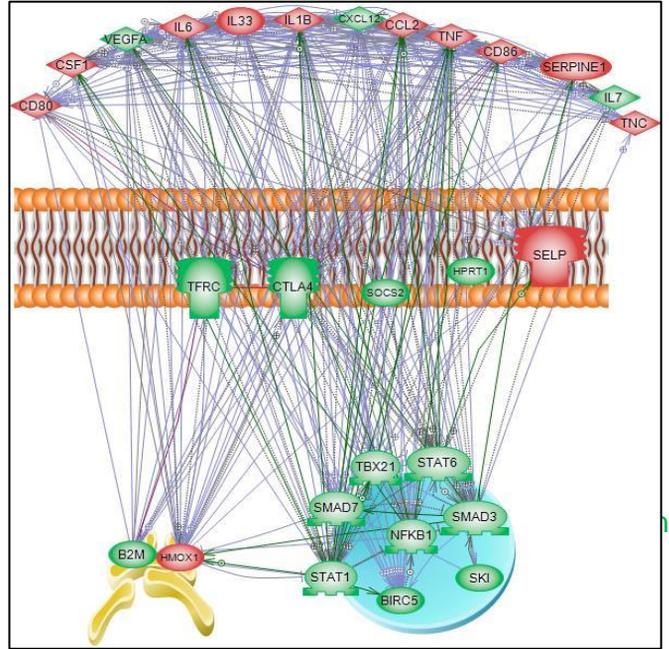
A

PAI-1^{flx/flx} 19Gy versus Sham-IR PAI-1^{flx/flx}



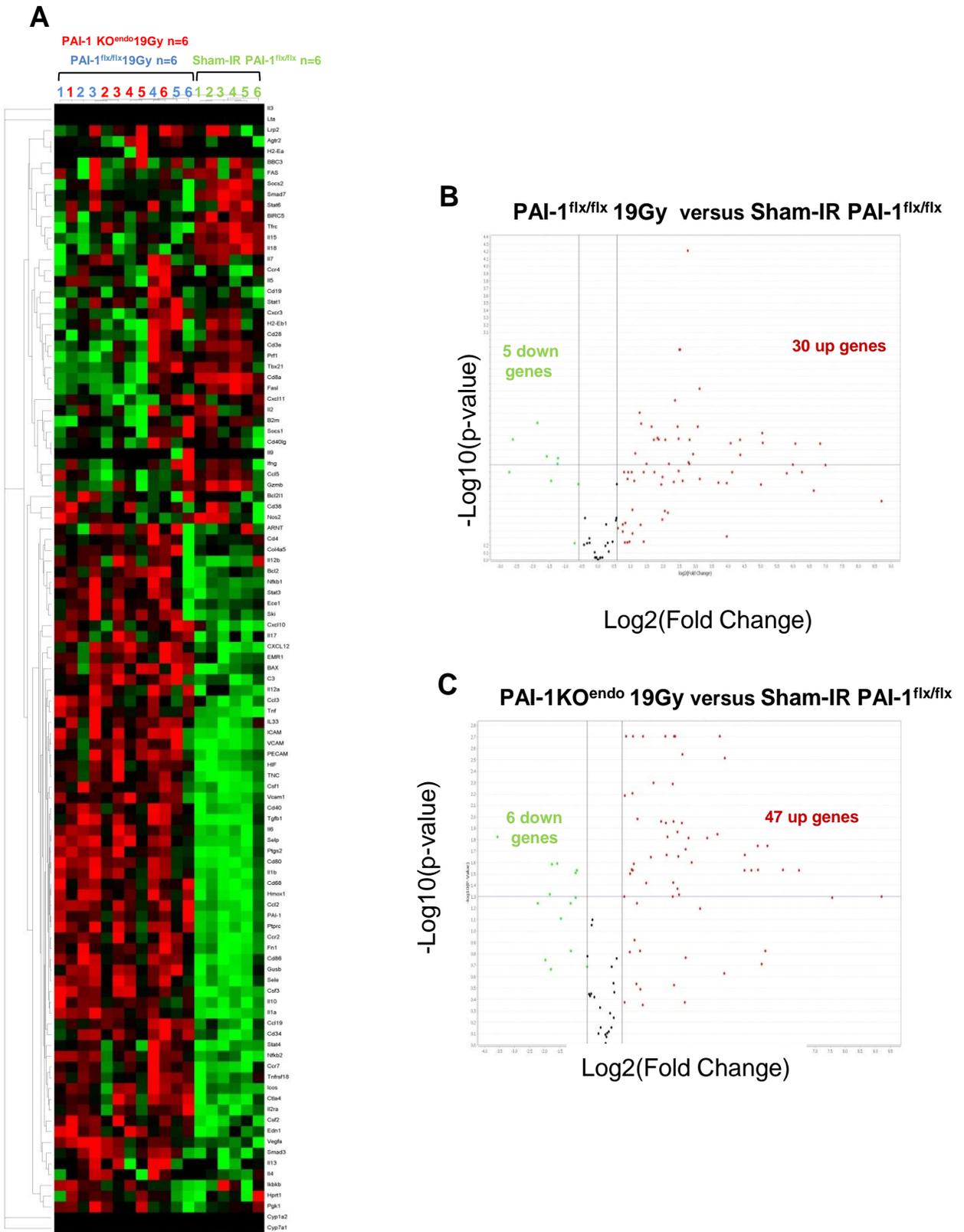
B

PAI-1KO^{endo} 19Gy Versus Sham-IR PAI-1^{flx/flx}



Supplementary Figure 8. Interactomes of the differentially expressed genes related to inflammation-immunity established using Pathway Studio software (mouse intestine 3 days after irradiation). Interactomes obtained in irradiated PAI-1^{flx/flx} mice (A) and irradiated PAI-1KO^{endo} mice (B) compared with sham-IR PAI-1^{flx/flx} mice. Red, up-regulated, green, down-regulated

Supplementary Figure 9

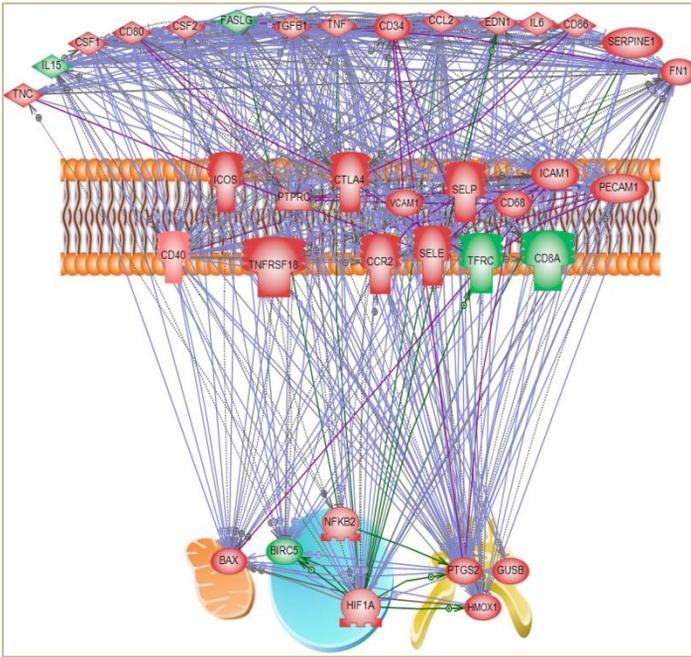


Supplementary Figure 9. Differential gene expression of inflammation/immune-related genes in the mouse intestine 7 days after irradiation. (A) Hierarchical clustering analyses were performed and results were visualized in the heat map. (B-C) Volcano plot analyses with a fold change boundary of 1.5 and an adjusted p-value ≤ 0.05 using the Benjamini-Hochberg false discovery rate.

Supplementary Figure 10

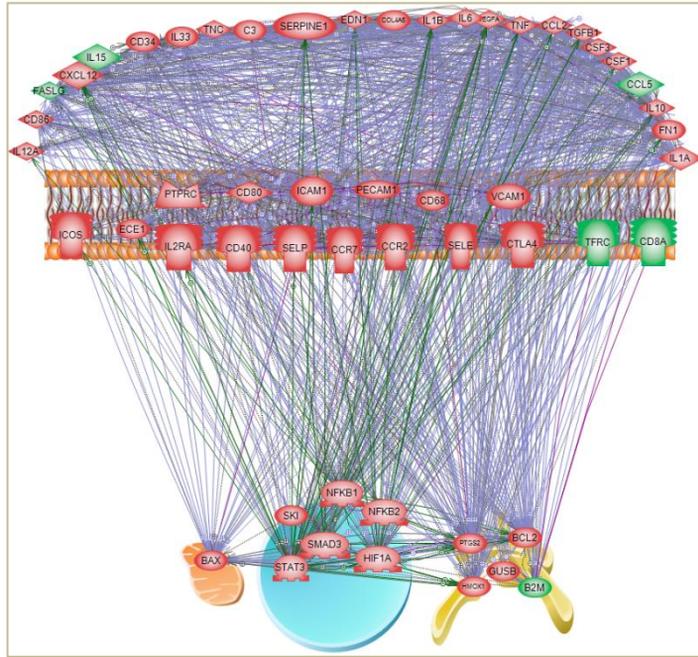
A

PAI-1^{flx/flx} 19Gy versus Sham-IR PAI-1^{flx/flx}



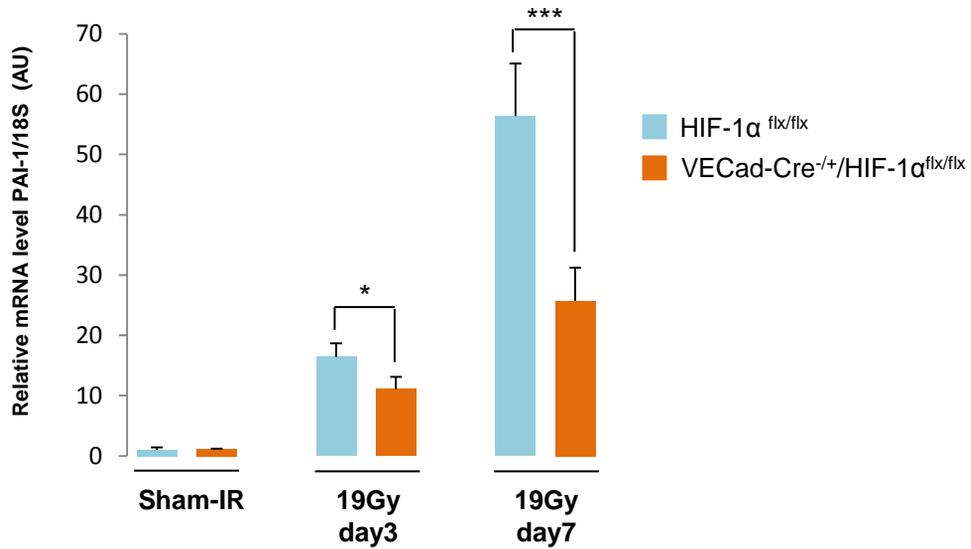
B

PAI-1KO^{endo} 19Gy versus Sham-IR PAI-1^{flx/flx}



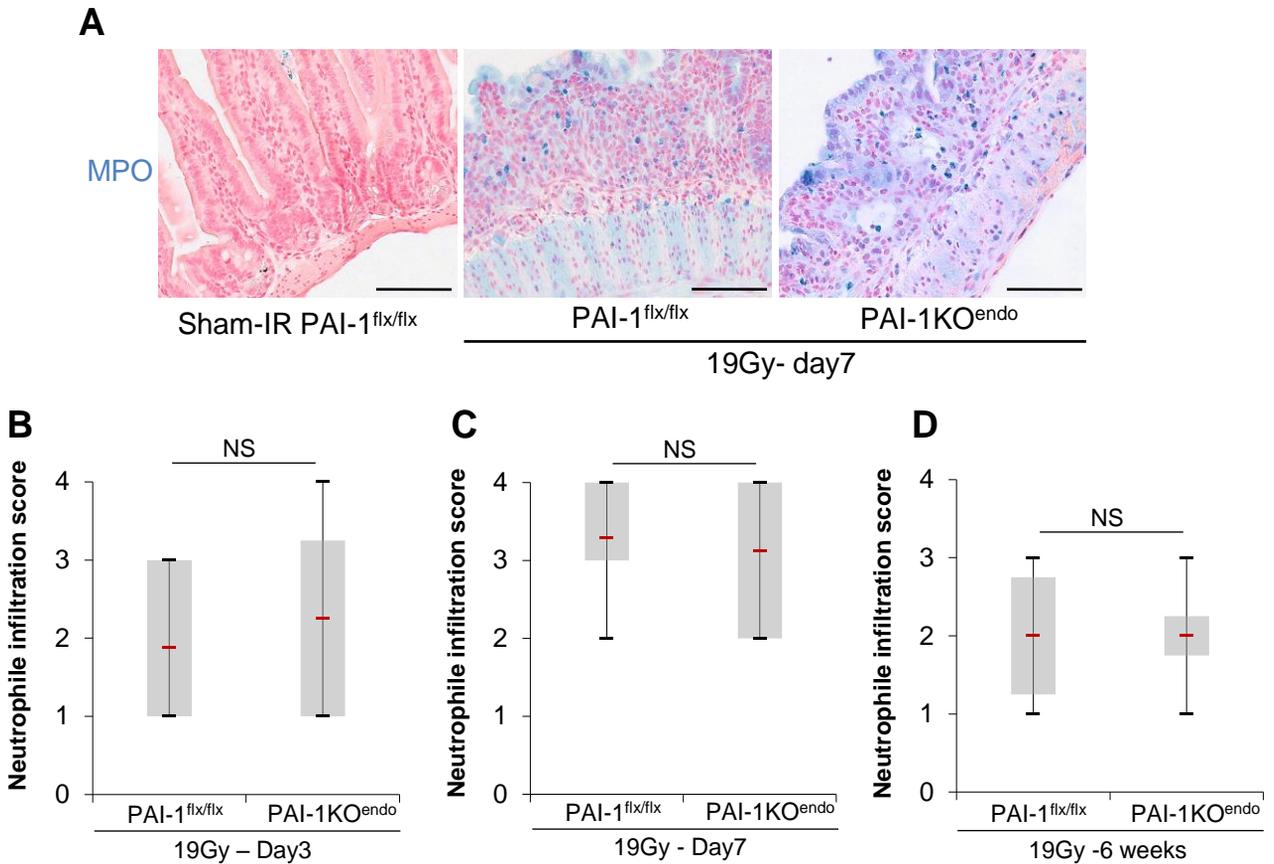
Supplementary Figure 10. Interactomes of the differentially expressed genes related to inflammation-immunity established using Pathway Studio software (mouse intestine 7 days after irradiation). Interactomes obtained in irradiated PAI-1^{flx/flx} mice (A) and irradiated PAI-1KO^{endo} mice (B) compared with sham-IR PAI-1^{flx/flx} mice. Red, up-regulated, green, down-regulated.

Supplementary Figure 11



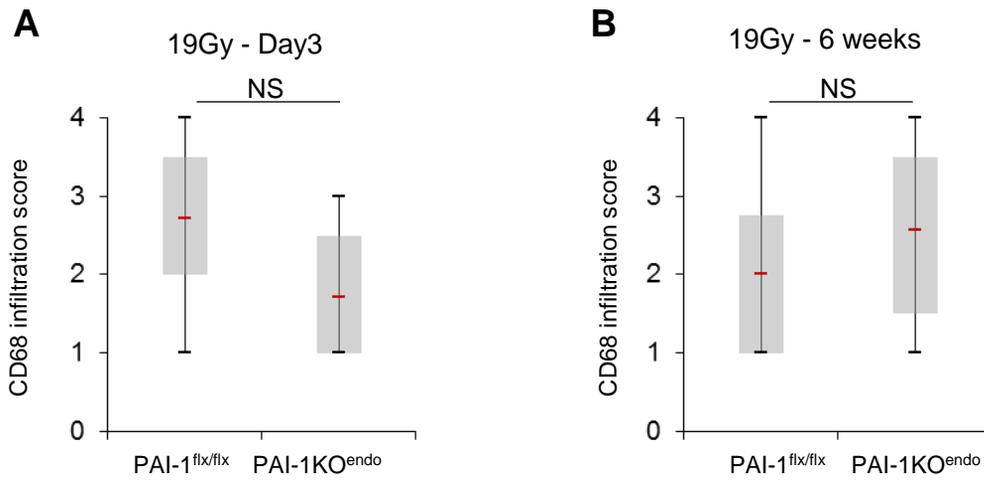
Supplementary Figure 11. HIF-1 α endothelial deletion limits radiation-induced up-regulation of intestinal PAI-1 expression. Relative PAI-1 mRNA level was measured by RT-qPCR in intestinal tissue in HIF-1 α ^{flx/flx} mice and VECad-Cre^{+/-}/HIF-1 α ^{flx/flx} mice. Results are mean \pm SEM with n = 6 to 8 mice per group. *, P < 0.05 and ***, P < 0.001.

Supplementary Figure 12



Supplementary Figure 12. Endothelial inactivation of PAI-1 does not affect the severity of neutrophil infiltrate after irradiation. (A) Representative labeling of neutrophils 7 days after irradiation. Neutrophils were immunolabeled using antibodies against myeloperoxidase (MPO) (blue) and slides were counterstained with nuclear fast red (pink). Scale bar = 100 μ m. n= 5 for sham-IR PAI-1^{flx/flx} mice, n=7 for PAI-1^{flx/flx} 19 Gy mice, and n=8 for PAI-1KO^{endo} 19 Gy mice. Scores ranged from 0 (sham-IR not shown) to 4 (maximum neutrophil count) 3 days (B) 1 week (C) and 6 weeks after irradiation (D). NS, non-significant.

Supplementary Figure 13



Supplementary Figure 13. Macrophage scoring (CD68-positive cells). Scores ranged from 0 (sham-IR) to 4 (maximum macrophage count) 3 days (A) and 6 weeks (B) after irradiation. n= 6 for PAI-1^{flx/flx} sham-IR mice, n=8 for PAI-1^{flx/flx} 19 Gy mice, and n=6 for PAI-1 KO^{endo} 19 Gy mice.

gene	3 days after irradiation				gene	7days after irradiation			
	PAI-1 ^{flx/flx} 19 Gy vs Sham-IR PAI-1 ^{flx/flx}		PAI-1KO ^{endo} vs Sham-IR PAI-1 ^{flx/flx}			PAI-1 ^{flx/flx} 19 Gy vs Sham-IR PAI-1 ^{flx/flx}		PAI-1KO ^{endo} vs Sham-IR PAI-1 ^{flx/flx}	
	Fold change	P-value (FDR)	Fold change	P-value (FDR)		Fold change	P-value (FDR)	Fold change	P-value (FDR)
B2M	0,66	0,028	0,57	0,027	B2m			0,51	0,031
BIRC5			0,12	0,019	BAX	2,21	0,035	2,13	0,010
Ccl2	5,61	0,013	2,93	0,027	Bcl2			1,90	0,029
Ccl3	5,40	0,006			BIRC5	0,43	0,041		
Ccr2	2,30	0,012			C3			4,11	0,011
CD4	0,40	0,032			Ccl2	66,67	0,026	60,95	0,029
CD68	2,74	0,007			Ccl5			0,28	0,048
CD80	3,14	0,045	2,88	0,013	Ccr2	6,77	0,000	6,45	0,019
CD86			1,71	0,037	Ccr7			5,54	0,048
CSF1			1,65	0,036	CD34	3,13	0,015	2,91	0,023
CTLA4	0,30	0,000	0,38	0,030	CD40	7,56	0,036	5,36	0,043
CXCL10	2,30	0,021			CD68	8,68	0,005	4,96	0,002
CXCL12	0,27	0,000	0,21	0,015	CD80	16,85	0,026	14,17	0,002
CXCR3	0,46	0,006			CD86	5,65	0,001	4,04	0,002
FN1	2,71	0,014			CD8a	0,16	0,023	0,08	0,015
H2-Eb1	0,42	0,027			Col4a5			1,57	0,050
Hmox1	4,56	0,016	3,16	0,028	CSF1	3,29	0,023	3,08	0,005
HPRT1			0,60	0,037	CSF2	5,44	0,015		
ICOS	0,41	0,026			CSF3			590,21	0,050
IL15	0,44	0,027			Ctla4	5,55	0,022	4,79	0,050
IL1B			9,53	0,037	CXCL12			3,68	0,011
IL33			3,12	0,013	Ece1	1,47	0,288	1,89	0,006
Il6	6,01	0,019	5,31	0,023	Edn1	3,65	0,023	4,16	0,022
IL7	0,61	0,044	0,43	0,037	Fasl	0,42	0,049	0,34	0,026
NFKB1			0,55	0,019	Fn1	8,38	0,015	7,41	0,025
PAI-1	9,38	0,045	3,74	0,023	Gusb	2,42	0,010	2,42	0,002
Sele	6,53	0,034			HIF	5,17	0,007	5,35	0,014
Selp	2,10	0,038	2,09	0,040	Hmox1	32,98	0,019	15,92	0,003
SKI			0,64	0,020	ICAM	6,86	0,047	5,93	0,011
SMAD3			0,63	0,013	Icos	2,81	0,049	2,60	0,038
SMAD7	0,40	0,000	0,39	0,050	Il10			13,47	0,014
SOCS2			0,39	0,020	Il12a			25,05	0,029
STAT1			0,58	0,050	Il15	0,34	0,039	0,30	0,026
STAT4	0,48	0,033			Il1a			42,54	0,018
STAT6			0,47	0,006	Il1b			88,19	0,029
Tbx21	0,41	0,001	0,40	0,043	Il2ra			4,85	0,038
TFRC			0,15	0,018	IL33			4,26	0,015
TNC			1,73	0,040	Il6	113,27	0,026	189,65	0,050
TNF	2,24	0,040	2,18	0,040	NFKB1			1,92	0,002
VEGFA	0,61	0,001	0,63	0,040	NFKB2	2,51	0,014	1,96	0,026
					PAI-1	63,21	0,050	34,24	0,029
					PECAM	4,54	0,049	4,81	0,005
					Ptgs2	20,67	0,037	29,41	0,029
					Ptprc	5,75	0,001	4,89	0,011
					Sele	20,56	0,023	25,25	0,022
					Selp	33,32	0,025	34,02	0,018
					SKI			1,64	0,002
					SMAD3			1,80	0,031
					STAT3			1,59	0,007
					TFRC	0,28	0,014	0,53	0,029
					Tgfb1	6,98	0,049	5,46	0,022
					TNC	7,02	0,023	10,65	0,015
					TNF	17,41	0,043	6,89	0,015
					TNFRSF18	3,54	0,022		
					VCAM1	4,18	0,023	5,08	0,002
					VEGFA			1,86	0,029

Supplementary Table 1: List of differentially expressed genes with corresponding fold changes and adjusted P-values using the Benjamini-Hochberg false discovery rate in intestinal tissue 3 and 7 days after irradiation in irradiated PAI-1^{flx/flx} mice and irradiated PAI-1KO^{endo} mice compared with Sham-IR PAI-1^{flx/flx} mice. Red indicates genes up-regulated and green genes down-regulated after irradiation.

Day 7 post irradiation		
GO TERM (BIOLOGICAL PROCESS)	ENTITIES (n)	P-VALUE
	PAI-1 ^{flx/flx}	
cell adhesion	SELE,SELP,CD34,VCAM1,ICAM1,FN1,PECAM1,CCL2,TNF (9)	0,013
positive regulation of apoptotic process	PTGS2,HIF1A,PTPRC,IL6,TGFB1,TNF,FASLG,BAX,CTLA4 (9)	0,025
modulation by virus of host morphology or physiology	TFRC,VCAM1,ICAM1,TGFB1,BAX,CD80,CD86,CCR2 (8)	0,003
angiogenesis	HMOX1,PTGS2,HIF1A,FN1,CCL2,IL15,CCR2,SERPINE1 (8)	0,007
leukocyte migration	SELE,SELP,CD34,ICAM1,FN1,PECAM1,TNF (7)	0,002
platelet activation	SELP,CD40,FN1,PECAM1,IL6,TGFB1,SERPINE1 (7)	0,007
response to wounding	FN1,IL6,TNF,TGFB1,BAX,CCR2 (6)	0,001
extracellular matrix organization	NFKB2,FN1,TNF,TGFB1,TNF,SERPINE1 (6)	0,006
positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity	NFKB2,CD40,ICAM1,IL6,TGFB1,TNF (6)	0,039
platelet degranulation	SELP,FN1,PECAM1,TGFB1,SERPINE1 (5)	0,017
cell-cell adhesion	SELP,CD34,VCAM1,ICAM1,ICOS (5)	0,017
leukocyte cell-cell adhesion	SELE,SELP,PTPRC,VCAM1,ICAM1 (5)	0,043
leukocyte tethering or rolling	SELE,SELP,VCAM1,TNF (4)	0,012
heterophilic cell-cell adhesion	SELE,SELP,VCAM1,ICAM1 (5)	0,012
response to amino acid	ICAM1,CCL2,IL6,EDN1 (4)	0,012
positive regulation of MAP kinase activity	CD40,EDN1,TGFB1,TNF (4)	0,044
myeloid dendritic cell differentiation	CSF2,TGFB1,CD86 (3)	0,037
osteoclast differentiation	TFRC,CSF1,TNF (3)	0,037
positive regulation of MAPK cascade	PTPRC,IL6,CCR2 (3)	0,037
regulation of vascular endothelial growth factor production	CCL2,IL6,CCR2 (3)	0,037
negative regulation of blood coagulation	CD34,EDN1,SERPINE1 (3)	0,037
regulation of angiogenesis	HMOX1,IL6,SERPINE1 (3)	0,037
positive regulation of odontogenesis	CD34,EDN1,TGFB1 (3)	0,037
negative regulation of fat cell differentiation	IL6,TGFB1,TNF (3)	0,037
cellular iron ion homeostasis	HMOX1,HIF1A,TFRC (3)	0,037
regulation of cell migration	PECAM1,TGFB1,CCR2 (3)	0,037
response to ionizing radiation	VCAM1,ICAM1,BAX (3)	0,037
	PAI-1KO ^{endo}	
response to hypoxia	HMOX1,HIF1A,SMAD3,TFRC,VCAM1,ICAM1,CCL2,VEGFA,EDN1,TGFB1,TNF,BCL2,IL1B,IL1A,CCR2,ECE1 (16)	0,029
negative regulation of cell proliferation	HMOX1,PTGS2,SMAD3,STAT3,IL6,TGFB1,TNF,BCL2,BAX,IL1B,IL1A,SKI (12)	0,001
aging	NFKB2,TFRC,VCAM1,CCL2,CCL5,IL15,IL6,IL10,TGFB1,BCL2,CD86,IL1B (12)	0,028
positive regulation of apoptotic process	PTGS2,HIF1A,IL2RA,PTPRC,IL6,TGFB1,TNF,FASLG,BAX,CTLA4,IL1B (11)	0,046
response to glucocorticoid	PTGS2,FN1,CCL2,CCL5,IL6,IL10,TNF,BCL2,IL1B,C3,SERPINE1 (11)	0,002
cell proliferation	STAT3,IL2RA,CD34,VEGFA,CSF1,TGFB1,TNF,BCL2,BAX,IL1A,SKI (11)	0,046
positive regulation of angiogenesis	HMOX1,HIF1A,CD34,CCL5,VEGFA,IL1B,IL1A,C3,SERPINE1 (9)	0,008
modulation by virus of host morphology or physiology	STAT3,TFRC,VCAM1,ICAM1,TGFB1,BAX,CD80,CD86,CCR2 (9)	0,008
angiogenesis	HMOX1,PTGS2,HIF1A,FN1,CCL2,VEGFA,IL15,CCR2,SERPINE1 (9)	0,026
leukocyte migration	SELE,SELP,CD34,ICAM1,FN1,PECAM1,TNF,IL1B (8)	0,003
platelet activation	SELP,CD40,FN1,PECAM1,VEGFA,IL6,TGFB1,SERPINE1 (8)	0,016
positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity	NFKB1,NFKB2,CD40,ICAM1,IL6,TGFB1,TNF,IL1B (8)	0,016
blood coagulation	SELE,SELP,FN1,PECAM1,VEGFA,TGFB1,C3,SERPINE1 (8)	0,046
positive regulation of smooth muscle cell proliferation	HMOX1,PTGS2,HIF1A,CCL5,VEGFA,IL6,EDN1,TNF (8)	0,046
extracellular matrix organization	NFKB2,FN1,COL4A5,TNF,TGFB1,TNF,SERPINE1 (7)	0,006
response to organic substance	PTGS2,STAT3,TFRC,IL10,TGFB1,BCL2,IL1A (7)	0,030
wound healing	SMAD3,FN1,PECAM1,TGFB1,IL1B,IL1A,SERPINE1 (7)	0,030
platelet degranulation	SELP,FN1,PECAM1,VEGFA,TGFB1,SERPINE1 (6)	0,013
cell-cell adhesion	SELP,CD34,VCAM1,ICAM1,BCL2,ICOS (6)	0,013
response to copper ion	NFKB1,TFRC,ICAM1,BCL2,BAX,IL1A (6)	0,013
response to wounding	FN1,IL6,TNF,TGFB1,BAX,CCR2 (6)	0,013
positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation	VEGFA,CSF3,IL6,TGFB1,TNF,BCL2 (6)	0,013
hemopoiesis	CD34,CSF1,IL10,BCL2,CCR2 (5)	0,028
positive regulation of MAP kinase activity	CD40,VEGFA,EDN1,TGFB1,TNF (5)	0,028
positive regulation of interleukin-6 production	IL6,TNF,IL1B,IL1A,IL33 (5)	0,028
response to heat	CCL2,IL6,BCL2,IL1B,IL1A (5)	0,028

Supplementary Table 2: Gene ontology (GO) enrichment analyses (biological processes) corrected for non-genome-wide analyses. Pathway Studio software was used to analyze the list of up- and down-regulated genes at any time post-irradiation in irradiated PAI-1^{flx/flx} mice and PAI-1KO^{endo} mice compared with Sham PAI-1^{flx/flx} mice. Analyses were adjusted to the initial list of measured genes (n=106). The table displays GO terms with a P-value <0.05 at day 7 post-irradiation. For each GO term, the number and name of the entities as well as the P-value are given.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les pathologies cancéreuses représentent l'un des principaux enjeux de santé publique dans de nombreux pays. L'amélioration des techniques de dépistage, associée à une augmentation du nombre de cas, provoquent de concert une hausse notable des diagnostics établie annuellement. L'arsenal thérapeutique à disposition pour traiter les cellules cancéreuses comprend différents types de traitements, parmi lesquels la chirurgie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie, et la radiothérapie. Plus de la moitié des patients pris en charge chaque année sont traités avec des rayons ionisants à un stade ou à un autre de la maladie, à des fins curatives ou palliatives. Les propriétés mêmes de ces rayons impliquent un ciblage préférentiel des cellules à division rapide, comme les cellules cancéreuses, mais provoquent également des lésions au niveau des tissus sains présents dans le champ d'irradiation. Cependant, le manque de stratégies thérapeutiques curatives rend la prise en charge des lésions radiques délicate, et les patients se voient le plus souvent proposer des traitements symptomatiques. C'est pourquoi la compréhension des mécanismes physiopathologiques inhérents au développement des lésions tissulaires induites par la radiothérapie apparaît comme un objectif de premier plan. L'objectif 8 du plan Cancer 2014-2017 concerne par ailleurs la qualité de vie des patients après leurs traitements, et comprend entre autres paramètres les effets secondaires des protocoles radiothérapeutiques. De plus, la compréhension des effets biologiques des rayons ionisants au niveau des tissus sains se situe au centre des préoccupations du laboratoire L3R à l'IRSN, avec comme objectif final la mise en place des traitements préventifs ou curatifs des complications radiques, sans entraver le protocole anti-cancéreux. L'état des connaissances sur les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'initiation, la progression, et le maintien des lésions tissulaires radio-induites a considérablement progressé au cours des vingt dernières années, et impliquent désormais l'ensemble des compartiments qui compose le tissu lésé (Bentzen, 2006). Parmi eux, l'endothélium apparaît comme une composante majeure de cette séquence d'évènements interdépendants, et pourrait être le fil conducteur entre les évènements précoces et tardifs (Hauer-Jensen et al., 2014).

Ce travail de thèse visait donc à démontrer *in vivo* l'existence potentielle d'un lien endothélium-dépendant qui régit la progression et la chronicité des atteintes tissulaires radiques précoces. Ce projet fut mené sur un modèle murin d'entérite radique,

qui est l'une des complications radiothérapeutiques qui composent la « pelvic radiation disease » (cf p24). Ce choix se justifie par la proportion importante de patients souffrant de complications gastro-intestinales consécutives aux traitements radiothérapeutiques au niveau de cette zone anatomique, ainsi que par une bonne connaissance au laboratoire de la physiopathologie des lésions intestinales radio-induites. La stratégie adoptée fut donc, dans le cadre d'une modélisation de l'entérite radique chez la souris, de modifier le phénotype endothélial, et d'en étudier les conséquences sur le développement de la pathologie. Dans ce contexte, PAI-1 a été utilisé comme outil moléculaire de ce projet, du fait de son implication clé dans la physiopathologie de l'entérite radique, et de son lien étroit avec l'endothélium (Milliat et al., 2008; Abderrahmani et al., 2012). En effet, l'inactivation du gène SERPINE1 spécifiquement dans les cellules endothéliales, par le biais d'un nouveau modèle transgénique établi au laboratoire, a servi d'outil moléculaire pour modifier les propriétés des cellules endothéliales.

La technologie CreLox est apparue comme la meilleure stratégie afin de cibler spécifiquement SERPINE1 dans le compartiment endothélial.

Le protocole établi afin d'inactiver le gène SERPINE1 spécifiquement dans les cellules endothéliales repose sur le système CreLox. Ainsi, deux acteurs étaient nécessaires pour créer des animaux déficients pour PAI-1 spécifiquement dans le compartiment endothélial. D'une part, des souris exprimant une version floxée du gène, et d'autre part des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle d'un promoteur endothélium-spécifique (voir Annexe).

Les souris PAI-1^{flx/flx} ont été créées dans le cadre d'un projet de recherche exploratoire financé par l'IRSN, et sont donc la propriété de l'institut. Il s'agit à ce jour de la seule lignée de cette nature existant dans les laboratoires. La stratégie adoptée fut d'encadrer les exons 1 et 2 par les séquences LoxP, permettant la délétion du codon initiateur, situé en 5' de l'exon 2, lors du croisement avec une lignée Cre. Cette approche est apparue comme la plus judicieuse pour abolir l'expression du gène tout en minimisant les risques d'expression d'une protéine tronquée (Annexe).

Plusieurs options s'offraient à nous quant au choix de la lignée Cre endothélium-spécifique. Nous avons décidé d'utiliser des souris qui expriment la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de la VE-Cadhérine (Alva et al., 2006). Ce choix a été basé sur deux

critères principaux. D'une part, parmi les quatre lignées Cre endothélium-spécifique disponibles, la lignée VE-Cad-Cre est la plus spécifique de la lignée endothéliale, tant au stade embryonnaire que chez l'adulte. D'autre part, la caractérisation de cette lignée démontre une activité homogène du promoteur dès le stade embryonnaire E8.5, qui perdure dans l'endothélium quiescent (donc chez l'adulte), ce qui n'est pas le cas de la plupart des autres lignées (Annexe). Le croisement de ces deux types d'animaux a donc conduit à la génération des souris PAI-1 KO^{endo}, déficientes pour PAI-1 exclusivement dans l'endothélium. Cette délétion de SERPINE1 a par ailleurs pu être confirmée par PCR au cours du génotypage des animaux, grâce à l'utilisation d'un couple d'amorces spécifiques de l'allèle excisé du gène. Une limite cependant à ce modèle concerne l'activité de la Cre dans les progéniteurs communs des lignées endothéliales et hématopoïétiques, les hémangioblastes, qui conduit à la présence d'évènements de recombinaison dans la moitié des cellules hématopoïétiques chez l'adulte (Alva et al., 2006). L'interprétation des résultats obtenus avec ce modèle, somme toute extrêmement robuste, doit donc tenir compte de cette caractéristique.

Dans l'optique de s'affranchir de la présence d'évènements de recombinaison dans la lignée hématopoïétique, nous avons en parallèle établi une autre lignée transgénique, la lignée PAI-1 KO^{endo(i)}. Les animaux expriment cette fois la recombinaise tamoxifène-inductible CreERT2 sous le contrôle du promoteur VE-Cadhérine (Monvoisin et al., 2006). L'expression de ce promoteur étant strictement restreinte aux cellules endothéliales chez les souris adultes, le traitement de ces animaux par le tamoxifène induit une délétion de SERPINE1 exclusivement dans le compartiment endothélial. De plus, ce modèle dispose d'une composante inductible, permettant par exemple l'extinction du gène à différentes étapes de l'entérite radique, et ainsi de dissocier le rôle du pool de PAI-1 sécrété par l'endothélium sur les évènements précoces et tardifs. L'utilisation de ces animaux s'est cependant heurtée à deux contraintes majeures. Tout d'abord, il fut difficile d'estimer la cinétique d'activation de la recombinaise, c'est-à-dire l'intervalle de temps entre la dernière injection de tamoxifène et l'apparition des évènements de recombinaison. Ce point était en effet essentiel pour déterminer précisément le protocole d'extinction du gène au cours du développement de l'entérite radique. Cependant, les travaux réalisés sur des souris (VE-Cad-CreERT2 ; ROSA) ont montré l'apparition de l'activité β -Galactosidase au niveau de l'intestin quinze jours après la dernière injection de 4OHT, alors que les résultats obtenus par PCR sur des biopsies de queues témoignent de la présence de l'allèle excisé de SERPINE1 trois jours seulement après la dernière injection. Bien que les deux techniques reflètent deux niveaux moléculaires

différents, une activité enzymatique pour la première et la recombinaison de séquences ADN pour la seconde, une telle différence semble toutefois difficile à expliquer. Nous ne pouvions donc pas anticiper à quel moment précis l'expression du gène serait éteinte, ni à quel moment l'absence de sécrétion de la protéine serait effective.

La deuxième limite majeure de ce modèle concerne la substance inductrice, le 4-hydroxytamoxifène. En effet, en sa qualité d'antagoniste compétitif du récepteur aux œstrogènes, ce dernier n'est pas une substance neutre, et peut potentiellement agir sur la pathogénèse de l'entérite radique. Et de ce fait, les résultats obtenus avec la lignée PAI-1 KO^{endo(i)} diffèrent sur de nombreux points de ceux obtenus avec la lignée PAI-1 KO^{endo}. Tout d'abord, quels que soient leurs génotypes, les animaux traités au 4OHT (2mg.j⁻¹ pendant 5 jours consécutifs) survivent systématiquement à l'irradiation localisée du grêle ([Rannou et al., résultats personnels](#)). De plus, ces souris présentent un infiltrat inflammatoire plus faible que les animaux non traités, 7 jours après irradiation, et ce toujours indépendamment du génotype. Enfin, le 4OHT semble également influencer la fibrose radique, puisque les souris PAI-1^{flx/flx} traitées au tamoxifène présentent une fibrose limitée, équivalente à celle observée chez les animaux PAI-1 KO^{endo}, 6 semaines après irradiation. En outre, les souris PAI-1 KO^{endo(i)} traitées au 4OHT présentent quant à elles une fibrose quasi-inexistante. Des effets analogues ont déjà été décrits dans la littérature. Ainsi, le tamoxifène présente des propriétés anti-fibrosantes, notamment dans les cas de fibroses péritonéales induites par dialyse ([Loureiro et al., 2013](#)), ou dans des cas de fibroses rénales, via la modulation de la voie TGF- β /Smad liée au récepteur aux œstrogènes ([Kim et al., 2014](#)). De plus, certains travaux suggèrent également des effets anti-inflammatoires du tamoxifène. Tout d'abord, une étude clinique réalisée sur une cohorte de femmes en bonne santé montre une diminution de la concentration plasmatique en Protéine C réactive, fibrinogène et cholestérol ([Cushman et al., 2001](#)). Il a également été montré dans un modèle d'inflammation cérébrale induite par le LPS chez le rat que le tamoxifène diminue la réaction inflammatoire via un mécanisme dépendant du récepteur aux œstrogènes au niveau de la microglie ([Tapia-Gonzalez et al., 2008](#)). Enfin, dans un modèle de lupus chez des souris prédisposées, le traitement des animaux au tamoxifène limite les symptômes rénaux de la maladie en modulant la réponse cytokinique et immunitaire ([Wu et al., 2000](#)). Il est intéressant de noter que dans les deux derniers cas, les doses utilisées en milligrammes par kilogramme de masse corporelle sont dans les mêmes gammes que celles utilisées pour l'activation de la CreERT2. Dans ce contexte, il est alors impossible de discriminer l'effet bénéfique du tamoxifène de celui de la déficience du pool endothélial de

PAI-1. Les résultats obtenus par l'utilisation de cette lignée tamoxifène inductible n'ont donc pas permis de répondre à la question posée.

Une alternative à ces limites méthodologiques aurait consisté à utiliser le caractère inductible de la CreERT2 pour déléter SERPINE1 dans les cellules endothéliales non pas chez les animaux adultes, mais dès le stade embryonnaire. En effet, l'équipe de M. L. Iruela-Arispe a montré que l'injection de 4OHT chez des femelles gestantes, à raison de $1\text{mg}\cdot\text{j}^{-1}$ tous les deux jours de E10.5 à E14.5, induit l'apparition d'évènements de recombinaison dans 95% des cellules endothéliales de l'embryon au stade E16.5 (Monvoisin et al., 2006). D'autre part, l'initiation du traitement après le stade E11.5 prévient l'apparition d'évènements de recombinaison dans la lignée hématopoïétique. De plus, le tamoxifène est rapidement métabolisé (Robinson et al., 1990), permettant ainsi une élimination rapide de la molécule. Ainsi, l'induction de la CreERT2 au stade embryonnaire par injection de 4OHT chez des femelles gestantes à compter du stade E11.5, apparaît comme une option idéale pour s'affranchir des effets physiologiques du tamoxifène, tout en assurant une délétion de SERPINE1 très efficace et spécifique du compartiment endothélial. La mise en place d'un tel protocole nécessiterait cependant un suivi plus étroit des animaux : notamment, de par ses propriétés anti-oestrogéniques, le tamoxifène empêche la délivrance des souriceaux lors de la mise bas. Ce dernier point obligerait donc au recours systématique à la césarienne.

Les évènements les plus précoces qui surviennent après l'exposition de l'intestin à une irradiation forte dose sont la mort des cellules radiosensibles, en d'autres termes les cellules épithéliales et endothéliales (Qiu et al., 2008; Paris et al., 2001). Les travaux réalisés au laboratoire sur des souris PAI-1^{-/-} irradiées localement au niveau de l'intestin grêle ont démontré un rôle de clé de PAI-1 dans l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales *in vivo*. De plus, des investigations menées *in vitro* sur des cellules endothéliales provenant d'aortes de souris déficientes ou non pour SERPINE1, ont montré que cet effet impliquait la modulation de la voie de survie PI3K/Akt (Abderrahmani et al., 2012). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux conséquences de l'absence d'expression de PAI-1 par les cellules endothéliales sur la mort radio-induite des compartiments cibles de l'intestin, à savoir les cellules souches intestinales et les cellules endothéliales microvasculaires.

La déficience de PAI-1 dans les cellules endothéliales limite la mort radio-induite des cellules souches intestinales 24h après irradiation.

En effet, un comarquage E-Cadhérine/TUNEL réalisé sur des coupes de segments irradiés a révélé une diminution significative du nombre de cellules épithéliales apoptotiques par cryptes 24h après irradiation chez les souris PAI-1 KO^{endo}. De plus, la position de ces cellules au niveau de la crypte suggère que la majorité d'entre elles sont des cellules souches LRC+4, phénomène qui serait en accord avec les travaux de Rotolo et al. (Rotolo et al., 2008). Ces résultats diffèrent sensiblement des observations réalisées sur les souris PAI-1^{-/-} dans le même modèle d'irradiation, et qui montrent une diminution faible mais significative du nombre de cellules épithéliales apoptotiques dans les cryptes 5h après irradiation (Abderrahmani et al., 2012). Cette diminution ne se retrouve ni à 4h, ni à 24h post-irradiation. Ces différences peuvent potentiellement s'expliquer par le niveau d'expression de PAI-1 chez ces animaux. En effet, les souris PAI-1^{-/-} sont intégralement déficientes pour cette protéine, alors que les souris PAI-1 KO^{endo} ne sont délétées du gène SERPINE1 que dans les cellules endothéliales. Ainsi, d'autres types cellulaires, tels que les leucocytes ou les thrombocytes, synthétisent et sécrètent toujours PAI-1, impliquant probablement la présence de la protéine dans l'environnement des cellules souches intestinales. Or, comme nous l'avons vu dans l'introduction, PAI-1 est un médiateur connu du processus de mort cellulaire dans différents tissus. Cette diminution de l'apoptose radio-induite des cellules souches intestinales constatées 24h après irradiation serait donc le reflet de l'action spécifique du pool de PAI-1 sécrété par l'endothélium

Un point intéressant concerne la cinétique de cette diminution de l'apoptose des cellules souches intestinales. En effet, celle-ci intervient 24h après irradiation, ce qui correspond à la vague de mort clonogénique p53 indépendante (Merritt et al., 1997). Différents travaux, bien que réalisés sur des modèles d'irradiation TBI, démontrent que la mort clonogénique des cellules épithéliales présentes dans les cryptes joue un rôle clé dans le développement et la sévérité du SGI. En effet, une proportion plus élevée de cellules souches intestinales qui entrent en mort clonogénique, liée à la déficience en p53, est associée à une augmentation des lésions cryptiques et une abolition de la vague proliférative qui survient 72h après irradiation (Merritt et al., 1997; Komarova et al., 2004). Ces résultats seraient cohérents avec les résultats obtenus dans notre modèle d'étude, qui montrent que la diminution du nombre de cellules souches en état de mort cellulaire 24h après irradiation chez les souris

PAI-1 KO^{endo} est associée à un doublement du nombre de cryptes subsistant 72h après irradiation. De plus, bien que les données de littérature ne soient pas encore très claires à ce sujet, il existe un faisceau de preuves qui semble impliquer les cellules souches LRC+4 dans la régénération de l'épithélium intestinal après irradiation (Yan et al., 2012; Van Landeghem et al., 2012). Bien que ces résultats aient été démontrés sur des modèles d'irradiation TBI et abdominale totale, ils semblent cohérents avec la meilleure régénération de la couverture épithéliale observée chez les souris PAI-1 KO^{endo} une semaine après irradiation.

Nous nous sommes ensuite intéressés au deuxième compartiment radiosensible de l'intestin grêle, l'endothélium, en investiguant la mort radio-induite des cellules endothéliales grâce à un double marquage immunohistochimique vWF/TUNEL. A notre grande surprise, bien que le réseau vasculaire d'une part, et les cellules apoptotiques d'autre part présentent un marquage clair et homogène, le nombre de cellules vWF+/TUNEL+ dans la lamina propria se révèle extrêmement limité 5h après irradiation, tant chez les souris PAI-1^{flx/flx} que chez les souris PAI-1 KO^{endo}. Ces résultats apparaissent donc contradictoires avec de nombreux travaux réalisés sur le SGI, qui montrent tous une vague de mort importante des cellules endothéliales dans les heures qui suivent une irradiation de 15Gy TBI (Paris et al., 2001; Burdelya et al., 2008; Rotolo et al., 2008; Bonnaud et al., 2010). De plus, ces résultats sont également en contradiction avec les travaux précédents réalisés au sein du laboratoire, qui montrent sur le même modèle d'irradiation 35 à 37% de cellules endothéliales apoptotiques, respectivement 4 et 5h après irradiation (Abderrahmani et al., 2012).

Nous avons tout d'abord cherché à déterminer si cette différence n'était pas liée à des biais techniques. En effet, il est désormais connu que l'utilisation du marquage TUNEL sur des coupes de tissus inclus en paraffine se révèle délicate, et soumis à certaines contraintes. Cette particularité technique a par ailleurs donné lieu à un débat animé sur le sujet en 2007, suite à la publication des résultats obtenus par le laboratoire de Jeffrey A. Coderre (Schuller et al., 2007). Il est ressorti de ces échanges scientifiques, somme toute intéressants, deux informations majeures. Tout d'abord, le protocole de fixation des tissus avant leur inclusion en paraffine apparaît crucial pour optimiser la reconnaissance des cassures double-brin de l'ADN par la technique TUNEL. Ainsi, une fixation inadéquate semble masquer les épitopes, entraînant une sous-estimation du nombre de noyaux marqués à l'issue du protocole (Rotolo et al., 2008). De même, une mise au point de la technique elle-même adaptée à chaque condition expérimentale semble nécessaire à la détection optimale des cellules

apoptotiques en histologie. En effet, une lettre à l'éditeur publiée en 2008 par Gudkov et Gleiberman rapporte les tests effectués au sein de leur laboratoire, sur des tissus inclus en paraffine provenant de trois laboratoires différents (leur propres échantillons, ceux de Richard Kolesnik et ceux de Jeffrey A. Coderre). Dans les trois cas, les animaux ont été irradiés à 15Gy en TBI. Et dans les trois cas, le double marquage CD31/TUNEL a révélé de nombreuses cellules apoptotiques CD31+ dans la lamina propria, y compris sur les tissus provenant du laboratoire de Jeffrey A. Coderre, sur lesquels ont été réalisés les travaux de Schuller et al. ([Schuller et al., 2007](#)).

Nous avons donc testé la fonctionnalité du marquage vWF/TUNEL sur des échantillons de tissus cryopréservés issus des mêmes animaux, irradiés et sacrifiés 5h après irradiation. Ces tests ont été réalisés sur des échantillons contrôles (souris PAI-1^{flx/flx}) coupés à 5µm d'épaisseur. Les résultats obtenus sont identiques à ceux décrits sur les tissus inclus en paraffine, c'est-à-dire la présence de rares cellules vWF+/TUNEL+ dans la lamina propria. Par ailleurs, nous avons retrouvé le même nombre de cellules souches intestinales apoptotiques sur tissus congelés et inclus en paraffine, démontrant ainsi l'absence de faux positifs ou de faux négatifs après marquage TUNEL sur coupes paraffines. De plus, afin de définitivement exclure un artefact technique, nous avons réalisé sur les tissus contrôles inclus en paraffine le marquage immunohistochimique de la Caspase 3 clivée. Nous avons ainsi pu comparer le nombre de cellules épithéliales apoptotiques dans les cryptes détectées par ce marquage, ou par la technique TUNEL, sur des coupes sériées. De la même manière, les résultats se sont révélés identiques. Ainsi, l'absence de détection de cellules endothéliales apoptotiques 5h après irradiation n'est pas liée à un protocole inadapté du double marquage vWF/TUNEL.

Dans la plupart des travaux réalisés sur le sujet, les auteurs ont observé une vague de mort radio-induite des cellules endothéliales 4 ou 5h après irradiation de 15Gy TBI. De plus, les travaux de Francois Paris publiés en 2001 révèlent la présence de cellules endothéliales apoptotiques dans l'heure qui suit l'irradiation, avec un maximum atteint 4h après irradiation. Nous avons donc voulu vérifier si cette vague de mort n'intervenait pas plus précocement après irradiation, dans nos conditions expérimentales. Pour se faire, nous avons sacrifié des animaux 3 et 4h après irradiation localisée du grêle, et réalisé un double marquage vWF/TUNEL sur tissus inclus en paraffine. Là encore, nous avons observé la présence de quelques cellules endothéliales apoptotiques dans la lamina propria.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les travaux menés sur le même modèle d'irradiation au laboratoire il y a quelques années révèlent que près d'un tiers des cellules endothéliales de la lamina propria sont apoptotiques 4 et 5h après irradiation. Cette différence significative avec les travaux réalisés dans le cadre de ce projet de thèse semble donc difficile à expliquer. Nous avons cependant identifié deux points de divergences entre ces deux projets. Tout d'abord, le fond génétique des animaux. Les souris contrôles et PAI-1^{-/-} utilisées dans les travaux de Abderrahmani et al. possèdent un fond C57bl/6J pur, provenant de Jackson Laboratory, alors que les souris utilisées dans le cadre de ce projet sont issues des élevages mis en place à l'IRSN, et résultent du croisement de deux lignées transgéniques. D'une part, bien que décrites comme C57bl/6J, des analyses SNP réalisées sur les souris VE-Cad-Cre par Jackson Laboratory en 2011 ont révélé la présence de quatre marqueurs homozygotes pour la lignée FVB/N (<http://jaxmice.jax.org/strain/006137.html>), qui correspond au fond génétique des embryons utilisés pour créer la lignée (Alva et al., 2006). D'autre part, les souris PAI-1^{flx/flx} sont issues de l'implantation de cellules ES 129SV transformées dans des blastocystes C57bl/6J (Annexe). Nous ne pouvons donc pas connaître la proportion exacte du fond 129SV chez ces animaux, bien que la lignée PAI-1^{flx/flx} fondée par croisements successifs de ces animaux entre eux, puisse être considérée comme consanguine. De ce fait, les souris PAI-1^{flx/flx} et PAI-1 KO^{endo}, provenant du croisement de ces deux lignées, possèdent un fond génétique qui n'est donc pas identique à la lignée pure C57bl/6J. La deuxième différence entre les conditions expérimentales de ces deux études, qui relève de la physique, concerne le débit de dose des irradiations. En effet, bien que la dose reçue soit identique dans les deux cas, le débit de dose de la source ⁶⁰Co utilisée à quant à lui diminué de 35%. De plus, les données disponibles dans la littérature font état de débits de dose compris entre 2.1 et 2.5Gy.mn⁻¹ lors de l'utilisation de rayons γ (source ¹³⁷Cs pour la plupart). Ainsi, nous ne pouvons donc pas exclure que cette différence significative de débit de dose, qui se situe à 0.8Gy.mn⁻¹ dans notre cas, puisse impacter la pathogénèse de l'entérite radique, notamment sur des paramètres aussi subtils que l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales. En outre, deux études ont également mis en évidence une différence de radiosensibilité entre différentes lignées de souris couramment utilisées en laboratoire. D'une part, il existe un effet du fond génétique sur des obstructions colorectales radio-induites dans un modèle d'irradiation localisée de 20 à 35Gy, entre les souris C57bl6 et C3H (Skwarchuk et Travis, 1998). D'autre part, une étude récente réalisée sur un modèle d'irradiation thoracique de 7.5Gy démontre également une différence de radiosensibilité entre les lignées C57L/J, CBA/J et C57bl/6J (Jackson et al., 2014). Nous ne pouvons donc pas exclure que

conjointement, ces deux paramètres aient influencé les résultats obtenus sur la mort radio-induite des cellules endothéliales. Cette hypothèse semble par ailleurs étayée par les résultats obtenus avec les animaux C57bl/6J irradiés avec le même débit de dose utilisé dans le cadre de ces travaux de thèse. En effet, le marquage vWF/TUNEL réalisé à partir de tissus inclus en paraffine révèle une légère augmentation du nombre de cellules endothéliales apoptotiques 5h après irradiation, bien que cette proportion reste malgré tout inférieure aux 37% obtenus au cours de la précédente étude. De plus, nous avons également relevé une diminution du nombre absolu de cellules épithéliales apoptotiques dans les cryptes entre les animaux PAI-1^{flx/flx} et les animaux C57bl/6J irradiés dans les mêmes conditions de dosimétrie. Ainsi, ce nombre passe respectivement de 2.75 à 4.5 cellules par cryptes 5h après irradiation, et de 3 à 4 cellules par cryptes 24h après irradiation ([Abderrahmani et al., 2012](#)).

Cependant, il est fort possible que cette vague de mort radio-induite des cellules endothéliales ait malgré tout eu lieu, bien que nous n'ayons pas pu la mettre en évidence. En effet, bien que celle-ci semble intervenir entre 1 et 5h après irradiation ([Paris et al., 2001](#); [Abderrahmani et al., 2012](#)), il est possible que cette différence de fond génétique associée à une diminution significative du débit de dose de la source ⁶⁰Co aient retardé ce phénomène. Le meilleur moyen de s'en assurer serait de réaliser un co-marquage vWF/TUNEL sur des tissus provenant d'animaux sacrifiés ultérieurement après irradiation, par exemple à partir de 5h30, et avec un pas de temps de 30mn jusque 7 ou 8h après irradiation.

Un autre paramètre important de l'entérite radique sur lequel nous nous sommes penchés concerne la composante inflammatoire de la pathologie, qui établit notamment un lien entre la réponse aigüe de l'intestin et l'évolution vers la chronicité des lésions. C'est pourquoi nous avons dressé un profil génique en lien avec l'inflammation et l'immunité par TLDA et RT-qPCR à des temps stratégiques de ces processus après irradiation. Les résultats obtenus mettent ainsi en évidence un effet de la délétion de SERPINE1 dans les cellules endothéliales sur le profil moléculaire lié aux gènes impliqués dans la réponse immunitaire, 3 et 7 jours après irradiation. Plus précisément, nous avons pu mettre en évidence par immunohistochimie des différences quantitatives et qualitatives concernant les macrophages présents dans les tissus irradiés.

La délétion de SERPINE1 dans les cellules endothéliales limite l'infiltrat des macrophages 7 jours après irradiation, et influence leur polarisation de 3 à 42 jours après irradiation.

En effet, la délétion spécifique de SERPINE1 dans les cellules endothéliales est associée à une diminution significative du nombre de macrophages présent dans le tissu intestinal une semaine après irradiation, ces derniers étant observés par marquage immunohistochimique de CD68. Une explication possible à ce résultat pourrait impliquer une diminution de l'adhésion des monocytes sanguins au niveau des cellules endothéliales, et donc une diminution du recrutement de ces cellules de l'immunité innée au niveau du tissu irradié. Cette hypothèse paraît d'autant plus plausible que des travaux ont déjà établi un lien entre PAI-1 et la migration des monocytes et macrophages, notamment via la formation d'un complexe PAI-1/tPA/LRP-1/Mac1 (Cao et al., 2006). Ce lien a par ailleurs été suggéré *in vivo*. Ainsi, dans un modèle d'atteintes pulmonaires ciblées chez la souris, la déficience en PAI-1 limite le recrutement des monocytes au niveau du tissu pulmonaire 14 jours après l'initiation des lésions. En outre, cette diminution du recrutement monocyttaire est associée à des lésions fibrotiques moins sévères, 2 et 3 semaines après le début du protocole (Osterholzer et al., 2012). Nous observons par ailleurs une évolution des lésions assez similaire dans notre modèle expérimental, puisque les souris PAI-1 KO^{endo} présentent également une diminution de la fibrose intestinale radique 6 semaines après irradiation. Dans une autre étude, l'inhibition de PAI-1 par le tiplaxtinine limite la migration des macrophages dans un modèle d'injection péritonéale de thyoglycolate chez la souris, ainsi que dans un modèle de glomérulonéphrite induite par le ciblage par anticorps de Thy1 chez le rat (Ichimura et al., 2013). De plus, dans ce dernier modèle, la diminution de la migration des macrophages, qui a été attribuée *in vitro* à une interaction directe entre PAI-1 et LRP-1, est associée à une diminution des lésions structurelles et fonctionnelles au niveau du rein. Enfin, une étude récente menée *in vitro* démontre que l'inhibition de PAI-1 par siRNA chez des HUVECs stimulées par GlyLDL limite significativement l'adhésion des THP-1, alors que l'ajout de PAI-1 recombinant humain rétablit cette adhésion (Zhao et al., 2014). Dans ce cas, l'adhésion des cellules monocytaires sur les HUVECs activées passerait par la surexpression de PAI-1, et la formation de complexes PAI-1/uPA/uPAR/LRP-1.

Cette hypothèse d'une diminution de l'adhésion des monocytes sur les cellules endothéliales déficientes pour PAI-1 est donc tout à fait envisageable pour expliquer la diminution de l'infiltrat de macrophages en phase inflammatoire après irradiation chez les

souris PAI-1 KO^{endo}. Nous pourrions envisager, afin de valider cette hypothèse, un test mené *in vitro* sur des HUVECs ou des HIMECs (Human Intestinal Microvascular Endothelial Cell) cultivées en plaque. Ces cellules seraient inactivées ou non pour SERPINE1 par siRNA, et soumise ou non à une irradiation de 10Gy, par exemple. Celles-ci seraient alors soumises à l'adhésion de THP-1 préalablement marqués avec un colorant fluorescent, avec par exemple un délai de 7 jours entre l'irradiation des cellules et la mise en contact des monocytes (Figure 30). En effet, un tel délai apparaît approprié à nos conditions expérimentales. D'une part, *in vivo*, cette diminution significative du nombre de macrophages dans le tissu irradié intervient 7 jours après irradiation. D'autre part, une étude récente, réalisée dans des conditions analogues aux nôtres, montre que l'augmentation des capacités adhésives des cellules endothéliales devient significative à partir de 7 jours après irradiation (Lowe et al., 2014). De cette manière, grâce à l'utilisation d'un scanner de plaque en fluorescence, il serait possible de distinguer l'effet de l'irradiation, de l'inhibition de SERPINE1, et des deux conditions simultanées sur l'adhésion des cellules monocytaires sur les cellules endothéliales.

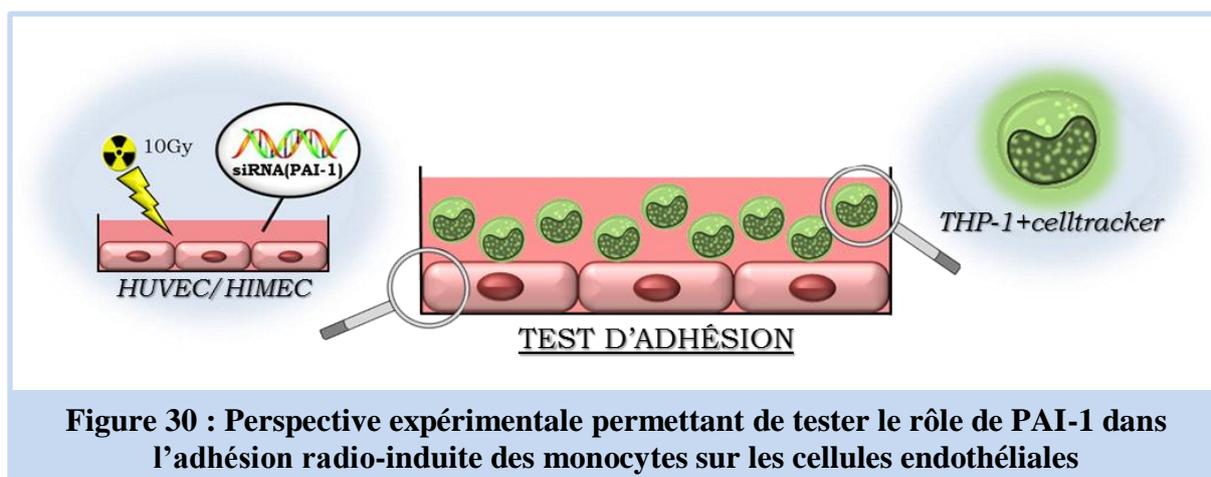


Figure 30 : Perspective expérimentale permettant de tester le rôle de PAI-1 dans l'adhésion radio-induite des monocytes sur les cellules endothéliales

Outre une diminution de l'infiltrat de macrophages dans le tissu irradié, nous avons également constaté une différence qualitative de ces cellules, qui s'exprime par une polarisation différentielle, dépendante du génotype des souris et du stade de la pathologie. Au cours des dernières années, il est en effet apparu que les macrophages, qui possèdent une plasticité phénotypique remarquable, peuvent être réversiblement polarisés en deux principaux sous-types, par voie d'activation classique (macrophages M1) ou alternative (macrophages M2), qui sont respectivement impliqués dans l'exacerbation et la résolution de l'inflammation (Classen et al., 2009). En effet, les M1 supportent la réponse Th1 en produisant des cytokines pro-inflammatoires, des ROS et des intermédiaires nitrogénés. A

contrario, les M2 supportent la réponse Th2 en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires ainsi qu'en favorisant leur capacité de phagocytose.

Un certain nombre de travaux ont établi un lien entre la polarisation des macrophages et la sévérité de différents types de lésions tissulaires à composante inflammatoire. Parmi eux, il a été montré que le tissu adipeux épical prélevé chez des patients souffrant de maladies artérielles coronariennes est plus riche en macrophages et en cytokines pro et anti-inflammatoires en comparaison à des tissus sains. De plus, la sévérité des atteintes coronariennes est corrélée avec la valeur du ratio M1/M2 ainsi que par le niveau d'expression des cytokines pro-inflammatoires. A contrario, l'expression des cytokines anti-inflammatoires est quant à elle inversement corrélée à la sévérité des atteintes tissulaires (Hirata et al., 2011). La polarisation des macrophages a également été étudiée dans le cadre des IBD, notamment grâce à l'utilisation du modèle de colite induite par le DSS chez la souris. Il a par exemple été montré que l'aggravation des symptômes de la colite provoquée par l'injection intrapéritonéale de chimérine est associée à une diminution de l'expression des gènes associés aux macrophages M2, tels que l'Arginase-1, Fizz1 ou l'IL10. Cette modification de l'expression génique semble liée à une diminution du nombre de macrophages anti-inflammatoires, puisque la chimérine inhibe *in vitro* la polarisation M2 induite par l'IL4 (Lin et al., 2014). De la même manière, et dans le même modèle expérimental, la déficience en SIRT2 chez la souris induit l'aggravation du tableau clinique et pathologique de la colite. Des études *in vitro* menées sur des cellules de moelle SIRT2^{-/-} différenciées en macrophages, ont montré que ces dernières présentaient un état pro-inflammatoire à l'état basal, lié à une augmentation de l'activité du facteur de transcription NFκB. En outre, ces cellules SIRT2^{-/-} présentent une diminution de la polarisation M2 liée à la voie de signalisation IL4/GATA3 (Lo Sasso et al., 2014).

L'effet de cette plasticité phénotypique des macrophages a également été étudié dans le contexte de l'athérosclérose chez les souris ApoE^{-/-}. Chez ces animaux, les lésions athérosclérotiques qui se développent spontanément sont initialement enrichies en macrophages M2, qui subissent un changement phénotypique vers un profil M1 au cours de l'évolution de la pathologie (Khallou-Laschet et al., 2010). Il est intéressant de constater que la polarisation des macrophages dans notre modèle d'entérite radique semble suivre la même évolution chez les souris PAI-1^{flx/flx}. En effet, les tissus intestinaux de ces animaux présentent une augmentation significative du nombre de macrophages M2 trois jours après irradiation,

qui diminue progressivement jusqu'à J42, où cette baisse devient significative en comparaison aux souris sham et PAI-1 KO^{endo} irradiées. En parallèle, le nombre de macrophages M1 augmente au cours du temps, et de manière significative à sept jours et six semaines après irradiation. Une explication possible de cette évolution phénotypique d'un phénotype M2 vers un phénotype M1 se trouve peut-être dans le changement micro-environnemental qui intervient au cours de la pathologie. Par exemple, l'irradiation est responsable de l'installation d'un état inflammatoire chronique et d'un stress oxydant, qui peuvent indirectement influencer la polarisation des macrophages. Une étude récente, elle aussi réalisée sur des souris ApoE^{-/-}, semble par ailleurs aller dans ce sens. En effet, l'exposition de lésions athérosclérotiques à une irradiation dose unique de 14Gy entraîne un enrichissement progressif en macrophages, significatif à 12 semaines après irradiation, avec une proportion de macrophages M1 supérieure à celle des macrophages M2. De plus, des tests de polarisation réalisés *in vitro* sur des cellules de moelle différenciées en macrophages, montrent que l'irradiation favorise l'expression des gènes spécifiques des macrophages M1 et M2 après traitement au LPS ou à l'IL4 respectivement (Gabriels et al., 2014). Nous retiendrons de l'ensemble de ces travaux qu'une augmentation de la proportion des macrophages M1, associée ou non à une diminution des macrophages M2, semble accentuer les lésions tissulaires dans différents modèles pathologiques.

Dans le cadre de notre étude, les résultats suggèrent que l'inhibition du pool de PAI-1 sécrété par l'endothélium influence la polarisation des macrophages, en limitant l'augmentation du nombre de macrophages M1, ainsi qu'en favorisant l'augmentation du nombre de macrophages M2 en phase chronique de l'entérite radique. Une manière de déterminer si cet effet de PAI-1 est direct serait de mettre en place un protocole de polarisation des macrophages *in vitro*. Ainsi, nous pourrions évaluer si l'ajout de PAI-1 recombinant dans le milieu de culture d'une lignée monocyttaire, les THP-1 par exemple, modifie la polarisation M1 induite par le LPS, ou la polarisation M2 induite par l'IL4 (Figure 31).

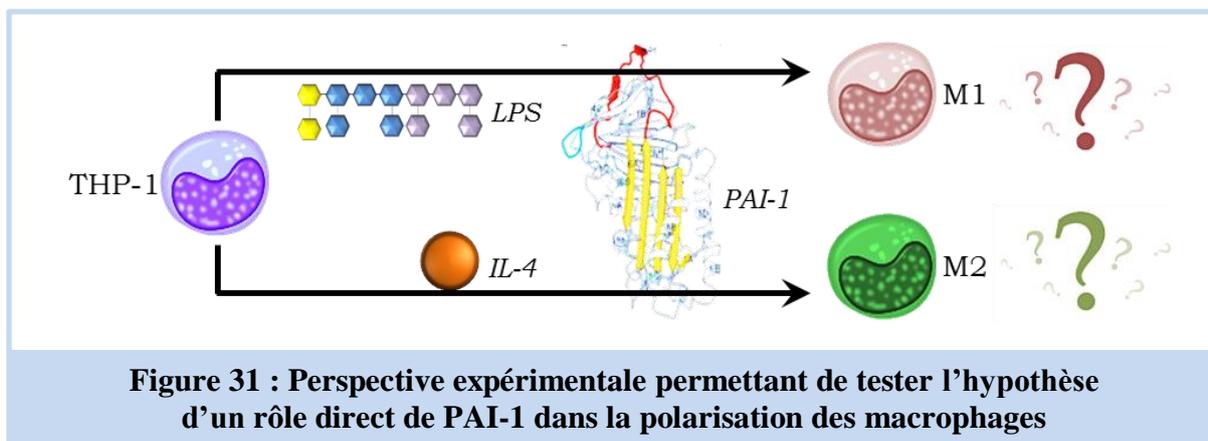


Figure 31 : Perspective expérimentale permettant de tester l’hypothèse d’un rôle direct de PAI-1 dans la polarisation des macrophages

Ainsi, nous observons chez les souris PAI-1 KO^{endo} une diminution de l’infiltrat des macrophages sept jours après irradiation, qui est associée à une diminution des lésions tissulaires, ainsi qu’une meilleure régénération épithéliale une et six semaines après irradiation. Par ailleurs, ces macrophages présentent une polarisation différentielle entre les souris PAI-1^{flx/flx} et PAI-1 KO^{endo} à trois, sept et quarante-deux jours après irradiation. Cependant, il est impossible en l’état actuel des résultats, de déterminer lequel de ces paramètres influence l’autre. En d’autres termes, est-ce la diminution du nombre de macrophages et leurs polarisations différentielles qui sont à l’origine des lésions tissulaires moins sévères, ou est-ce la diminution des lésions intestinales qui crée un microenvironnement limitant la migration des monocytes et modifie leur polarisation ? Une manière de répondre à cette question serait d’induire *in vivo* la déplétion des macrophages intestinaux par l’utilisation de liposomes contenant du chlodronate (Cl₂MBP). Cette technique de suicide des macrophages, décrite en 1989 par Rooijnen, utilise les propriétés des liposomes qui sont spécifiquement phagocytés par les macrophages, puis dégradés par les phospholipases contenues dans les lysosomes, permettant à la drogue de se répandre dans l’ensemble des compartiments cellulaires (Van Rooijnen, 1989). Le chlodronate induit alors l’apoptose des macrophages dans les heures qui suivent la phagocytose des liposomes, tant *in vitro* qu’*in vivo* dans des modèles rongeur (Naito et al., 1996). Cette technique permettrait de surcroît la déplétion des macrophages à différents stades de l’évolution de l’entérite radique, afin de discriminer l’impact de ces cellules de l’immunité innée sur les atteintes aiguës et chroniques (Figure 32). Un tel protocole a par ailleurs été utilisé afin d’étudier le rôle des macrophages dans la pathogénèse des IBD, notamment dans des modèles de colite ulcéraive. Ainsi, la déplétion des macrophages par injections intrarectales ou péritonéales chez des souris IL10^{-/-}, qui développent spontanément une inflammation muqueuse confinée au colon (Nakase et al., 2002), entraîne une diminution de la sévérité des lésions histopathologiques et du processus inflammatoire (Watanabe et al., 2003; Holgersen et al., 2014). A contrario,

l'injection intrarectale de liposome de chlodronate utilisée cette fois dans un modèle de colite induite par le DSS (Dextran Sulfate Sodium) dans trois lignées différentes de souris, provoque cette fois des lésions histologiques, notamment épithéliales, plus sévères, qui semblent liées à une augmentation de l'infiltrat des neutrophiles (Qualls et al., 2006). Ces résultats à priori contradictoires s'expliquent probablement par les différences importantes des modèles utilisés. En effet, dans un cas, l'absence d'expression du gène codant l'IL10 dès le stade embryonnaire induit chez les animaux une colite progressive liée à l'exposition chronique de l'intestin à la flore commensale. Dans l'autre cas, l'inflammation colique est provoquée par une substance chimique, le DSS, le statut immunitaire des animaux étant lui normal. Le rôle des macrophages dans l'inflammation intestinale semble donc dépendant du modèle choisi. C'est pourquoi, nous ne pouvons pas anticiper si, dans notre modèle d'entérite radique, la déplétion des macrophages chez les souris PAI-1 KO^{endo} influencerait l'évolution de la pathologie.

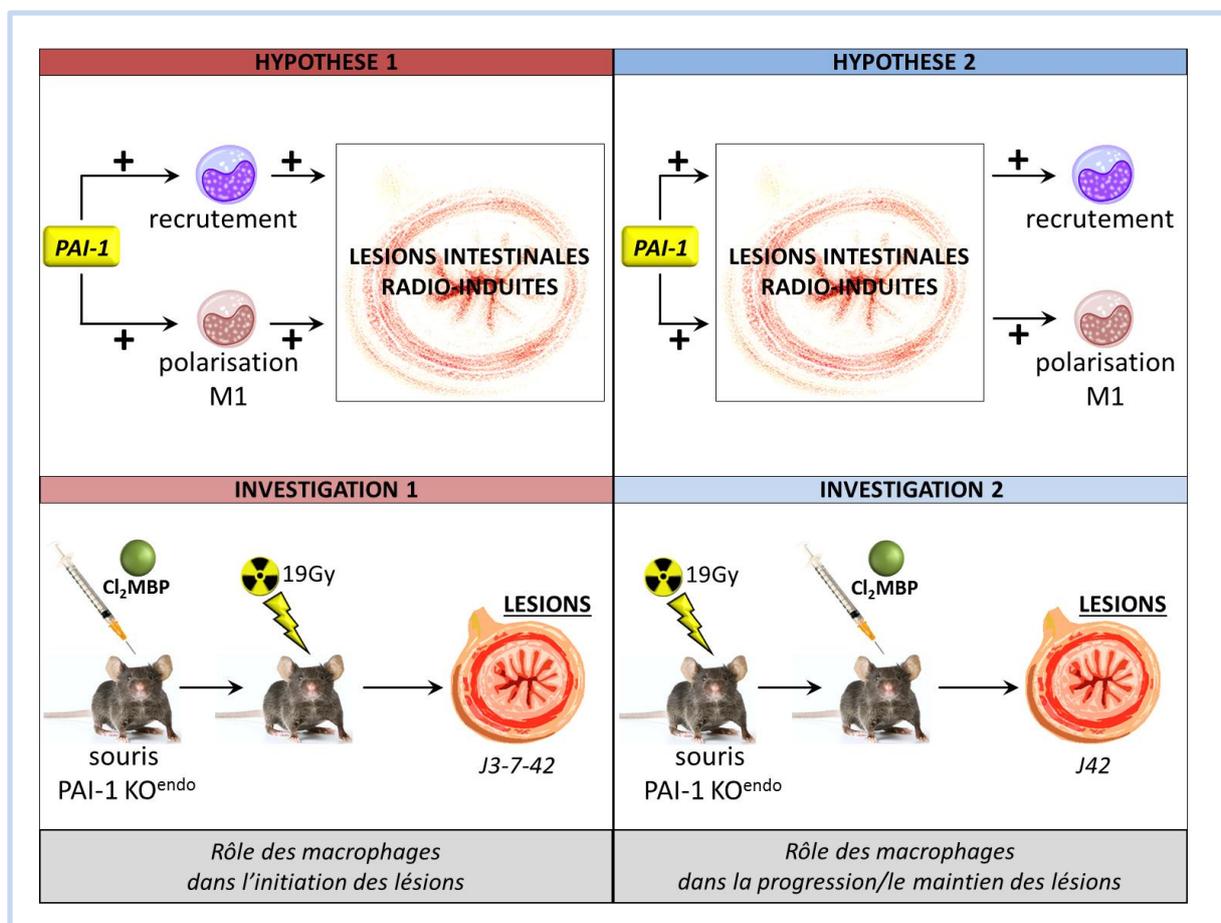


Figure 32 : Perspectives expérimentales permettant de discriminer les liens de causes à effets entre l'infiltrat de macrophages et la sévérité des lésions radiques

L'implication de PAI-1 dans la physiopathologie des lésions radio-induites aux tissus sains pourrait être liée à la sénescence des cellules endothéliales.

En effet, il existe depuis quelques années l'émergence d'un concept reliant la sénescence des cellules endothéliales et les atteintes vasculaires radio-induites. Les premiers travaux s'intéressant à ce sujet ont été publiés en 2001, et décrivent l'apparition d'un phénotype sénescence chez des cellules endothéliales aortiques bovines exposées à des doses de 5 à 15Gy, et ce de manière dose et temps dépendantes. Ces cellules présentent alors une morphologie élargie et aplatie, typique des cellules sénescence, associée à l'apparition de l'activité β -Galactosidase et la surexpression très précoce de p21 qui perdure dans le temps (Oh et al., 2001). Plus précisément, les travaux réalisés dans les années suivantes par l'équipe de Masahiko Miura montrent que 80 à 90% de ces mêmes cellules endothéliales présentent un phénotype sénescence 5 jours après une exposition de 8Gy. Ce phénotype est associé à une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la réplication de l'ADN et le cycle cellulaire, (Igarashi et al., 2007) présentant de ce fait un profil très similaire à des cellules en sénescence répliquative. Ce processus semble par ailleurs intimement lié à l'efficacité de réparation des cassures double brin de l'ADN (Igarashi et Miura, 2008). En outre, une étude récente a montré que l'exposition de cellules endothéliales pulmonaires humaines à une irradiation de 10Gy induit une augmentation de l'expression des facteurs de croissance IGF1 et 2, associée à une augmentation de l'activation de leur récepteur IGFR1. Ces modifications semblent être à l'origine de l'apparition de la sénescence radio-induite de ces cellules, via la surexpression de p53 et p21 médiée par la voie de signalisation PI3K/Akt et mTOR (Panganiban et Day, 2013). D'un point de vue fonctionnel cette fois, il a été montré très récemment l'existence d'un lien potentiel entre la sénescence radio-induite des cellules endothéliales et l'augmentation de l'adhésion des monocytes sur ces mêmes cellules. En effet, l'exposition de cellules endothéliales coronariennes humaines à une irradiation de 10Gy induit une augmentation de l'adhésion des cellules monocytaires HL-60 dès 7 jours après irradiation, et ce spécifiquement au niveau des cellules présentant un phénotype sénescence. Cette potentialisation radio-induite de l'adhésion semble liée à une augmentation de l'expression de CD44, par déméthylation du promoteur au niveau des cellules sénescence, et impliquerait une interaction directe entre cette glycoprotéine membranaire et les monocytes (Lowe et al., 2014). De ce fait, au-delà d'être une conséquence de l'irradiation, les anomalies liées au phénotype sénescence des cellules endothéliales après irradiation pourrait participer au développement des vasculopathies radio-induites.

Quelques travaux réalisés *in vivo* démontrent également la présence de cellules sénescents après irradiation dans différents tissus, bien que la sénescence ne concerne pas, dans ces cas, les cellules endothéliales. D'une part, l'exposition de souris C57bl6 à une irradiation de 6Gy TBI induit des lésions résiduelles au niveau de la moelle, via l'induction de la sénescence des cellules souches pré-matures. Ces cellules présentent alors une augmentation de l'expression de p16 ainsi que de l'activité β -Galactosidase (Shao et al., 2014). D'autre part, une irradiation thoracique de 17.5 Gy induit chez la souris une augmentation du nombre de cellules sénescents au niveau du poumon, dès 4 semaines après irradiation. Le marquage positif de ces cellules sénescents avec la protéine C du surfactant démontrent qu'il s'agit de cellules épithéliales alvéolaires de type II (Citrin et al., 2013).

Comme nous l'avons détaillé dans l'introduction, PAI-1 est un marqueur et acteur clé du processus de sénescence. De plus, comme nous l'avons également indiqué, la surexpression radio-induite de cette protéine a été montrée au laboratoire, au niveau de l'intestin grêle ou du colorectum. A la lumière de ces données expérimentales, il est donc légitime de s'interroger sur le lien éventuel que pourrait représenter PAI-1 entre la sénescence des cellules endothéliales et la pathogénèse des lésions tissulaires radio-induites. Une telle question pourrait être abordée par des approches à la fois *in vitro* et *in vivo*. A l'échelle cellulaire tout d'abord, il serait intéressant d'observer si l'extinction de PAI-1 par siRNA influence l'apparition précoce de la sénescence chez des HUVECs ou des HIMECs après une irradiation de 20Gy. A l'échelle préclinique, il serait dans un premier temps nécessaire de confirmer ou d'infirmer le statut sénescents des cellules endothéliales après irradiation, par exemple dans le modèle d'entérite radique utilisé pour ce projet. Cette démonstration pourrait se faire par exemple grâce à l'utilisation de souris Tie2-GFP, qui expriment la protéine fluorescente dans l'endothélium, et sont disponibles au laboratoire. Ainsi, la présence d'un comarquage β -Galactosidase/GFP réalisé en fluorescence sur les tissus irradiés cryopréservés attesterait du statut sénescents des cellules endothéliales. Dans un second temps, si la sénescence radio-induite des cellules endothéliales est confirmée, l'utilisation des souris PAI-1 KO^{endo} se révélerait particulièrement intéressante pour étudier le rôle de cette protéine dans le processus *in vivo*. En effet, l'influence potentielle de l'absence de sécrétion de PAI-1 par les cellules endothéliales sur l'induction du statut sénescents, observée par exemple grâce à un double marquage β -Galactosidase/vWF sur tissus cryopréservés, représenterait un lien direct entre cette protéine et la sénescence radio-induite des cellules endothéliales. De ce fait, une telle observation suggérerait pour la première fois

un lien entre la sénescence et la pathogénèse des lésions tissulaires radio-induites, ouvrant la voie à d'éventuelles pistes thérapeutiques.

Les effets bénéfiques de la délétion du gène SERPINE1 dans l'endothélium sont potentiellement liés à l'action de ses cibles uPA et tPA.

Nous avons montré, grâce aux travaux réalisés dans le cadre de ce projet de thèse, les bénéfices de la délétion endothélium-spécifique de SERPINE1 sur la physiopathologie de l'entérite radique. Cependant, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent cet effet protecteur demeurent obscurs. La principale fonction physiologique de PAI-1 implique l'inhibition de ses protéases cibles, uPA et tPA, et donc par extension de la fibrinolyse par une diminution de l'activation du plasminogène. Nous ne pouvons donc pas exclure que les conséquences de la délétion de SERPINE1 soient en réalité le reflet d'une augmentation de l'activité de ces protéines.

De nombreuses études mettent en évidence un rôle plutôt pro-inflammatoire du système d'activation du plasminogène, notamment en favorisant l'adhésion et la migration des leucocytes au niveau des cellules endothéliales, comme nous l'avons détaillé dans l'introduction. Or, certains travaux mettent également en lumière des fonctions cette fois anti-inflammatoires de ces enzymes. Tout d'abord, il a été montré que la stimulation prolongée par le TNF α de cellules endothéliales en culture entraîne une réduction de moitié de l'expression de tPA par ces cellules, mécanisme qui passe par l'inhibition des voies de signalisation NF κ B et p38 MAPK (Ulfhammer et al., 2006). Ainsi, un stimulus inflammatoire prolongé entraîne une diminution de l'expression de tPA par les cellules endothéliales. De plus, le lien entre les activateurs du plasminogène et le processus inflammatoire a également été montré dans différents modèles *in vivo*. En effet, dans un modèle de colite induite par injection intrarectale de DSS chez la souris, la déficience génétique en PLAU (le gène codant uPA) induit une réponse inflammatoire plus forte une semaine après l'initiation du traitement en comparaison aux souris contrôles. Cette exacerbation de l'inflammation est caractérisée par un infiltrat tissulaire de neutrophiles et de macrophages plus important, ainsi que par une augmentation de l'expression de médiateurs principalement pro-inflammatoires, tels que le TNF α , l'IL-6 et l'IL-17 (Karamanavi et al., 2014). Cette sérine protéase apparaît donc comme un modulateur de la réponse inflammatoire dans ce modèle expérimental. En outre, dans un modèle d'arthrite induite par injections intradermiques répétées de collagène type II, la déficience génétique en

PLAT (le gène codant tPA) provoque une pathologie plus sévère, en comparaison aux souris contrôles. Cette aggravation du score clinique est associée à une augmentation du dépôt de fibrine, ainsi qu'à une augmentation de l'expression des médiateurs inflammatoires $TNF\alpha$ et $IL-1\beta$ au niveau des articulations des pattes. De plus, les L_T isolés à partir de ces souris présentent une prolifération plus importante, associée à une augmentation de la sécrétion $IFN\gamma$ dans le milieu (Cook et al., 2002). Ainsi, tPA semble également impliqué dans la régulation cellulaire et humorale du processus inflammatoire.

Une explication possible de ces effets anti-inflammatoires des activateurs du plasminogène concerne leur action sur l'homéostasie de la fibrine, connue pour ces propriétés pro-inflammatoires. Notamment, les dépôts extravasculaires de fibrine augmentent la morbidité de nombreuses pathologies chroniques, telles que la fibrose (de Giorgio-Miller et al., 2005) la dystrophie musculaire (Vidal et al., 2008) ou la polyarthrite rhumatoïde (Flick et al., 2007) principalement via un état inflammatoire persistant. D'un point de vue mécanistique, il a été montré *in vitro* dans un modèle de polymérisation de la fibrine sur des HUVECs, que celle-ci induit une augmentation rapide, dose et temps-dépendante, de l'expression de l'IL-8 et d'ICAM-1, impliquées respectivement dans la chémoattraction et l'adhésion des leucocytes (Qi et al., 1997; Qi et al., 1997). La fibrine contribue donc directement au recrutement des cellules immunitaires. *In vivo* cette fois, la déficience génétique en plasminogène chez la souris provoque l'apparition d'une ostéoporose sévère, pathologie caractérisée par un état inflammatoire persistant. Cet état est lié à l'action du fibrinogène, qui en activant le récepteur aux intégrines $\alpha_M\beta_2$ présent à la surface des macrophages, entraîne une inflammation chronique (Cole et al., 2014). La plasmine, via la dégradation de la fibrine, permet donc un contrôle du processus inflammatoire. De plus, l'existence d'un lien entre activation du plasminogène, fibrine et inflammation a pu être clairement démontrée par l'utilisation de souris transgéniques, qui présente une substitution de 4 acides aminés au niveau du domaine de liaison entre uPA et uPAR. Cette mutation empêche ainsi l'interaction entre ces deux protéines, tout en conservant les autres propriétés physiologiques des deux acteurs. Ces animaux, à l'âge d'un an, présentent une accumulation intravasculaire de fibrine au niveau du tissu hépatique, qui colocalise avec les infiltrats de neutrophiles et de L_T . De plus, la reconstitution tridimensionnelle des foyers inflammatoires hépatiques, après marquage immunohistochimique de la fibrine et des L_T , montre que ces derniers sont organisés autour de noyaux composés de fibrine. De manière intéressante, des résultats similaires sont retrouvés chez les souris $PLAU^{-/-}$ et $PLAUR^{-/-}$ (Connolly et al.,

2010). Ainsi, la fixation d'uPA sur son récepteur semble prévenir l'apparition d'un état inflammatoire chronique en contrôlant la clairance de la fibrine.

Ces données bibliographiques semblent donc appuyer l'hypothèse que les effets bénéfiques de la déficience en PAI-1, partielle ou complète, pourraient être liés à une augmentation de l'activité d'uPA ou de tPA, et ce par un mécanisme pouvant impliquer la fibrine. Cependant, le marquage immunohistochimique de la fibrine réalisé sur nos échantillons tissulaires irradiés montre un dépôt extravasculaire fort et précoce de fibrine après irradiation, mais ne révèle aucune différence entre les souris PAI-1^{flx/flx} et PAI-1 KO^{endo}, et ce à des temps allant de 24h à 6 semaines post-irradiation. Cette observation peut trouver deux explications. Dans un premier cas, il existe bien un lien entre PAI-1, les activateurs du plasminogène, et l'évolution de l'entérite radique, et la voie moléculaire impliquée est indépendant de la fibrine. Dans un second cas, la modification radio-induite de la voie d'activation du plasminogène impacte bien la clairance de la fibrine, et donc le processus inflammatoire, mais le protocole de quantification du dépôt extravasculaire de fibrine utilisé dans cette étude n'est peut-être pas assez sensible pour détecter des différences, si celles-ci sont de l'ordre du subtil.

Ce lien potentiel entre le système d'activation du plasminogène et l'évolution de l'entérite radique pourrait être abordé de différentes manières. Tout d'abord, il serait intéressant de vérifier si les activateurs du plasminogènes sont effectivement impliqués dans la progression des lésions intestinales radio-induites. Cette question nécessiterait alors l'utilisation de souris PLAU^{-/-} et PLAT^{-/-} dans notre modèle expérimental, ainsi qu'un suivi de la pathogénèse de l'entérite radique (Figure 33). Une autre possibilité consisterait, par exemple, en l'injection de tPA recombinant après l'irradiation localisée de souris contrôles. Un tel traitement est par exemple utilisé dans le traitement des anévrismes cérébraux (Vivien et Ali, 2012). Dans l'hypothèse où au moins l'un des deux activateurs du plasminogène se retrouve impliqué dans le processus physiopathologique inhérent aux lésions tissulaires radiques, il serait alors pertinent d'étudier si les effets bénéfiques de la délétion de SERPINE1 sur le développement de la pathologie passent par l'une de ses deux cibles. Si tel est le cas, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'uPA ou de tPA sur des souris PAI-1^{-/-} ou PAI-1 KO^{endo} irradiées localement au niveau du grêle, annulerait alors la protection conférée par le génotype de ces animaux (Figure 34).

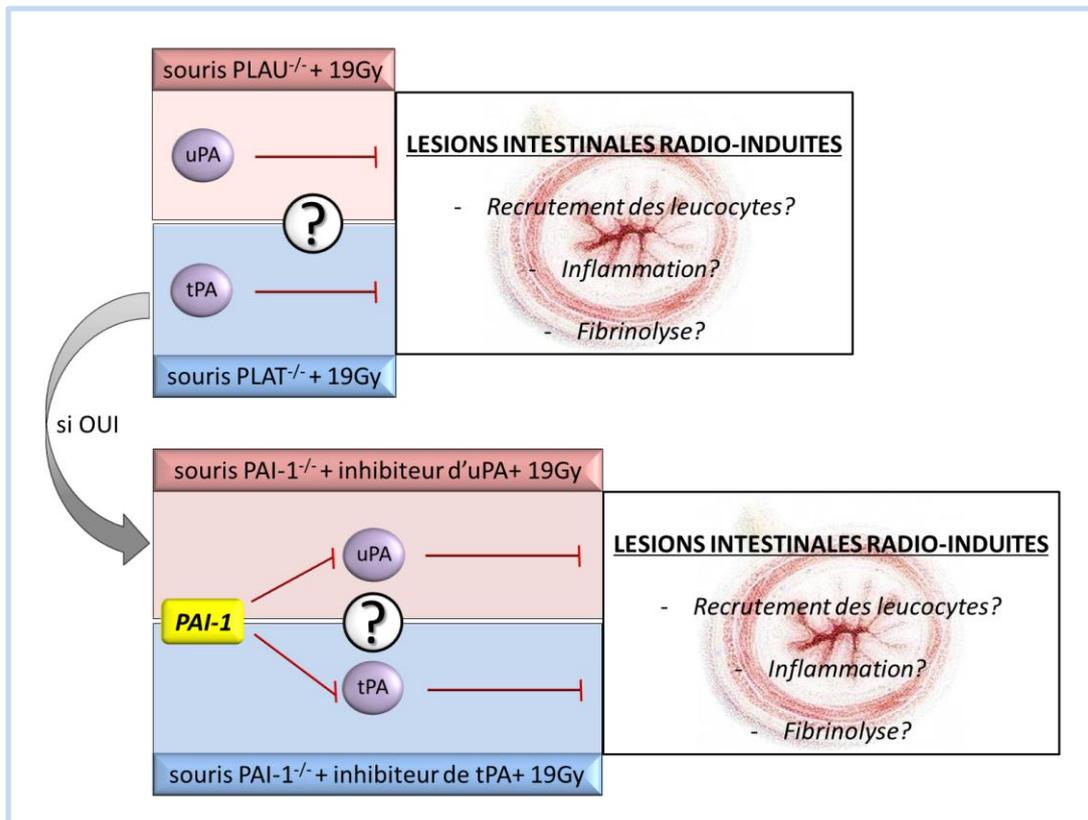


Figure 33 : Perspectives expérimentales visant à étudier le rôle potentiel d'uPA et tPA dans les bénéfices liés à l'inhibition de SERPINE1

Nous pouvons citer comme exemple d'inhibiteur d'uPA la molécule synthétique UK122, commercialisée par Santa Cruz, dont l'efficacité a été montrée *in vitro* sur des cellules CFPAC-1 (Zhu et al., 2007), et qui a déjà été utilisée dans un modèle d'épilepsie chez la souris (Cho et al., 2012). De même, nous pouvons citer comme exemple d'inhibiteur de tPA le (2,7-bis(4 amidinobenzylidene)-cycloheptan-1-one dihydrochloride), appelé tPA stop, commercialisé par American Diagnostica, dont l'efficacité a été testée *in vitro*, et qui a été utilisée dans un modèle d'atteintes cérébrales chez le rat (Liot et al., 2004).

PAI-1 apparaît comme une cible thérapeutique de choix dans le traitement de l'entérite radique.

En effet, une autre portée de ces travaux, plus appliquée cette fois, concerne l'intérêt de l'inhibition de PAI-1 comme stratégie thérapeutique ciblant l'entérite radique, et les lésions tissulaires radiques au sens large. Plusieurs arguments viennent étayer cette piste. Tout d'abord, dans des modèles précliniques mis en place au laboratoire, il a été montré que la délétion génétique de SERPINE1 chez la souris confère à ces animaux une protection efficace contre l'entérite radique (Milliat et al., 2008; Abderrahmani et al., 2009). Le rôle

prépondérant de cette protéine, et donc de son intérêt thérapeutique, a également été confirmé par les travaux réalisés dans le cadre de ce projet de thèse. Ainsi, la délétion même partielle du gène SERPINE1, dans notre cas dans les cellules endothéliales exclusivement, limite les lésions intestinales radio-induites et améliore la survie des animaux, et ce dans le même modèle expérimental.

Au-delà des modèles radiopathologiques, l'inhibition de PAI-1 a déjà montré une efficacité certaine dans de nombreux modèles précliniques de fibrose à forte composante inflammatoire, comme c'est le cas de l'entérite radique. De manière non exhaustive, les souris déficientes pour PAI-1 se révèlent résistantes face à la fibrose pulmonaire induite par instillation de bléomycine (Bauman et al., 2010), à la fibrose rénale induite par ligature de l'uretère (Oda et al., 2001) ainsi qu'à la fibrose hépatique induite par ligature des canaux biliaires (Wang et al., 2007). De la même manière, l'utilisation de différents inhibiteurs de PAI-1 a révélé une protection similaire dans des modèles analogues. D'une part, l'utilisation de petites molécules inhibitrices limite chez la souris le développement d'une fibrose pulmonaire induite par la bléomycine ou l'instillation d'adénovirus contenant du TGF- β 1 (Izuhara et al., 2008; Huang et al., 2012) ainsi que la sévérité de la fibrose périaortique initiée par le L-NAME (Boe et al., 2013). D'autre part, l'utilisation de molécules d'ARN interférentes (siRNA ou shRNA) a montré son efficacité dans des modèles de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez le rat (Zhang et al., 2012) et la souris (Senoo et al., 2010) ainsi que dans deux modèles de fibrose hépatique chez le rat (Hu et al., 2008).

Un paramètre crucial à considérer lors du développement de stratégies thérapeutiques ciblant les lésions tissulaires liées aux traitements des cancers par radiothérapie est la pathologie cancéreuse elle-même. En effet, ces approches thérapeutiques ne doivent en aucun cas entraver l'objectif initial de la radiothérapie, voire dans le meilleur des cas la potentialiser. C'est cette dualité, délicate à obtenir, qui fait de PAI-1 une cible thérapeutique particulièrement attractive dans le cadre de ce type de traitement. Car au-delà de son rôle crucial dans les pathologies fibrotiques et radio-induites, cette protéine est également un acteur clé de la progression tumorale, comme nous l'avons évoqué dans l'introduction à propos de PAI-1 dans les pathologies non radio-induites. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs spécifique de cette SERPINE a déjà montré des bénéfices sur différents paramètres déterminants de la tumorigénèse. Ainsi, l'administration de tiplaxtinine par gavage dans des modèles de xénogreffes sur des souris nudes limite la croissance tumorale, liée à une

diminution de la néoangiogenèse et de la prolifération des cellules cancéreuses, ainsi qu'à une augmentation de l'apoptose de ces cellules (Gomes-Giacoa et al., 2013). De la même manière, l'ajout de SK-216 (un autre inhibiteur de PAI-1) dans l'eau de boisson de souris nudes, limite la croissance des tumeurs dans un modèle de xénogreffe, ainsi que l'invasion métastatique dans un modèle d'injections intraveineuses de cellules tumorales (Masuda et al., 2013).

L'intérêt de PAI-1 comme cible thérapeutique dans le contexte des effets secondaires de la radiothérapie pose alors la question de la nature de l'inhibiteur le plus adéquat. En effet, l'étude réalisée au sein du laboratoire sur les effets du tiplaxtinine, qui était la seule molécule pharmacologique disponible à cette époque, a montré un bénéfice limité de ce traitement sur l'évolution de l'entérite radique. Ces résultats mitigés peuvent potentiellement s'expliquer par l'incapacité du tiplaxtinine à inhiber le pool de PAI-1 qui est lié à son cofacteur, la vitronectine (Abderrahmani et al., 2009). Le choix de la molécule inhibitrice se révèle donc crucial dans le test de la faisabilité d'un tel traitement dans des modèles précliniques. De nombreux inhibiteurs de faibles poids moléculaires ont été décrits depuis, bien que peu d'entre eux soit à ce jour disponibles dans le commerce. A titre d'exemple, le CDE-096 possède des caractéristiques particulièrement intéressantes. En effet, cet inhibiteur à très haute affinité autorise une inhibition réversible, puisqu'il empêche la formation des complexes michaeliens avec ses cibles sans initier sa transition vers la forme latente. De plus, cette molécule est capable d'inhiber les pools de PAI-1 libres ou liés à la vitronectine avec la même efficacité (Li et al., 2013). Pour ces raisons, le CDE-096 mériterait donc d'être testé sur des modèles cellulaires et animaux.

Une autre alternative consisterait à utiliser des anticorps monoclonaux inhibiteurs de PAI-1, qui présentent potentiellement une efficacité et une spécificité supérieure aux molécules pharmacologiques. En effet, ces immunoglobulines ont déjà démontré leur efficacité dans l'inhibition de cette protéine, notamment lorsque cette dernière se trouve liée à son cofacteur. Par exemple, le MA-33H1F7 cible les molécules PAI-1 chez l'homme, et présente une réactivité croisée avec d'autres espèces (Debrock et Declerck, 1997). Cet anticorps a également montré son potentiel inhibiteur dans différents modèles de lésions pulmonaires *in vivo*, notamment des atteintes pulmonaires aiguës induites chez le rat par instillation bactérienne ou injection de LPS (Hofstra et al., 2013), ainsi que dans un modèle d'atteintes pleurales induites par la tétracycline chez le lapin (Florova et al., 2014). De plus,

l'équipe de Paul Declerck a récemment purifié un panel d'anticorps monoclonaux produits chez la souris, qui démontrent une forte activité inhibitrice de PAI-1, que la molécule soit complexée ou non avec la vitronectine, aussi bien *in vitro* que *in vivo* dans un modèle murin de thromboembolie. Ces anticorps présentent également une réactivité croisée avec les protéines humaines ou de rat, qu'elles soient glycosylées ou non (Van De Craen et al., 2011). Très récemment, l'un d'entre eux a par ailleurs montré son efficacité dans un autre modèle pathologique chez la souris. En effet, l'injection du MA-MP6H6 chez des animaux souffrant d'un sepsis abdominal induit par ligature du caecum, permet une neutralisation efficace de PAI-1, ainsi qu'une restauration complète de la fibrinolyse plasmatique (Raeven et al., 2014). Bien que ce type d'approche aient été utilisées au laboratoire dans un modèle murin de SGI sans bénéfices en terme de survie des animaux (Milliat et al., non publiés), il serait malgré tout intéressant de tester ces anticorps dans un modèle d'irradiation localisée du grêle.

Plusieurs options s'offriraient alors à nous pour tester l'efficacité de cette stratégie dans le traitement de l'entérite radique, grâce au modèle d'anse extériorisée chez la souris. Tout d'abord, il serait intéressant de tester si l'inhibition de PAI-1, débutée en amont de l'exposition aux rayons ionisants et stoppée à des temps plus ou moins longs en aval, peut protéger le tissu intestinal d'une réponse radio-induite délétère. Dans ce cas, cette stratégie thérapeutique constituerait un traitement préventif de l'entérite radique. Autre point capital, il serait nécessaire de tester si l'inhibition de PAI-1 peut traiter les processus inflammatoires ou fibrotiques initiés par l'irradiation, avec cette fois pour objectif d'utiliser cette stratégie en curatif, et non plus en préventif. Pour répondre à cette question, le traitement inhibiteur devra débiter au cours de la phase inflammatoire, à J7 par exemple, ou après l'installation de la fibrose radio-induite, comme par exemple à J42. En outre, ces tests permettraient de comprendre le rôle de PAI-1 à chaque étape de l'évolution de l'entérite radique. Initialement, cette question devait être abordée par l'utilisation du modèle PAI-1 KO^{endo(i)}, qui en théorie permet la délétion du gène SERPINE1 à un temps donné après irradiation. En pratique, cependant, les biais expérimentaux liés à l'utilisation du tamoxifène et à la difficulté d'évaluer précisément le délai entre les injections et la délétion effective du gène, n'ont pas permis d'utiliser de manière satisfaisante ce modèle.

CONCLUSION

Ce projet de thèse s'est articulé autour d'une thématique de travail mise en place depuis plusieurs années au laboratoire, qui porte sur le rôle de PAI-1 dans la pathogénèse de l'entérite radique. Cette protéine joue un rôle clé dans ce processus pathologique, et sa déficience spécifique au niveau de l'endothélium nous a permis de démontrer formellement l'existence d'un continuum endothélium-dépendant entre l'initiation, la progression, et le maintien des lésions intestinales radio-induites.

La place de l'endothélium dans le développement et l'évolution des lésions tissulaires consécutives à une irradiation est maintenant débattue depuis une quinzaine d'année. Ces travaux démontrent qu'un évènement moléculaire précis au niveau de l'endothélium, dans notre cas la délétion du gène SERPINE1, est capable d'influencer le devenir des lésions intestinales radiques, ainsi que la survie des animaux. En effet, nos souris déficientes pour SERPINE1 au niveau des cellules endothéliales, après irradiation localisée de l'intestin, présentent une meilleure survie, des lésions tissulaires moins sévères associées à un processus inflammatoire plus modéré, ainsi qu'une fibrose radique limitée. De plus, cette étude met pour la première fois en lumière le rôle potentiel de l'infiltrat de macrophages dans ce contexte de lésions radiques, notamment quant à leur polarisation. Ces travaux renforcent donc également le rôle crucial que joue cette SERPINE dans la pathogénèse de cette maladie, et notamment le pool de cette protéine sécrété par l'endothélium.

Enfin, comme les études précédentes l'ont souligné, l'inhibition de PAI-1 constitue une piste thérapeutique particulièrement prometteuse afin de protéger ou de traiter les tissus sains lors de la mise en place de protocoles radio thérapeutiques. D'une part, la déficience de SERPINE1, même partielle, améliore significativement le tableau clinique de la pathologie dans le modèle préclinique utilisé au laboratoire. D'autre part, PAI-1 figure parmi les facteurs de virulence et de mauvais pronostics dans de nombreux types de cancers. Le rôle dichotomique de cette protéine dans les pathologies radiques et cancéreuses permettrait donc de ne pas entraver, voire de potentialiser, les traitements anti-cancéreux.

ANNEXES : LE MODELE CRELOX

1) Principes généraux

a) La Cre recombinase et les séquences LoxP

Le système CreLox est un système de recombinaison génétique spécifique d'origine bactérienne, composé d'une enzyme recombinase et de séquences cibles. La **Cre** (Cyclization REcombinase), est une recombinase site-spécifique de 38 kDa provenant du bactériophage P1. Cette protéine est un tétramère (Figure 35), composé de deux sous-unités catalytiques, et de deux sous-unités non catalytiques (Ennifar et al., 2003). Elle catalyse la recombinaison réciproque au niveau de loci de crossing-over spécifiques, les **sites LoxP** (Locus of crossing-over X of P1), et ce indépendamment de cofacteurs énergétiques (ATP) (Sauer et Henderson, 1988). Ces sites LoxP (Figure 35) sont constitués de deux séquences de 13pb, inversées et répétées, séparées par une région intermédiaire variable de 8pb (soit 34pb au total).

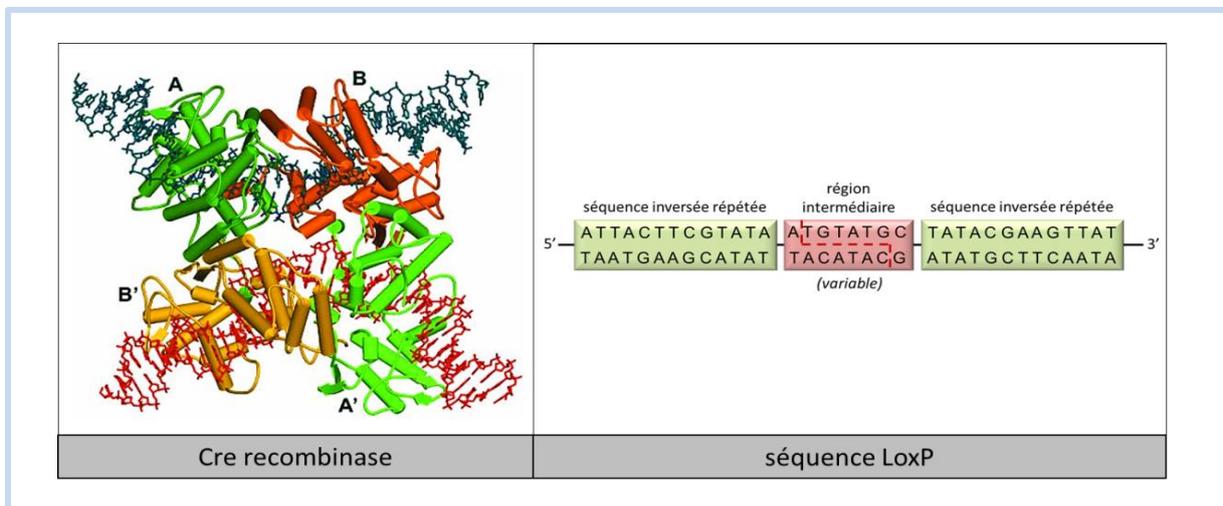
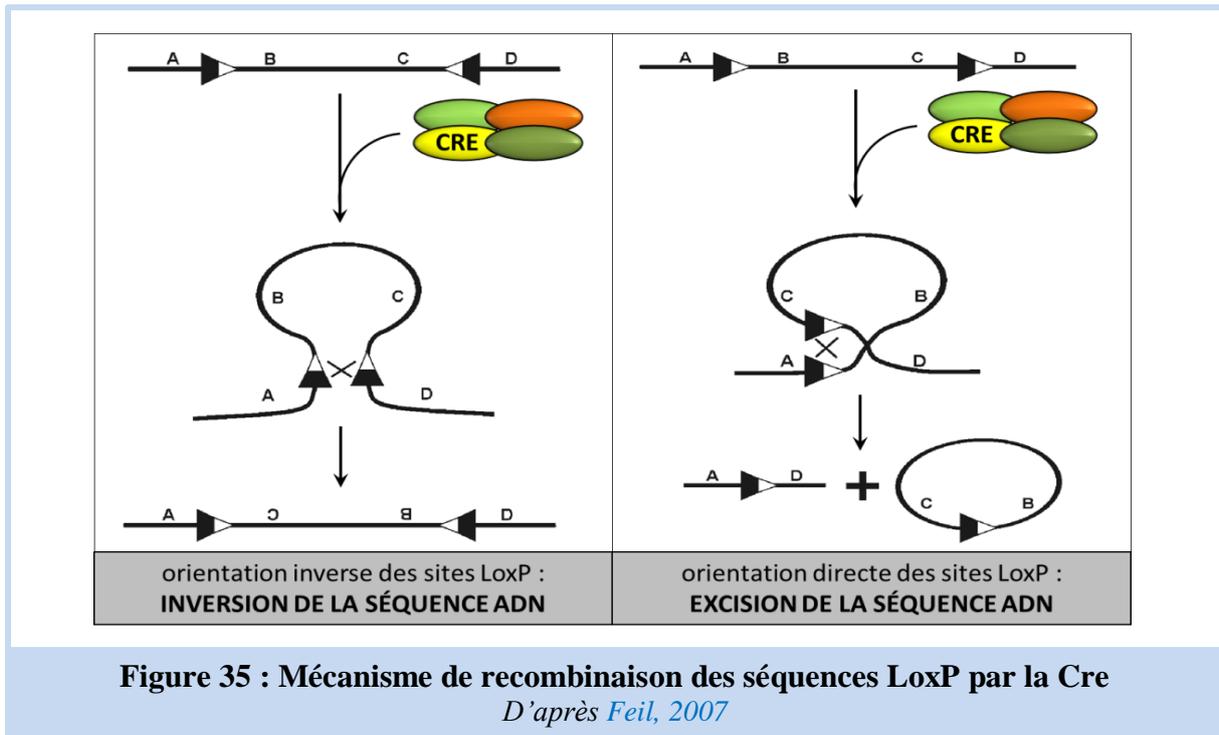


Figure 34 : Structure de la Cre recombinase et des séquences LoxP

Gauche : les sous-unités catalytiques sont représentées en vert, les sous-unités non catalytiques sont représentées en orange, et les séquences ADN cible en rouge et noir (Ennifar et al., 2003).
Droite : le site de clivage de la séquence LoxP par la Cre est représenté par les pointillés rouges.

Le mécanisme de recombinaison implique la reconnaissance par la Cre des deux séquences répétées et inversées de 2 sites LoxP, et le clivage double-brin par les sous-unités catalytiques au niveau des régions intermédiaires (Figure 35) (Sauer et Henderson, 1988). La recombinaison peut intervenir de manière intra-moléculaire ou inter-moléculaire, sur une molécule d'ADN aussi bien linéaire que super enroulée. L'action de la Cre est guidée par l'orientation des sites LoxP (Abremski, 1983) : une répétition inversée entraîne une inversion

de la séquence ADN floxée (encadrée par deux séquences LoxP), alors qu'une répétition directe entraîne une excision de la séquence floxée, qui est alors dégradée (Figure 36).



b) Application à la transgénèse *in vivo*

Parmi les nombreux modèles animaux permettant l'étude de la physiologie ou de la physiopathologie humaine, le modèle murin s'est imposé au fil du temps comme indispensable grâce au développement d'un large éventail de techniques de modification génétique. En effet, la souris est longtemps restée la seule espèce possédant des cellules ES manipulables (Embryonic Stem cells, cellules souches embryonnaires), notamment par recombinaison homologue, qui représente un outil puissant de transgénèse ciblée et transmissible à la descendance. L'étude du contrôle génétique du développement et de la physiologie a ainsi été révolutionnée par cette capacité à inactiver spécifiquement un gène par recombinaison homologue chez la souris (Thomas et Capecchi, 1987). Cependant, cette stratégie visant à insérer des mutations dans la lignée germinale des animaux par recombinaison homologue possède de nombreuses limites. Tout d'abord, l'apparition de mutation embryoléthale implique l'impossibilité d'étudier la fonction d'un gène plus tard dans le développement, ou chez l'adulte. De plus, la mutation d'un gène codant une protéine pléiotrope peut conduire à l'apparition de phénotypes complexes, difficiles à interpréter. En outre, il existe une possibilité de compensation d'une mutation lors du développement (comme par exemple dans le cas d'une famille de gènes), qui prévient alors l'apparition d'un

phénotype modifié chez l'adulte. Enfin, une telle approche peut entraîner des problèmes d'infertilité chez les animaux ainsi que des désordres systémiques (Letterio et al., 1994; Diebold et al., 1995).

Le développement de méthodes de ciblage génétique conditionnel est alors devenu incontournable. En effet, un **contrôle spatial** implique l'inactivation d'un gène dans un tissu ou un type cellulaire cible, et un **contrôle temporel** implique l'inactivation d'un gène à des stades précis du développement ou de la vie des animaux. C'est ainsi qu'est apparue la stratégie de recombinaison conditionnelle site-spécifique grâce au système CreLox. Le principe de cette stratégie consiste à obtenir des animaux exprimant d'une part une version floxée d'un gène cible (grâce à la recombinaison homologue réalisée sur les cellules ES), et d'autre part la Cre recombinase placée sous le contrôle d'un promoteur tissu-spécifique. De cette manière, l'inactivation du gène est spécifique des cellules exprimant la Cre.

Les modèles constitutifs

Les premiers tests réalisés sur la fonctionnalité du système CreLox ont été menés *in vitro*. En effet, des cellules tumorales mammaires de souris ont été transfectées avec deux vecteurs d'expression. Le premier contenait le gène de la Cre placé sous le contrôle du promoteur MT-1 (MetalloThionéin-1). Le deuxième contenait une version floxée du gène de résistance à la kanamycine (Figure 37). La présence de la molécule d'ADN recombinée, observée par southern-blot, a ainsi démontrée que le système CreLox est efficace sur des cellules murines (Sauer et Henderson, 1988).

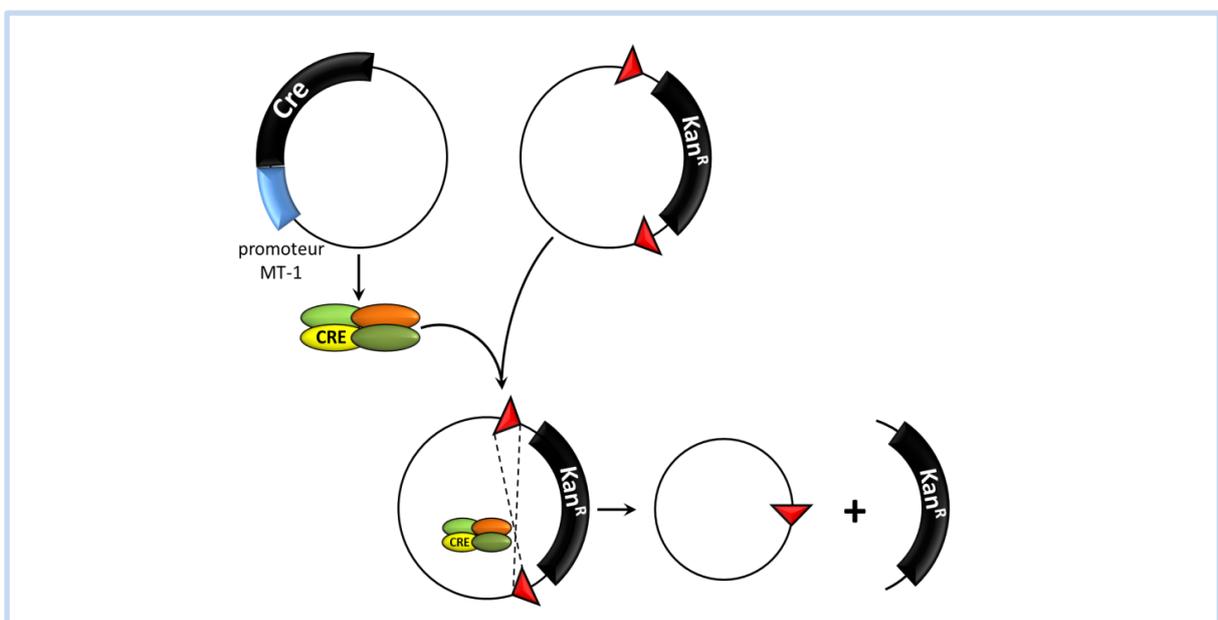


Figure 36 : Démonstration *in vitro* de la fonctionnalité du système CreLox
d'après Sauer et Henderson, 1988

Le système a donc été testé quelques années plus tard *in vivo*. Il a tout d'abord été créé un modèle transgénique visant à déterminer si la Cre était capable de réaliser efficacement des recombinaisons au niveau de l'ADN chromosomique chez la souris, et ce dans le but d'utiliser le système CreLox comme outil de transgénèse. Ainsi, les microinjections de plasmides vecteurs dans des œufs fécondés de souris ont conduit à l'établissement de deux lignées, par insertion aléatoire des transgènes. Une première lignée exprimant la Cre sous le contrôle du promoteur Lck (spécifique des thymocytes), et une seconde lignée exprimant le gène β -galactosidase d'E.Coli flanqué de deux séquences LoxP. Le croisement de ces deux lignées a permis d'obtenir des animaux doubles transgéniques, qui ont démontrés l'efficacité du système. D'une part, la recombinaison médiée par la Cre est tissu-spécifique et héréditaire, puisque les événements de recombinaison sont détectés (par southern-blot ou PCR) uniquement dans les thymocytes et les L_T spléniques dérivés de ces thymocytes. D'autre part, cette recombinaison est hautement efficace, puisque 90 à 95% des cellules cibles présentent des événements de recombinaison (Orban et al., 1992). Ces résultats démontrent donc que le système de recombinaison site-spécifique CreLox est efficace *in vivo*.

Le protocole de création d'une lignée murine KO pour un gène grâce à ce système a été publié en 1994 dans Science, par la même équipe. Les auteurs ont tout d'abord créé une lignée de souris exprimant une version floxée du gène pol β . Pour ce faire, ils ont transformé par recombinaison homologue des cellules ES murines, afin qu'elles expriment l'allèle floxé du gène pol β . Les cellules ayant subi avec succès la recombinaison homologue ont été sélectionnées grâce à une cassette de résistance à la néomycine, qui a par la suite été excisée par expression transitoire de la Cre. Ces cellules ont alors été utilisées afin de créer la lignée pol β floxée. Les souris obtenues ont par la suite été croisées avec des animaux exprimant la Cre sous le contrôle du promoteur Lck, comme décrit précédemment. La descendance issue de ce croisement qui exprime à la fois la Cre et la version floxée du gène, présente alors une délétion spécifique de pol β au niveau des thymocytes, comme l'atteste les southern-blot réalisés sur ces animaux. En effet, 40% des cellules CD4⁺ CD8⁺ sont délétées pour ce gène, ce qui est cohérent avec le profil d'expression du promoteur Lck (Gu et al., 1994). Ces travaux confirment donc définitivement qu'il est possible de créer un KO spécifique d'un gène, dans un type cellulaire précis, grâce au système CreLox.

Les modèles inductibles

Dans cette volonté de contrôler au plus près la modification du génome chez la souris, il a été rapidement étudié des stratégies visant à permettre une induction temporelle de la Cre par ajout de stimuli exogènes. Ces travaux, menés par l'équipe de Chambon et Metzger dans les années 90, reposent sur la création d'une protéine de fusion entre la Cre et un domaine régulateur, tel que le domaine de liaison au ligand (LBD, Ligand Binding Domain) des récepteurs stéroïdes, qui confère à la protéine une activité stimulus dépendante (Smith et Toft, 1993). En effet, en absence de ligand, la protéine de fusion est séquestrée dans le cytoplasme par la protéine chaperonne Hsp90 (Heat Shock Protein 90) via son LBD. La liaison du ligand à son récepteur libère la Cre de son complexe inhibiteur, qui s'exporte alors vers le noyau (Figure 38).

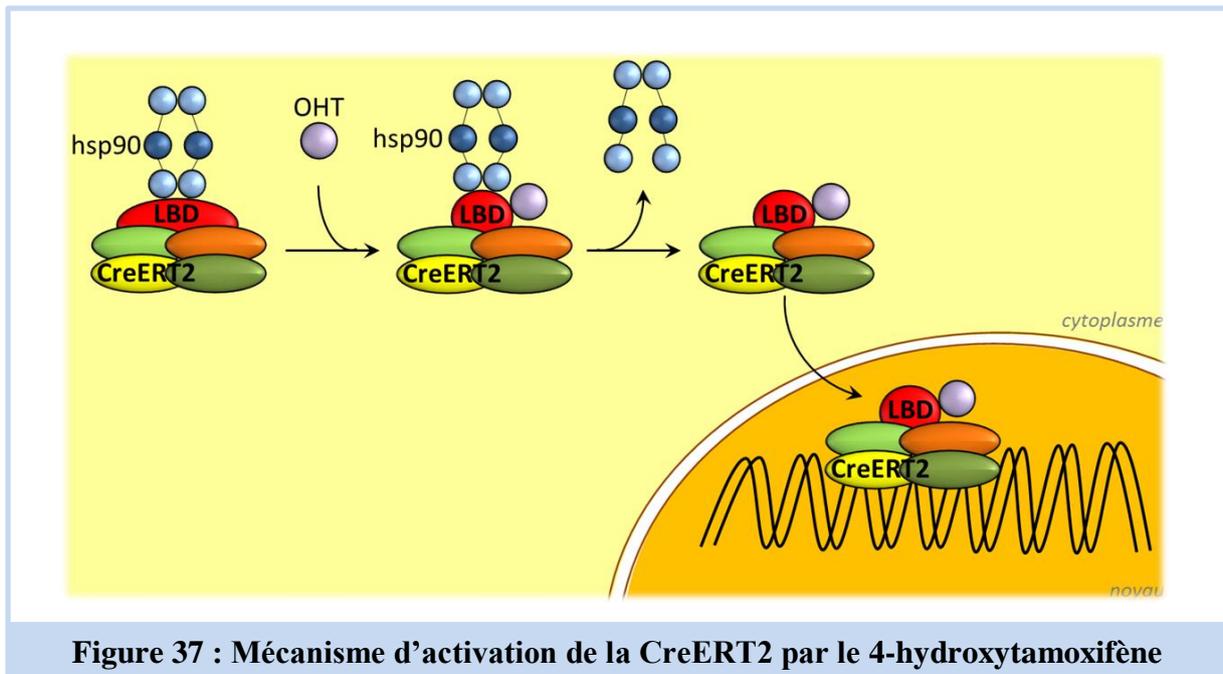


Figure 37 : Mécanisme d'activation de la CreERT2 par le 4-hydroxytamoxifène

La première protéine de fusion créée sur ce principe provenait de la fusion du gène codant la Cre avec une séquence codant le LBD du récepteur humain aux œstrogènes. Ce gène a été inséré dans un plasmide, puis électroporé dans des cellules murines de carcinome embryonnaire présentant une cassette de sélection floxée au niveau de l'exon 4 du gène RXR (Retinoïd X Receptor). L'analyse de la sensibilité de ces cellules au G418, ainsi que la présence de la cassette par southern-blot, révèlent que l'ajout de 0.1µM de 17β-estradiol dans le milieu de culture pendant 48h induit l'activité recombinase de la Cre (Metzger et al., 1995). L'activité de cette protéine chimérique est donc dépendante de la présence d'un stimulus extérieur, en l'occurrence le ligand du LBD. De manière intéressante, des résultats similaires

ont été obtenus par ajout 4-hydroxytamoxifène (OHT), qui est un antagoniste synthétique de l'estradiol capable de se lier au même récepteur.

Ce dernier point s'est avéré crucial pour l'utilisation de ce système inductible chez la souris, où la présence d'œstrogènes endogènes pouvait potentiellement entraver son efficacité. Ainsi, les mêmes auteurs ont mis au point l'année suivante une nouvelle protéine chimérique, fusion de la Cre et du LBD du récepteur humain aux œstrogènes présentant la mutation G521R. Cette mutation, basée sur les travaux réalisés sur le LBD murin, diminue par 1000 l'affinité du LBD pour le 17 β -estradiol, tout en conservant son affinité pour l'OHT (Danielian et al., 1993). La fonctionnalité de cette nouvelle recombinaise a alors été testée avec succès, tant sur des modèles *in vitro* que chez la souris (Feil et al., 1996).

Dans cette optique d'améliorer la sensibilité d'activation de la Cre, et donc de diminuer la dose de tamoxifène nécessaire et suffisante, cette même équipe a de nouveau créée, l'année suivante, une nouvelle protéine. Celle-ci, appelée CreERT2, présentait trois mutations décrites pour abolir l'activation du récepteur par le 17 β -estradiol tout en augmentant sa capacité de liaison à l'OHT : G400V/M543A/L540A. Et de la même dernière, l'efficacité de la CreERT2, qui possède une affinité 3-4 fois supérieure pour l'OHT que sa version précédente, a pu être démontré grâce à des modèles cellulaires (Feil et al., 1997), ainsi que chez la souris (Indra et al., 1999). Cette recombinaise apparaît donc comme un outil puissant de contrôle spatio-temporel de l'introduction de mutations somatiques chez la souris. En effet, la combinaison de cette protéine inductible avec un promoteur tissu-spécifique permet de contrôler à quel moment, et dans quels types cellulaires, une mutation donnée s'exprime.

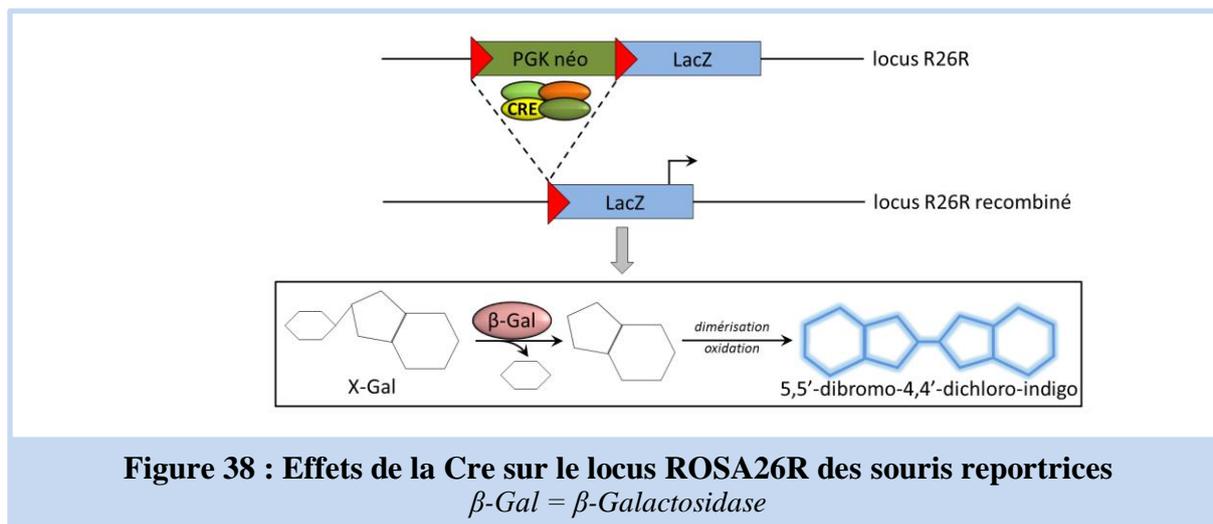
Il a depuis été créées de nombreuses lignées exprimant la Cre ou la CreERT2, sous le contrôle de multiples promoteurs, autorisant la transgénèse ciblée dans à peu près tous les types cellulaires. Le Tableau 6 présente de manière non exhaustive quelques-unes d'entre elles, parmi les plus utilisées dans les laboratoires. L'ensemble de ces lignées disponibles chez les différents fournisseurs internationaux sont recensées par l'IMSR (International Mouse Strain Resource). En octobre 2014, le site recensait plus de 300 lignées Cre tissu-spécifique disponibles, dont la liste exhaustive est disponible sur www.findmice.org.

LIGNEE	PROMOTEUR	TISSUS CIBLES	VERSION INDUCTIBLE DISPONIBLE
Cdh5-Cre	VE-Cadhérine	Endothélium	oui
Krt(1-5)-Cre	Kératine 1-5	Épiderme	oui
Fabp4-Cre	Adipocyte Protein 2	Tissu adipeux	oui
Vil-Cre	Villin	Epithélium intestinal	oui
Alb-Cre	Albumine	Foie	oui
Camk2a-Cre	Ca ²⁺ /calmoduline dependant protein kinase 2a	Système nerveux	oui
Myh6-Cre	Myosine 6	Cœur	oui
Nphs2-Cre	Podocyne	Rein	oui
Sftpc-Cre	Protéine C du surfactant	Poumon	oui
Lyz2-Cre	Lysozyme 2	Lignage myéloïde	non

Tableau 6 : Caractéristiques de quelques lignées Cre parmi les plus courantes

c) Les limites du système CreLox

Malgré la puissance et la flexibilité de ce système de recombinaison site-spécifique, ce dernier n'est pas dénué de limites, qui proviennent principalement de l'expression de la Cre. Ces limites doivent donc être connues et étudiées pour chacune des lignées transgéniques afin de garantir la valeur et la robustesse de cette approche de transgénèse ciblée. Comme nous l'avons précédemment évoqué, la caractérisation d'une lignée Cre nécessite son croisement avec une lignée reportrice, qui permet la visualisation directe des événements de recombinaison. L'une des lignées les plus utilisées dans ce contexte est la lignée (R26R-LacZ) (Soriano, 1999). Ces souris présentent au sein du locus Rosa26, connu pour médier une expression forte et ubiquitaire, une cassette de résistance à la néomycine floxée ainsi qu'une copie du gène LacZ. L'excision de cette cassette de résistance par la Cre rétablit alors la fonctionnalité du gène LacZ sous le contrôle du locus Rosa26, et donc l'expression de la β -Galactosidase. L'expression de cette enzyme reflète ainsi la présence d'évènements de recombinaison, et peut être testée par marquage au X-Gal sur tissus congelés. En effet, ce substrat de la β -Galactosidase présente une coloration bleue lorsqu'il est clivé par l'enzyme (Figure 39). Ce test est alors réalisé sur la descendance issue du croisement d'une souris Cre avec une souris reportrice, et ce à différents temps du développement embryonnaire et post-embryonnaire, ainsi que sur différents tissus chez l'adulte.



Les modèles constitutifs

Le premier biais inhérent aux lignées CreLox concerne la présence éventuelle d'une activité tissulaire de la Cre imprévue ou inexpliquée. C'est le cas par exemple des souris exprimant la recombinaison sous le contrôle des promoteurs Thy, Grik4, GFAP ou Cyp39a1, qui sont spécifiques de différentes structures du SNC (Heffner et al., 2012). Un tel phénomène peut trouver différentes explications. Tout d'abord, cette activité imprévue peut être le reflet d'une expression ectopique de la Cre, ou alors de l'expression du promoteur contrôlant son expression dans un type cellulaire qui n'était ni connu, ni anticipé. De même, beaucoup de lignées Cre expriment la protéine sous le contrôle de la partie proximale du promoteur d'un gène donné. L'absence de sites de régulation de ce gène (activateurs ou répresseurs) peut donc modifier son profil d'expression, et donc par extension celui de la Cre.

Un autre biais concerne la variation du profil d'activité de la Cre au sein d'une même portée. Cette différence peut être liée à deux paramètres. D'une part, un tel profil d'activité peut être le reflet d'une faible expression de la protéine, qui se traduit par une expression mosaïque dans les tissus cibles. D'autre part, l'expression de la recombinaison peut varier d'un profil tissu-spécifique à un profil ubiquitaire au sein d'une même portée. C'est le cas par exemple des animaux exprimant la Cre sous le contrôle des promoteurs Tie2 et Vav1, respectivement spécifique de l'endothélium/lignée hématopoïétique ou du primordium hépatique (Heffner et al., 2012).

Les modèles inductibles

Au-delà de ces limites, des paramètres supplémentaires sont à prendre en considération lors de l'utilisation de Cre inductibles, de par leur nature ainsi que l'utilisation d'un inducteur. Tout d'abord, il a été constaté dans certains cas *in vitro* et *in vivo* une activité

résiduelle de la Cre en absence de substances inductrices (Fuhrmann-Benzakein et al., 2000; Zhang et al., 1996; Brocard et al., 1997). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène, tels que la protéolyse du LBD ou un épissage alternatif de l'ARNm codant la protéine de fusion (Zhang et al., 1996). Dans un cas comme dans l'autre, la Cre devient alors active en absence d'OHT. Ce phénomène représente l'une des limites majeures de ce système, puisque la recombinaison des sites LoxP est irréversible. Ainsi, une activité résiduelle de la recombinase, même faible, peut conduire à une accumulation assez importante d'évènements de recombinaison au niveau du gène cible.

Un autre biais possible concerne la délétion incomplète du gène cible par la Cre. C'est le cas par exemple de souris coexprimant une Cre inducible spécifiquement dans la lignée lymphocytaire B et une version floxée du gène *polβ* (Schwenk et al., 1998). Une expression trop faible de la Cre peut potentiellement expliquer ce phénomène. En outre, le promoteur utilisé pour contrôler l'expression de la recombinase peut également participer à ce biais, par exemple si l'activité de ce dernier décroît ou disparaît à l'état adulte.

Au-delà de la protéine elle-même, l'utilisation de tamoxifène constitue également une source de biais non négligeable. Tout d'abord, comme nous l'avons explicité précédemment, le tamoxifène est un antagoniste compétitif du 17 β -estradiol, qui se fixe à son récepteur. De manière dépendante de la dose utilisée ou de la durée du traitement, le tamoxifène peut donc potentiellement interférer avec les voies de signalisation inhérentes au récepteur endogène. Cette interférence peut se révéler problématique, par exemple dans le cadre de travaux sur les glandes mammaires ou les organes reproducteurs. Le choix de la dose est donc un facteur crucial dans l'efficacité du système : une dose trop faible peut-être à l'origine d'un KO partiel, alors qu'une dose trop forte peut entraîner des effets indésirables. Il a par exemple été montré que celui-ci entraîne une accumulation de triacylglycérides dans le foie chez la souris, et ce à des doses 50 fois plus faibles que celles utilisées pour l'activation de la Cre inducible (Cole et al., 2010). De plus, le tamoxifène possède également des propriétés anti-fibrosantes connues depuis longtemps sur la fibrose péritonéale consécutive à une dialyse (Loureiro et al., 2013). De plus, des travaux semblent souligner son effet bénéfique sur la fibrose interstitielle rénale chez la souris, via la modulation de la voie TGF- β /Smad liée au récepteur aux œstrogènes (Kim et al., 2014). Ces données sont donc à prendre en considération selon les mécanismes ou les pathologies étudiées.

2) Souris Cre : intérêts du promoteur VE-Cadhérine pour cibler l'endothélium

Il existe à ce jour différentes souris Cre qui permettent de générer un KO conditionnel spécifiquement dans les cellules endothéliales. Il s'agit notamment des lignées Tie1-Cre, Tie2-Cre, et Flk1-Cre, dont les principales caractéristiques décrites grâce aux croisements avec des souris reportrices, sont détaillées dans le Tableau 7. Ces trois promoteurs appartiennent à des gènes codant des récepteurs tyrosine kinase spécifiques des cellules endothéliales, qui s'expriment très tôt au cours du développement embryonnaire. Ce point représente par ailleurs la principale limite à l'utilisation de ces souris pour le ciblage endothélium-spécifique. En effet, les cellules hématopoïétiques et endothéliales dérivent de précurseurs mésenchymateux communs, les hémangioblastes, qui se différencient en chacun des deux types cellulaires à partir du stade E8 (Risau, 1995). On comprend alors que l'activité de la Cre placée sous le contrôle de ces promoteurs ne soit pas restreinte aux seules cellules endothéliales, et soit détectable notamment dans la lignée hématopoïétique et certaines cellules mésenchymateuses cardiaques chez les animaux adultes (Gustafsson et al., 2001; Constien et al., 2001; Licht et al., 2004). De plus, les animaux Flk1-Cre créés par knock-in dans le gène FLK1, présentent également une activité de la Cre au niveau de certains types de cellules musculaires, tant chez l'embryon que chez l'adulte (Motoike et al., 2003). Cette expression ectopique peut s'expliquer par l'existence de progéniteurs mésenchymateux communs entre les cellules musculaires, endothéliales et hématopoïétiques, comme le suggèrent des études menées sur la différenciation des cellules ES (Yamashita et al., 2000). En outre, l'absence d'expression de la Cre dans le réseau vasculaire de certains organes est un autre paramètre important qui peut limiter l'utilisation de ces animaux transgéniques dans le cadre de délétion génique spécifique de l'endothélium. C'est le cas par exemple de la vascularisation pulmonaire chez les souris Flk1-Cre, qui présente une activité de la Cre minime (Licht et al., 2004). De même, le promoteur Tie1 conduit à une expression de la Cre dans 70 à 90% des cellules endothéliales dans la plupart des organes étudiés (Gustafsson et al., 2001).

LIGNEE	DEBUT DE L'EXPRESSION ENDOTHELIALE	EXPRESSION ENDOTHELIALE COMPLETE	EXPRESSION ENDOTHELIALE CHEZ L'ADULTE	EXPRESSION EXTRA-ENDOTHELIALE	REFERENCES
Tie1-Cre	stade E8	stade E10	70-90% : rein-foie-cerveau 90-95% : cœur-poumon	<u>stade E10</u> endocarde 12-20% des cellules du cerveau 12-20% des cellules sanguines	[Gustafsson, 2001]
Tie2-Cre	stade E8,5	stade E11,5	ND	<u>stade E11,5</u> endocarde certaines cellules mésenchymateuses certaines cellules circulantes	[Kinasuki, 2001]
	ND	ND	rein-cerveau-intestin- cœur-pancréas-foie- tissu adipeux-poumon	<u>Adulte</u> 80-90% des cellules hématopoïétiques	[Constien, 2001]
Flk1-Cre	ND	stade E8,5	ubiquitaire	<u>E8,5</u> cellules hématopoïétique <u>E10,5</u> cellules musculaires <u>Adulte</u> cellules hématopoïétiques cellules musculaires squelettiques cellules musculaires cardiaques	[Motoïke, 2003]
	stade E9,5	stade E11,5	cœur-rein-rate-cerveau- pancréas-vascularisation tumorale	<u>E11,5</u> cellules hématopoïétiques endocarde ventriculaire oreillette cardiaque	[Licht, 2004]
VE-Cad-Cre	stade E8,5	stade E14,5	cœur-poumon-cerveau- intestin	<u>E8,5-12,5</u> quelques cellules circulantes <u>Adulte</u> 50% des cellules hématopoïétiques	[Alva, 2006]

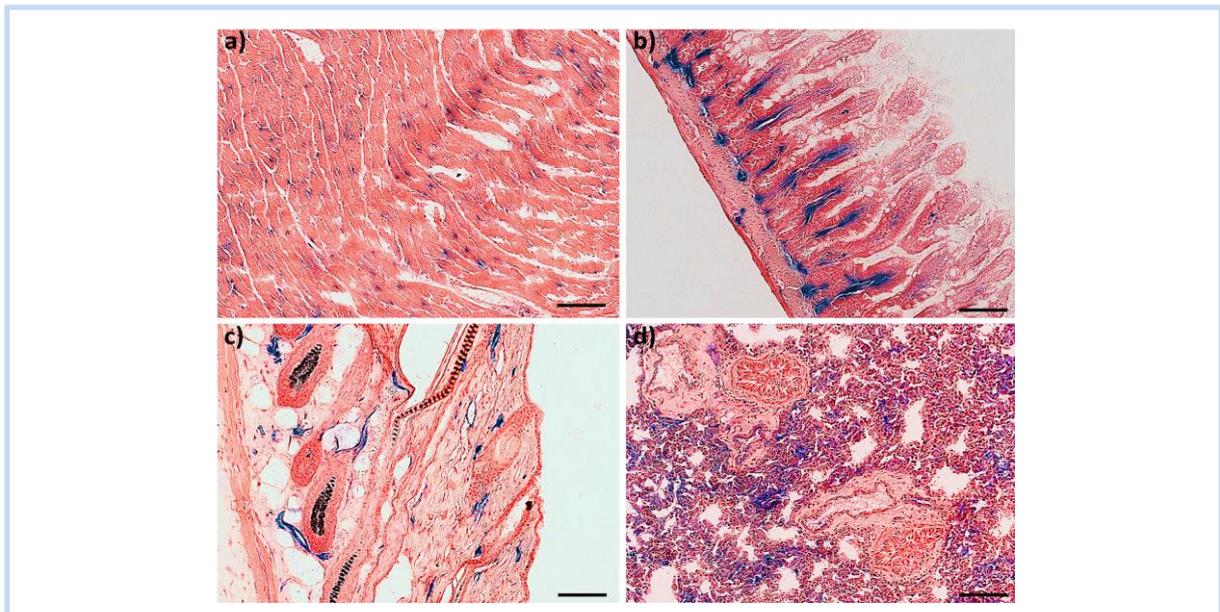
Tableau 7 : Caractéristiques des principales lignées Cre endothélium spécifiques

Ces résultats nous ont donc conduits, dans le cadre de ce projet de thèse, vers une autre lignée transgénique, la lignée VE-Cad-Cre. La VE-Cadhérine, également appelée CD144 ou cadhérine 5 (VE-Cad) est une protéine transmembranaire localisée au niveau des jonctions serrées des cellules endothéliales, qui joue un rôle dans leur adhésion homotypique, et dont les différents éléments du promoteur ont été clonés et caractérisés. Ainsi, placé sous le contrôle de la région (-2486 ; +24) du promoteur VE-Cad, le gène CAT s'exprime spécifiquement et uniformément dans les cellules endothéliales chez la souris, tant au stade embryonnaire qu'à l'âge adulte (Gory et al., 1999).

L'équipe de Maria-Luisa Iruela-Arispe a alors utilisé cette région de 2.5kb du promoteur pour contrôler une expression endothélium-spécifique de la Cre. En effet, l'injection dans des oocytes de souris d'un transgène composé de la région codante de la recombinaison fusionnée avec cette région régulatrice du promoteur VE-Cad a permis de générer la lignée VE-Cad-Cre (Alva et al., 2006). La spécificité spatio-temporelle du pattern

d'expression de la Cre au cours du développement a alors été vérifiée par le croisement de ces animaux avec des souris reportrices ROSA26R (Tableau 6).

Au stade embryonnaire tout d'abord, un marquage β -Gal réalisé sur des embryons entiers révèle l'expression de la Cre dès le stade E8.5, au niveau du primordium cardiaque et dans l'aorte dorsale. Le nombre de cellules β -Gal positives augmente alors progressivement au cours du développement, et un marquage uniforme de l'ensemble du réseau vasculaire est observé au stade E14.5. Ces résultats sont par ailleurs confirmés par l'analyse de cellules endothéliales embryonnaires triées par FACS puis testées pour l'activité de l'enzyme. Ainsi, 60% des cellules sont β -Gal positives au stade E10.5, 75% au stade E12.5 et 96.5% au stade E14.5. De plus, des analyses histologiques démontrent d'une part que le marquage β -Gal est bien spécifique des cellules endothéliales par un comarquage avec PECAM-1 (CD31), et d'autre part que la Cre semble posséder une activité similaire au niveau des artères, des veines, et des capillaires. En outre, ces analyses révèlent également l'expression de la Cre dans les cellules endothéliales lymphatiques à partir du stade E12.5. Chez les animaux adultes, l'expression de la Cre a été testée dans de nombreux organes, et révèle à chaque fois un marquage homogène et exclusif de l'ensemble du réseau vasculaire. Nous pouvons citer parmi les organes testés le cœur, les poumons, la peau et l'intestin grêle. La Figure 41 présente les résultats obtenus au sein du laboratoire.



**Figure 39 : Evènements de recombinaison
chez les souris VE-Cad-Cre adultes**

Résultats représentatifs du marquage β -Gal réalisé sur une cohorte de jeunes adultes (VE-Cad-Cre ; ROSA). a) cœur, b) intestin, c) peau, d) poumon. Echelle : 100 μ m (Rannou et al., résultats personnels)

Malgré la grande spécificité de cette lignée Cre en comparaison aux autres lignées endothélium spécifiques préalablement décrites, il est important de noter qu'une fraction de cellules hématopoïétiques se révèlent positives pour le marquage β -Gal. Ainsi, aux stades E8.5 et 12.5, certaines cellules circulantes sont β -Gal positives, et au stade E14.5 environ 50% des cellules situées dans les organes hématopoïétiques embryonnaires (foie, rate, thymus, moelle) expriment la Cre. De même, chez les animaux adultes, il subsiste quelques cellules hématopoïétiques β -Gal positives dans le thymus et la rate, et cette proportion monte à 50% dans la moelle. Cette unique expression extra-endothéliale de la recombinaison n'est cependant pas étonnante. D'une part, les tests réalisés chez l'embryon démontrent une activité de la Cre dès le stade E8.5, et il a été montré que la VE-Cadhérine est exprimée par des progéniteurs endothéliaux précoces, qui possèdent un potentiel hémangiogénique (Nishikawa et al., 1998). D'autre part, les études réalisées sur la différenciation de cellules ES exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur VE-Cadhérine, ou sur des souris exprimant la protéine fluorescente dans les mêmes conditions, révèlent une activation du promoteur dans les progéniteurs hématopoïétiques, ainsi que dans une certaine proportion de cellules hématopoïétiques chez l'adulte (Hisatsune et al., 2005).

Il ressort de ces travaux que la lignée VE-Cad-Cre, en comparaison aux autres lignées Cre endothélium spécifiques, dispose malgré tout d'intérêts supplémentaires pour médier un KO tissu-spécifique. En effet, celle-ci présente une expression uniforme de la recombinaison dans l'endothélium à la fois en développement (chez l'embryon) et quiescent (chez l'adulte), et ce dans l'ensemble des tissus étudiés. De plus, en dehors de l'activité du promoteur dans certaines sous-populations hématopoïétiques chez l'adulte, les animaux ne présentent aucune autre expression extra-endothéliale de la Cre. Il faut cependant prendre en compte cet unique biais dans l'interprétation des résultats obtenus avec ces souris.

Afin de palier à cette limite, cette même équipe a également développé une version tamoxifène inducible de cette lignée transgénique. En effet, ces souris présentent potentiellement deux avantages majeurs : une expression exclusive dans les cellules endothéliales, puisque le promoteur VE-Cadhérine s'exprime uniquement dans ce type cellulaire chez les animaux adultes, ainsi qu'un contrôle spatial et temporel de l'induction d'un KO endothélium-spécifique. Cette lignée VE-Cad-CreERT2 exprime donc la séquence codante de la CreERT2 développée par Chambon et Metzger (Feil et al., 1997) sous le contrôle de la portion du promoteur VE-Cad décrite précédemment (Alva et al., 2006). Le

transgène possède également un intron synthétique dérivé du gène β -globine de lapin, ainsi que le site de polyadénylation du cytomégalovirus (Monvoisin et al., 2006). Tout comme sa version constitutive, la lignée inductible a été obtenue par microinjections du transgène dans des œufs fécondés de souris, et les caractéristiques spatio-temporelles de l'expression de la Cre, ainsi que ses modalités d'activation, ont été investiguées grâce au croisement de ces animaux avec des souris reportrices ROSA26R (Tableau 6). De plus, la Figure 42 présente les résultats obtenus au sein du laboratoire, dans des conditions analogues. Il est intéressant de noter que contrairement à sa version constitutive, l'activité de la VE-Cad-CreERT2 est hautement spécifique au compartiment endothélial, puisque chez seulement 0.3% des cellules hématopoïétiques de la moelle se révèlent positives pour l'activité de la β -Galactosidase chez les animaux (VE-Cad-CreERT2 ; ROSA26R). Seul un protocole d'induction débutant avant le stade E11.5 peut entraîner l'apparition d'évènements de recombinaison dans la lignée hématopoïétique, ainsi que dans les cellules endothéliales lymphatiques. En outre, des tests de xénogreffes et d'allogreffes ont démontré que la Cre était également activée dans la néovascularisation tumorale, et ce avec une grande efficacité. Enfin, l'induction de la recombinaison peut s'effectuer dès le stade embryonnaire, par de multiples injections chez la femelle gestante, ainsi que chez les souriceaux nouveau-nés, par injection intragastrique (Tableau 6). En résumé, la lignée Ve-Cad-CreERT2 représente donc un outil puissant pour créer un KO inductible et endothélium spécifique chez la souris.

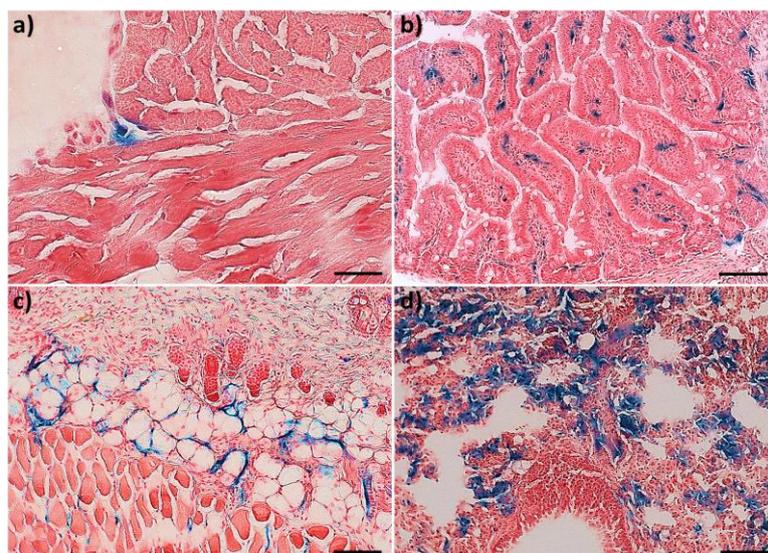


Figure 40 : Evènements de recombinaison induits par le 4OHT chez les souris VE-Cad-CreERT2 adultes

Résultats représentatifs du marquage β -Gal réalisé sur une cohorte de jeunes adultes (VE-Cad-CreERT2 ; ROSA) traités avec 2mg de 4OHT par jour pendant 5 jours consécutifs, et sacrifiés 2 semaines après la dernière injection. a) cœur, b) intestin, c) peau, d) poumon. Echelle : 100 μ m (Rannou et al., résultats personnels)

Il existe d'autres lignées exprimant une recombinaise tamoxifène-inductible qui permettent de cibler l'endothélium (Tableau 8) : la lignée Tie2-CreERT2 (Forde et al., 2002) la lignée Pdgfb-CreERT2 (Claxton et al., 2008), la lignée BMX-CreERT2 (Ehling et al., 2013) ainsi que la lignée TAL1-CreERT (Göthert et al., 2004). Cependant, la plupart de ces lignées transgéniques présentent des points faibles, qui ne sont pas retrouvés chez les animaux VE-Cad-CreERT2. Parmi eux, et de manière non exhaustive, des doses d'induction très importantes durant une période prolongée, une activité non-homogène de la recombinaise, puisque certains organes (dont l'intestin) présentent une pénétrance faible voire nulle, une activation ectopique tant chez les nouveau-nés que chez les individus adultes (kératinocytes, mégacaryocytes), ou une expression de la Cre cantonnée à l'endothélium du réseau vasculaire artériel, principalement dans les gros vaisseaux.

LIGNEES	MODALITES D'INDUCTION (ADULTE)	EXPRESSION ENDOTHELIALE EMBRYONNAIRE	EXPRESSION ENDOTHELIALE NEO-NATALE	EXPRESSION ENDOTHELIALE CHEZ L'ADULTE	EXPRESSION EXTRA-ENDOTHELIALE
Tie2-CreERT ²	<u>Alimentaire</u> 2,5mg.g ⁻¹ d'aliment 5 semaines	ND	ND	<u>Complète</u> cœur-pancréas <u>Forte</u> poumon-cerveau-rate <u>Bonne</u> rein-foie <u>Absente</u> Intestin	<u>Adulte</u> 0,2% des LB et LT
Pdgfb-CreERT ²	<u>Gavage</u> 3mg	ND	<u>Présente</u> muscles striés- peau-rein- pancréas- poumon-SNC- rétine <u>Absente</u> foie-aorte dorsale	<u>Bonne</u> muscles striés-cœur- peau-intestin- vascularisation tumorale <u>Faible</u> cerveau-foie-rétine	<u>Nouveau-né</u> kératinocytes <u>Adulte</u> mégacaryocytes
VE-Cad-CreERT ²	<u>Injection intrapéritonéale</u> 2mg.j ⁻¹ 5 jours	<u>Multiplés injections chez la femelle gestante entre E10,5 et E18,5</u> 95%	<u>Injection intragastrique (0,05mg)</u> 65-89%	<u>Présente</u> muscles squelettiques- cœur-langue-foie- pancréas-intestin-tissu adipeux-endomètre- vessie-poumon-peau- cerveau-testicules- prostate-ovaire- vascularisation tumorale <u>Moyenne</u> 71-92%	<u>Adulte</u> 0,3% des cellules hématopoïétiques de la moelle
TAL1-CreERT ²	<u>Injection intrapéritonéale</u> 2mg toutes les 48h 14 jours	<u>Injection chez la femelle gestante</u> 1 à 2mg Dès E9,5 Complete à E17,5	ND	<u>Présente</u> myocarde-poumon- muscles-rein-intestin- tissu adipeux-cerveau- vascularisation tumorale <u>Moyenne</u> 70-95%	<u>E14,5</u> 1% des cellules hématopoïétiques du foie primordial
BMX-CreERT ²	non précisé	<u>E18 (protocole non précisé)</u> <u>Endothélium artériel uniquement</u> peau-mésentère-muscle	<u>Injection intrapéritonéale</u> 200µg.j ⁻¹ De P10 à P13	<u>Présente</u> <u>Endothélium artériel uniquement</u> intestin-ovaire-utérus	ND

Tableau 8 : Caractéristiques des principales lignées CreERT2 spécifiques de l'endothélium

3) Des souris PAI-1^{flx/flx} aux souris PAI-1 KO^{endo} (VE-Cad-Cre ; PAI-1^{flx/flx})

a) **Création des souris PAI-1^{flx/flx}**

Afin de générer un modèle de KO conditionnel de PAI-1 spécifique du compartiment endothélial, il était nécessaire de créer des animaux exprimant une version floxée du gène SERPINE1. Ce projet fut mené au laboratoire dans le cadre d'un projet de recherche exploratoire financé par l'IRSN, et implique une collaboration de 2 ans avec la société genOway. La première étape de ce projet consista donc à **définir une stratégie d'insertion des sites LoxP dans le gène SERPINE1**. Des études réalisées *in silico* sur l'organisation du locus cible ont permis d'établir la stratégie suivante : insertion du premier site LoxP en 5' de l'exon 1, et insertion du deuxième site LoxP entre l'exon 2 et l'exon 3. De cette manière, les deux premiers exons du gène SERPINE1 se retrouvent encadrés par les séquences LoxP, et sont délétés après croisement avec une lignée de souris Cre. Le principal atout de cette stratégie réside dans l'élimination du codon initiateur, situé en 5' de l'exon 2, qui abolit l'expression du gène en minimisant au maximum les risques d'expression d'une protéine tronquée. Cependant, l'insertion du premier site LoxP au niveau du promoteur génère un risque de cibler une région régulatrice, et pourrait modifier l'expression du gène. Ce risque potentiel a donc été pris en compte, et minimisé grâce à une analyse bio-informatique détaillée du promoteur.

La deuxième étape du projet concerna **le clonage du gène SERPINE1 murin et la création du vecteur cible pour la recombinaison homologe dans les cellules ES**. Le clonage du gène a été réalisé à partir de l'ADN génomique issu de la lignée 129Sv, et inclu une séquence allant de la partie terminale du promoteur à l'exon 5. Cette séquence issue de la lignée 129Sv présente 99.6% d'homologie avec la lignée C57bl/6J, ce qui a été jugé acceptable. La molécule d'ADN clonée a alors servi à créer le vecteur cible (Figure 43), qui est un plasmide contenant : **1)** les deux séquences LoxP encadrant les exons 1 et 2. **2)** une cassette de résistance à la néomycine, située entre le premier site LoxP et l'exon 1, qui permettra la sélection positive des cellules ES qui auront intégré le transgène par RH. De plus, cette cassette de sélection est flanquée de deux séquences FRT, qui permettra son élimination grâce au croisement avec des souris exprimant l'enzyme Flp. **3)** une cassette de sensibilité à la toxine diphtérique A (DTA), située en 3' de l'exon 5, qui permettra une sélection négative des cellules ES qui auront intégré le transgène par insertion aléatoire.

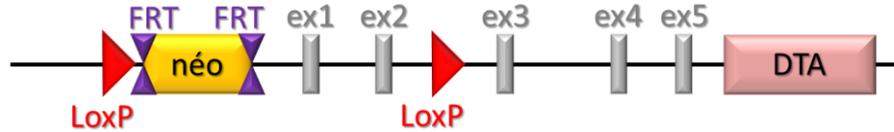


Figure 41 : Structure du transgène inséré dans le vecteur cible

La troisième étape du projet consista à **transformer et sélectionner les cellules ES avec le vecteur cible**. Celui-ci a donc été linéarisé par l'action de l'enzyme de restriction FseI, puis électroporé dans des cellules ES de la lignée 129Sv. Cette étape a permis l'isolation de 322 clones résistants au G418 et à la toxine diphtérique. La sélection des clones recombinants a alors été menée par une double approche PCR/Southern-blot (Figure 44), qui a permis de vérifier la recombinaison du transgène à son extrémité 5' (Figure 44 a) et b)) et 3' (Figure 44 c)). Cette sélection a ainsi permis d'isoler six clones positifs pour ces trois tests.

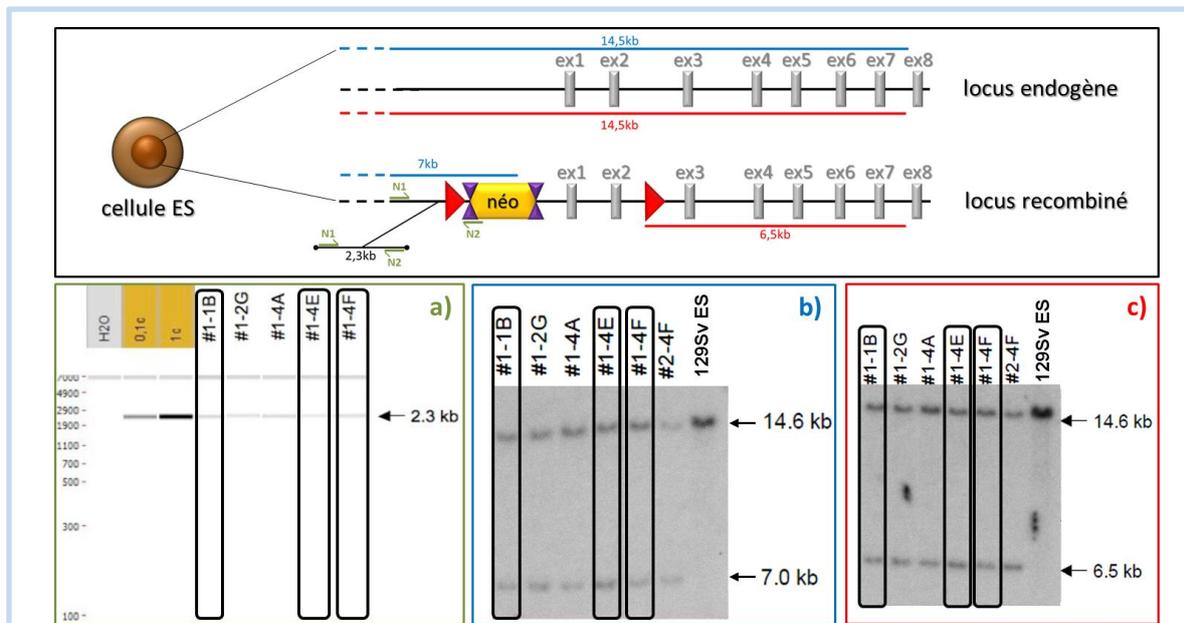


Figure 42 : Sélection des cellules ES recombinantes par une double approche PCR/Southern-blot. La localisation des différentes sondes et la taille des fragments correspondants amplifiés sont indiquées sur le panel du haut. a) PCR. 0,1c et 1c correspondent au nombre de copie du vecteur utilisé comme contrôle positif b) et c) Southern-blot. 129Sv ES correspond à l'ADN de cellules ES non transformées. #x correspond aux numéros des clones, et les clones encadrés représentent les clones sélectionnés pour l'étape suivante.

L'étape suivante consista à **générer des souris chimères qui expriment partiellement l'allèle recombiné du gène SERPINE1**. Pour se faire, 3 clones transformés (Figure 39) ont été injectés dans des blastocystes de souris C57bl/6J, et ces embryons ont été implantés dans trois femelles porteuses pseudo-gestantes (Figure 45). Treize souriceaux ont été obtenus, parmi lesquels trois présentaient un phénotype chimère noir/agouti. Parmi ces trois souris, deux d'entre elles, qui présentaient un chimérisme de 80%, ont été croisés avec

des souris C57bl/6J afin d'**obtenir des animaux hétérozygotes pour le locus recombiné de SERPINE1** (Figure 45). 28 souriceaux ont été obtenus à cette étape, dont quatre qui se sont révélés positifs pour la présence du transgène par l'approche PCR décrite Figure 44.

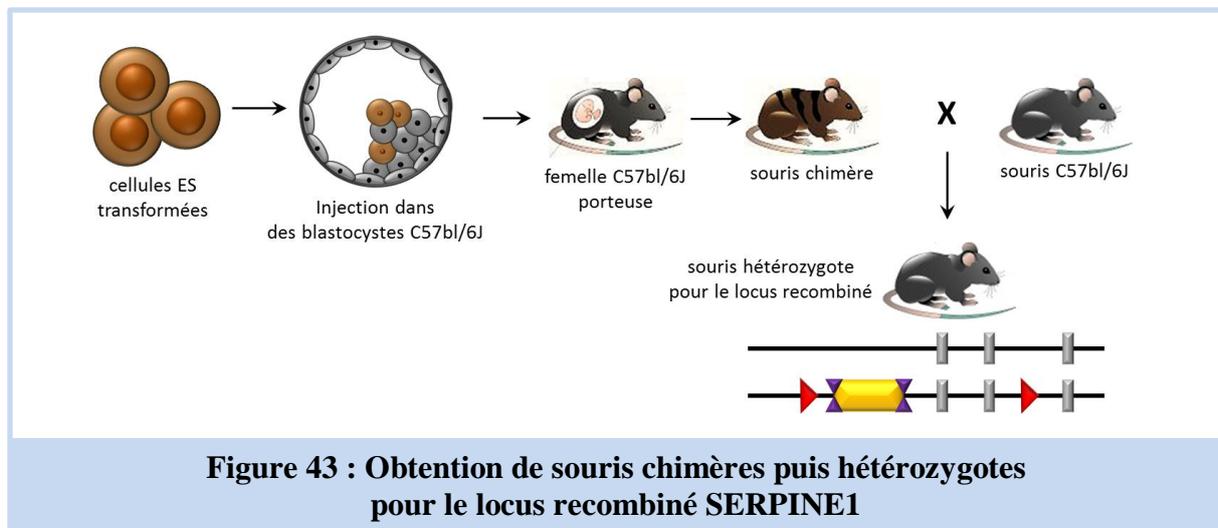


Figure 43 : Obtention de souris chimères puis hétérozygotes pour le locus recombiné SERPINE1

L'étape suivante impliqua l'**excision de la cassette de sélection à la néomycine afin d'obtenir des souris hétérozygotes pour le locus floxé de SERPINE1**. En effet, la cassette de sélection était flanquée de deux séquences FRT. Les quatre souris positives pour le locus recombiné ont donc été croisées avec des souris exprimant la Flp sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire. Deux animaux présentant une excision quasi-complète de la cassette ont été obtenus par ce croisement, comme l'attestent les résultats obtenus par PCR avec un nouveau couple d'amorce P1-P2 (Figure 46). Ces deux souris ont alors été croisées avec des individus C57bl/6J afin d'obtenir des animaux à la fois hétérozygote pour l'allèle floxé de SERPINE1 et présentant une excision complète de la cassette de résistance (Figure 46). A ce stade, les souris générées possèdent donc 75% de fond génétique C57bl/6J et 25% de fond génétique 129Sv.

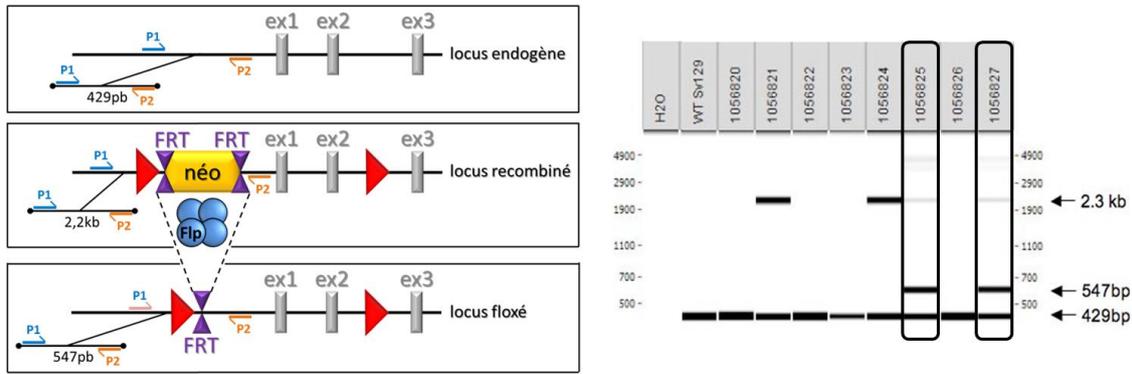


Figure 44 : Excision de la cassette néomycine *in vivo*

La localisation des différentes sondes de PCR et la taille des fragments amplifiés correspondant sont indiquées. Les souris dont le numéro est encadré ont été sélectionnées pour l'étape suivante.

Enfin, la dernière étape qui a permis d'obtenir des animaux homozygotes pour l'allèle floxé de SERPINE1, a impliqué le croisement des individus hétérozygotes entre eux (Figure 47). La sélection des animaux PAI-1^{flx/flx} dans la descendance est faite par PCR sur des biopsies de queues grâce aux amorces P1-P2 (Figure 47). Les animaux sélectionnés ont alors permis de fonder, au laboratoire, la lignée PAI-1^{flx/flx}.

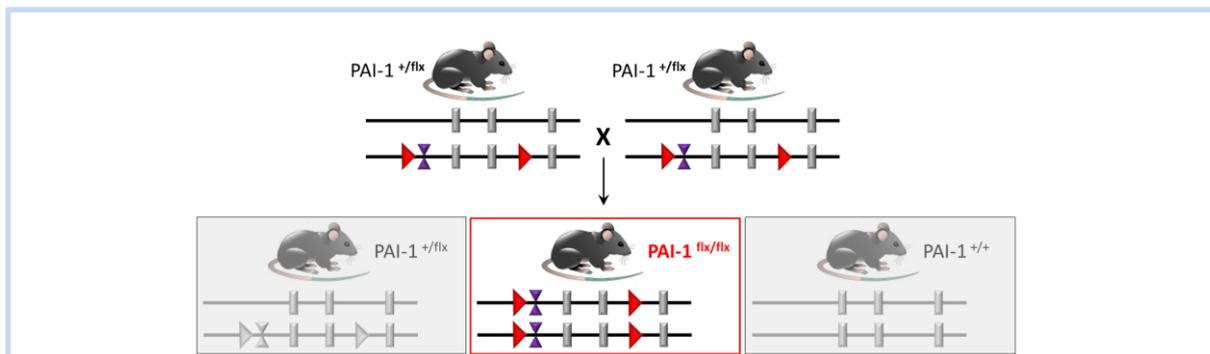


Figure 45 : Obtention des souris PAI-1^{flx/flx}

Le génotypage des animaux est réalisé par PCR, avec les amorces décrites Figure 41

b) Génération des souris PAI-1 KO^{endo} et PAI-1 KO^{endo(i)}

Les souris déficientes pour le gène SERPINE1 spécifiquement dans l'endothélium, qui ont été appelées PAI-1 KO^{endo}, sont issues du croisement des animaux PAI-1^{flx/flx} avec des animaux VE-Cad-Cre^(+/+). La stratégie de reproduction, qui compte trois générations, est détaillé Figure 48, et présente plusieurs avantages. D'une part, le transgène Cre est présent à l'état hétérozygote chez les souris PAI-1 KO^{endo}, ce qui est suffisant pour induire les évènements de recombinaison au niveau du gène SERPINE1, et limite le risque d'anomalies phénotypiques liées à l'insertion aléatoire du transgène. D'autre part, les animaux PAI-1

KO^{endo} et leur contrôle PAI-1^{flx/flx} qui sont obtenus en génération F3 proviennent de la même portée, et sont tous utilisables en expérimentation.

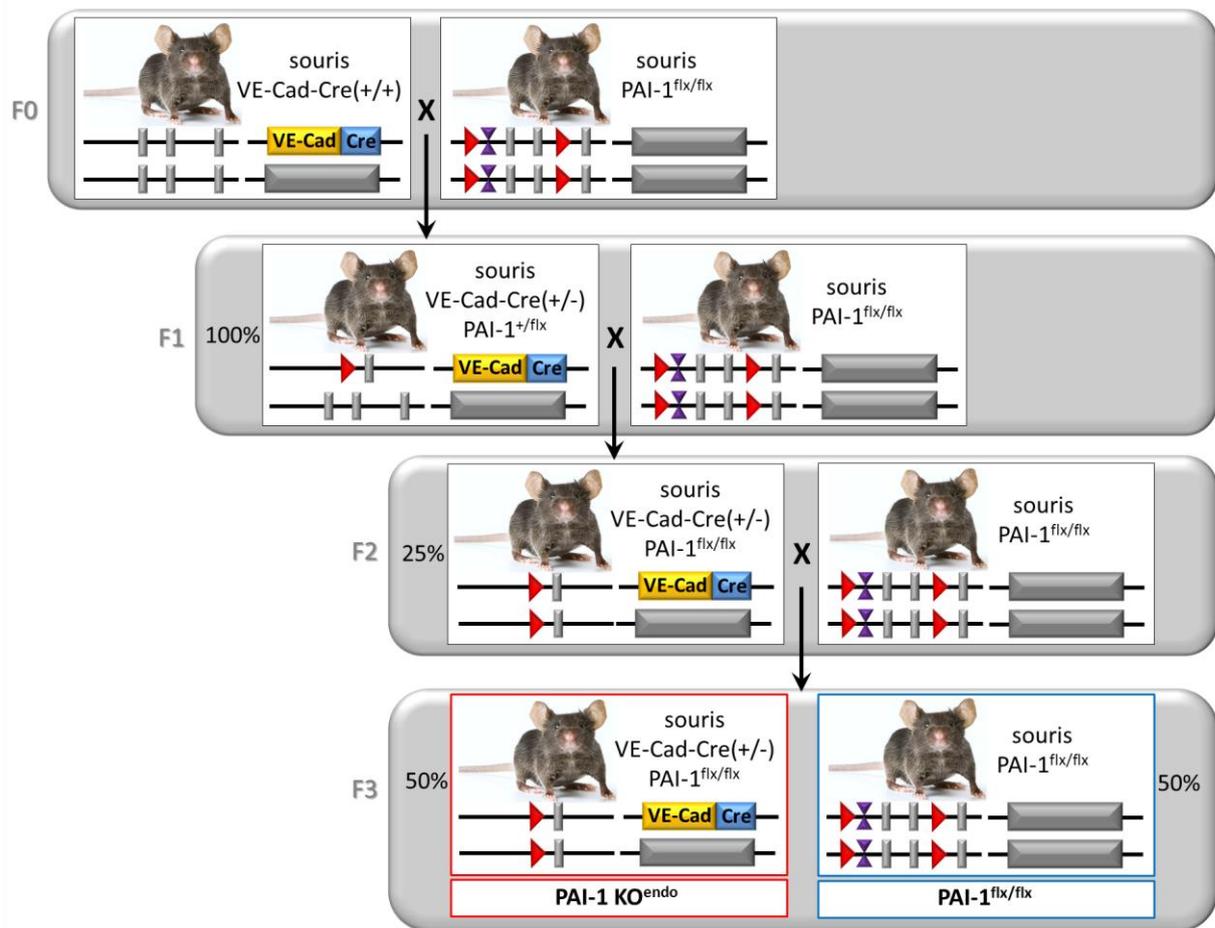


Figure 46 : Stratégie de croisement permettant l'obtention de souris PAI-1 KO^{endo}

F_x représente la génération, et x% représente la proportion de souris d'un génotype donné dans la descendance

La stratégie de croisement retenue pour l'obtention des souris PAI-1 KO^{endo(i)}, qui permettent une délétion endothélium-spécifique et tamoxifène inducible de SERPINE1, est rigoureusement identique. Elle nécessite cependant l'utilisation de souris VE-Cad-CreERT2 en génération F0, ainsi que l'injection intra-péritonéale de 4OHT pour activer la Cre et induire les événements de recombinaison (Figure 49).

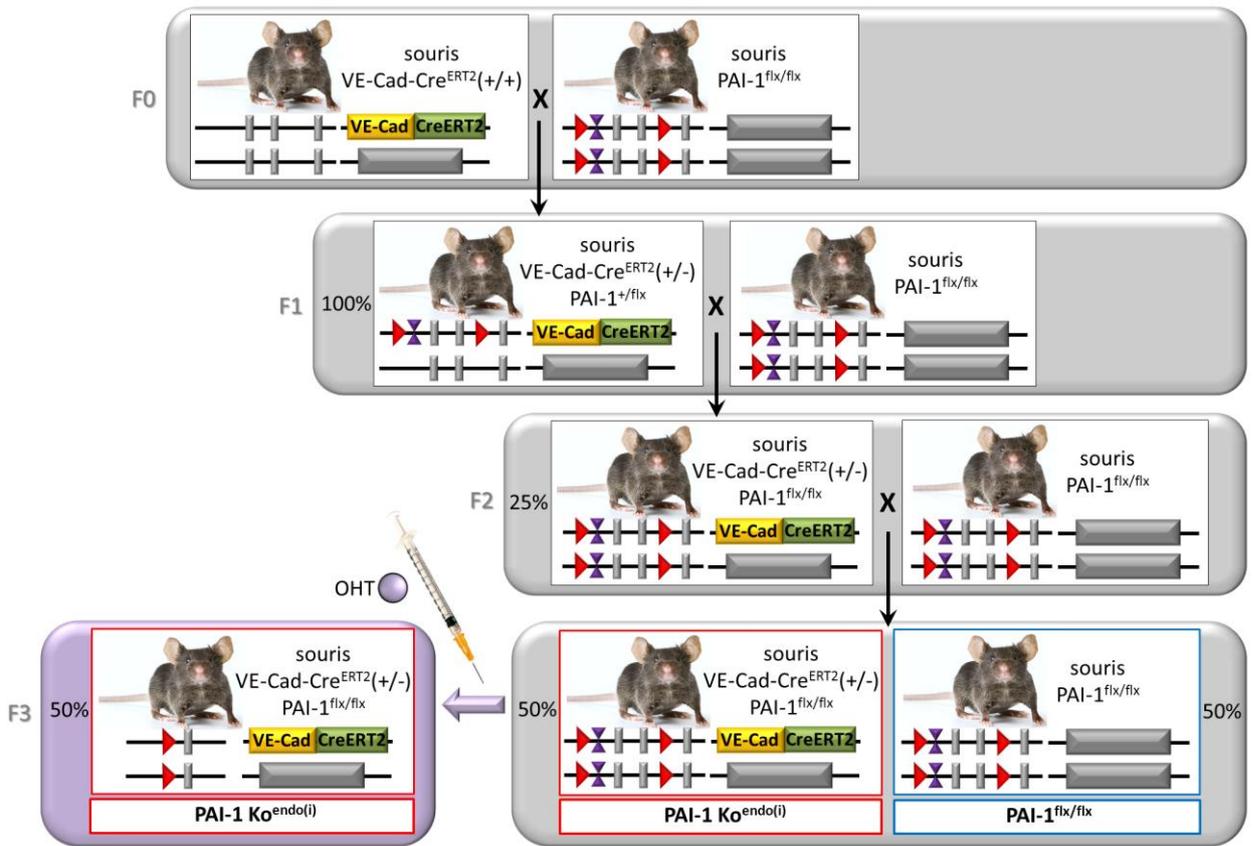


Figure 47 : Stratégie de croisement permettant l'obtention de souris PAI-1 KO^{endo(i)}

F_x représente la génération, et x% représente la proportion de souris d'un génotype donné dans la descendance

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abderrahmani R, François A, Buard V, Benderitter M, Sabourin J-C, L Crandall D, et Milliat F. 2009. « Effects of Pharmacological Inhibition and Genetic Deficiency of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Radiation-Induced Intestinal Injury ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 74 (3): 942-48.
- Abderrahmani R, François A, Buard V, Tarlet G, Blirando K, M Hneino M, Vaurijoux A, Benderitter M, Sabourin J-C, et Milliat F. 2012. « PAI-1-Dependent Endothelial Cell Death Determines Severity of Radiation-Induced Intestinal Injury ». *PloS One* 7 (4): e35740.
- Abremski K., R. Hoess, et N. Sternberg. 1983. « Studies on the Properties of P1 Site-Specific Recombination: Evidence for Topologically Unlinked Products Following Recombination ». *Cell* 32 (4): 1301-11.
- Akhmetshina A, Dees, C, Pileckyte M, Szucs G, M. Spriewald B, Zwerina J, Distler O, Schett G, et H. W. Distler J. 2008. « Rho-Associated Kinases Are Crucial for Myofibroblast Differentiation and Production of Extracellular Matrix in Scleroderma Fibroblasts ». *Arthritis and Rheumatism* 58 (8): 2553-64.
- Alessi M-C, et Juhan-Vague I. 2006. « PAI-1 and the Metabolic Syndrome: Links, Causes, and Consequences ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (10): 2200-2207.
- Alessi M. C., F. Peiretti, P. Morange, M. Henry, G. Nalbone, et I. Juhan-Vague. 1997. « Production of Plasminogen Activator Inhibitor 1 by Human Adipose Tissue: Possible Link between Visceral Fat Accumulation and Vascular Disease ». *Diabetes* 46 (5): 860-67.
- Al-Fakhri N, Chavakis T, Schmidt-Wöll T, Huang B, M. Cherian S, V. Bobryshev Y, S. A. Lord R, Katz N, et T. Preissner K. 2003. « Induction of Apoptosis in Vascular Cells by Plasminogen Activator Inhibitor-1 and High Molecular Weight Kininogen Correlates with Their Anti-Adhesive Properties ». *Biological Chemistry* 384 (3): 423-35.
- Allgayer, H., R. Babic, K. U. Gruetzner, A. Tarabichi, F. W. Schildberg, et M. M. Heiss. 2000. « C-erbB-2 Is of Independent Prognostic Relevance in Gastric Cancer and Is Associated with the Expression of Tumor-Associated Protease Systems ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 18 (11): 2201-9.
- Almeida C, Nagarajan D, Tian J, Walder Leal S, Wheeler K, Munley M, Blackstock W, et Zhao W. 2013. « The Role of Alveolar Epithelium in Radiation-Induced Lung Injury ». *PloS One* 8 (1): e53628.
- Almholt K, S. Nielsen B, L. Frandsen T, Brünner N, Danø K, et Johnsen M. 2003. « Metastasis of Transgenic Breast Cancer in Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene-Deficient Mice ». *Oncogene* 22 (28): 4389-97.
- Alva J A, Zovein A C, Monvoisin A, Murphy T, Salazar A, L Harvey N, Carmeliet P, et Iruela-Arispe M L. 2006. « VE-Cadherin-Cre-Recombinase Transgenic Mouse: A Tool for Lineage Analysis and Gene Deletion in Endothelial Cells ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 235 (3): 759-67.
- Amoaku, W. M., G. J. Mahon, T. A. Gardiner, L. Frew, et D. B. Archer. 1992. « Late Ultrastructural Changes in the Retina of the Rat Following Low-Dose X-Irradiation ». *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Für Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie* 230 (6): 569-74.
- Anand S, Yi Q, Gerstein H, Lonn E, Jacobs R, Vuksan V, Teo K, et al. 2003. « Relationship of Metabolic Syndrome and Fibrinolytic Dysfunction to Cardiovascular Disease ». *Circulation* 108 (4): 420-25.
- Andreyev H J N, Wotherspoon A, Denham J W, et Hauer-Jensen M. 2010. « Defining Pelvic-Radiation Disease for the Survivorship Era ». *The Lancet Oncology* 11 (4): 310-12.
- Andreyev, H J N. 2005. « Gastrointestinal Complications of Pelvic Radiotherapy: Are They of Any Importance? ». *Gut* 54 (8): 1051-54.

- Angenete E, Langenskiöld M, Palmgren I, Falk P, Oresland T, et Ivarsson M L. 2009. « uPA and PAI-1 in Rectal Cancer--Relationship to Radiotherapy and Clinical Outcome ». *The Journal of Surgical Research* 153 (1): 46-53.
- Angenete E, Oresland T, Falk P, Breimer M, Hultborn R, et Ivarsson M L. 2009. « Preoperative Radiotherapy and Extracellular Matrix Remodeling in Rectal Mucosa and Tumour Matrix Metalloproteinases and Plasminogen Components ». *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 48 (8): 1144-51.
- Aoki, Y., M. Ota, Y. Katsuura, K. Komoriya, et T. Nakagaki. 2000. « Effect of Activated Human Protein C on Disseminated Intravascular Coagulation Induced by Lipopolysaccharide in Rats ». *Arzneimittel-Forschung* 50 (9): 809-15.
- Artman T, Schilling D, Gnann J, Molls M, Multhoff G, et Bayer C. 2010. « Irradiation-Induced Regulation of Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 and Vascular Endothelial Growth Factor in Six Human Squamous Cell Carcinoma Lines of the Head and Neck ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 76 (2): 574-82.
- Baeten C I. M., Castermans K, Lammering G, Hillen F, Wouters B G B, Hillen H F P, et Griffioen A W. 2006. « Effects of Radiotherapy and Chemotherapy on Angiogenesis and Leukocyte Infiltration in Rectal Cancer ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 66 (4): 1219-27.
- Bajou K, Peng H, Laug W E, Maillard C, Noel A, Foidart J M, Martial J A, et DeClerck Y A. 2008. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 Protects Endothelial Cells from FasL-Mediated Apoptosis ». *Cancer Cell* 14 (4): 324-34..
- Bajou, K., V. Masson, R. D. Gerard, P. M. Schmitt, V. Albert, M. Praus, L. R. Lund, et al. 2001. « The Plasminogen Activator Inhibitor PAI-1 Controls in Vivo Tumor Vascularization by Interaction with Proteases, Not Vitronectin. Implications for Antiangiogenic Strategies ». *The Journal of Cell Biology* 152 (4): 777-84.
- Bajou, K., A. Noël, R. D. Gerard, V. Masson, N. Brunner, C. Holst-Hansen, M. Skobe, et al. 1998. « Absence of Host Plasminogen Activator Inhibitor 1 Prevents Cancer Invasion and Vascularization ». *Nature Medicine* 4 (8): 923-28.
- Balsara R D, Castellino F J, et Ploplis V A. 2006. « A Novel Function of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Modulation of the AKT Pathway in Wild-Type and Plasminogen Activator Inhibitor-1-Deficient Endothelial Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (32): 22527-36.
- Bang, P., et P. J. Fielder. 1997. « Human Pregnancy Serum Contains at Least Two Distinct Proteolytic Activities with the Ability to Degrade Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 ». *Endocrinology* 138 (9): 3912-17.
- Barcellos-Hoff, M. H., R. Derynck, M. L. Tsang, et J. A. Weatherbee. 1994. « Transforming Growth Factor-Beta Activation in Irradiated Murine Mammary Gland ». *The Journal of Clinical Investigation* 93 (2): 892-99.
- Barker N, van Es J H, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A. 2007. « Identification of Stem Cells in Small Intestine and Colon by Marker Gene Lgr5 ». *Nature* 449 (7165): 1003-7. doi:10.1038/nature06196.
- Bar-Shavit, R., A. Eldor, et I. Vlodyavsky. 1989. « Binding of Thrombin to Subendothelial Extracellular Matrix. Protection and Expression of Functional Properties ». *The Journal of Clinical Investigation* 84 (4): 1096-1104.
- Bar-Shavit, R., et G. D. Wilner. 1986. « Biologic Activities of Nonenzymatic Thrombin: Elucidation of a Macrophage Interactive Domain ». *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 12 (3): 244-49.
- Basu A, Menicucci G, Maestas J, Das A, et McGuire P. 2009. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Facilitates Retinal Angiogenesis in a Model of Oxygen-Induced Retinopathy ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50 (10): 4974-81.
- Bauman K A, Wettlaufer S H, Okunishi K, Vannella K M, Stoolman J S, Huang S K, Courey A J. 2010. « The Antifibrotic Effects of Plasminogen Activation Occur via Prostaglandin E2 Synthesis in Humans and Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 120 (6): 1950-60.

- Benchenane K, López-Atalaya J P, Fernández-Monreal M, Touzani O, et Vivien D. 2004. « Equivocal Roles of Tissue-Type Plasminogen Activator in Stroke-Induced Injury ». *Trends in Neurosciences* 27 (3): 155-60.
- Bentley P, Peck G, Smeeth L, Whittaker J, et Sharma P. 2010. « Causal Relationship of Susceptibility Genes to Ischemic Stroke: Comparison to Ischemic Heart Disease and Biochemical Determinants ». *PLoS One* 5 (2): e9136.
- Bentzen, S M, J Z Skoczylas, M Overgaard, et J Overgaard. 1996. « Radiotherapy-Related Lung Fibrosis Enhanced by Tamoxifen ». *Journal of the National Cancer Institute* 88 (13): 918-22.
- Bentzen S M. 2006. « Preventing or Reducing Late Side Effects of Radiation Therapy: Radiobiology Meets Molecular Pathology ». *Nature Reviews. Cancer* 6 (9): 702-13.
- Bhanja P, Saha S, Kabarriti R, Liu L, Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J, Sellers R S, Alfieri A A, et Guha C. 2009. « Protective Role of R-spondin1, an Intestinal Stem Cell Growth Factor, against Radiation-Induced Gastrointestinal Syndrome in Mice ». *PLoS One* 4 (11): e8014.
- Bionda C, Hadchity E, Alphonse G, Chapet O, Rousson R, Rodriguez-Lafrasse C, et Ardail D. 2007. « Radioresistance of Human Carcinoma Cells Is Correlated to a Defect in Raft Membrane Clustering ». *Free Radical Biology & Medicine* 43 (5): 681-94.
- Blake C M, Sullenger B A, Lawrence D A, et Fortenberry Y M. 2009. « Antimetastatic Potential of PAI-1-Specific RNA Aptamers ». *Oligonucleotides* 19 (2): 117-28.
- Blirando K, Hneino M, Martelly I, Benderitter M, Milliat F, et François A. 2012. « 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 ». *Radiation Research* 178 (6): 556-67.
- Blirando K, Milliat F, Martelly I, Sabourin J C, Benderitter M, et François A. 2011. « Mast Cells Are an Essential Component of Human Radiation Proctitis and Contribute to Experimental Colorectal Damage in Mice ». *The American Journal of Pathology* 178 (2): 640-51.
- Boe A E, Eren M, Murphy S B, Kamide C E, Ichimura A, Terry D, McAnally D, Smith L H, Miyata T, et Vaughan D E. 2013. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 Antagonist TM5441 Attenuates N ω -Nitro-L-Arginine Methyl Ester-Induced Hypertension and Vascular Senescence ». *Circulation* 128 (21): 2318-24.
- Boehme, M. W., Y. Deng, U. Raeth, A. Bierhaus, R. Ziegler, W. Stremmel, et P. P. Nawroth. 1996. « Release of Thrombomodulin from Endothelial Cells by Concerted Action of TNF-Alpha and Neutrophils: In Vivo and in Vitro Studies ». *Immunology* 87 (1): 134-40.
- Boerma M, Kruse J J C M, van Loenen M, Klein H R, Bart C I, Zurcher C, et Wondergem J. 2004. « Increased Deposition of von Willebrand Factor in the Rat Heart after Local Ionizing Irradiation ». *Strahlentherapie Und Onkologie: Organ Der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et Al]* 180 (2): 109-16.
- Boerma M, Wang J, Richter K K, et Hauer-Jensen M. 2006. « Orazipone, a Locally Acting Immunomodulator, Ameliorates Intestinal Radiation Injury: A Preclinical Study in a Novel Rat Model ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 66 (2): 552-59.
- Boerma M, Wang J, Sridharan V, Herbert J M, et Hauer-Jensen M. 2013. « Pharmacological Induction of Transforming Growth Factor-beta1 in Rat Models Enhances Radiation Injury in the Intestine and the Heart ». *PLoS One* 8 (7): e70479.
- Bogatkevich, G. S., E. Tourkina, R. M. Silver, et A. Ludwicka-Bradley. 2001. « Thrombin Differentiates Normal Lung Fibroblasts to a Myofibroblast Phenotype via the Proteolytically Activated Receptor-1 and a Protein Kinase C-Dependent Pathway ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (48): 45184-92.
- Bonnaud S, Niaudet C, Legoux F, Corre I, Delpon G, Saulquin X, Fuks Z, Gaugler M H, Kolesnick R, et Paris F. 2010. « Sphingosine-1-Phosphate Activates the AKT Pathway to Protect Small Intestines from Radiation-Induced Endothelial Apoptosis ». *Cancer Research* 70 (23): 9905-15.

- Bourgier, C., V. Haydont, F. Milliat, A. François, V. Holler, P. Lasser, J. Bourhis, D. Mathé, et M.-C. Vozenin-Brotons. 2005. « Inhibition of Rho Kinase Modulates Radiation Induced Fibrogenic Phenotype in Intestinal Smooth Muscle Cells through Alteration of the Cytoskeleton and Connective Tissue Growth Factor Expression ». *Gut* 54 (3): 336-43.
- Bourne, R. G., J. H. Kearsley, W. D. Grove, et S. J. Roberts. 1983. « The Relationship between Early and Late Gastrointestinal Complications of Radiation Therapy for Carcinoma of the Cervix ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 9 (10): 1445-50.
- Brandal S, Blake C M, Sullenger B A, et Fortenberry Y M. 2011. « Effects of Plasminogen Activator Inhibitor-1-Specific RNA Aptamers on Cell Adhesion, Motility, and Tube Formation ». *Nucleic Acid Therapeutics* 21 (6): 373-81.
- Brandtzaeg, P., G. B. Joø, B. Brusletto, et P. Kierulf. 1990. « Plasminogen Activator Inhibitor 1 and 2, Alpha-2-Antiplasmin, Plasminogen, and Endotoxin Levels in Systemic Meningococcal Disease ». *Thrombosis Research* 57 (2): 271-78.
- Brocard, J., X. Warot, O. Wendling, N. Messaddeq, J. L. Vonesch, P. Chambon, et D. Metzger. 1997. « Spatio-Temporally Controlled Site-Specific Somatic Mutagenesis in the Mouse ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (26): 14559-63.
- Bueno, M. R., A. Daneri, et J. Armendáriz-Borunda. 2000. « Cholestasis-Induced Fibrosis Is Reduced by Interferon Alpha-2a and Is Associated with Elevated Liver Metalloprotease Activity ». *Journal of Hepatology* 33 (6): 915-25.
- Buisson, A., O. Nicole, F. Docagne, H. Sartelet, E. T. Mackenzie, et D. Vivien. 1998. « Up-Regulation of a Serine Protease Inhibitor in Astrocytes Mediates the Neuroprotective Activity of Transforming Growth Factor beta1 ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12 (15): 1683-91.
- Burdelya L G, Krivokrysenko V I, Tallant T C, Strom E, Gleiberman A S, Gupta D, Kurnasov O V. 2008. « An Agonist of Toll-like Receptor 5 Has Radioprotective Activity in Mouse and Primate Models ». *Science (New York, N.Y.)* 320 (5873): 226-30.
- Campisi J, et d' Adda di Fagagna F. 2007. « Cellular Senescence: When Bad Things Happen to Good Cells ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (9): 729-40.
- Cao C, Lawrence D A, Li Y, Von Arnim C A F, Herz J, Su E J, Makarova A, Hyman B T, Strickland D K, et Zhang L. 2006. « Endocytic Receptor LRP Together with tPA and PAI-1 Coordinates Mac-1-Dependent Macrophage Migration ». *The EMBO Journal* 25 (9): 1860-70.
- Carmeliet, P., J. M. Stassen, L. Schoonjans, B. Ream, J. J. van den Oord, M. De Mol, R. C. Mulligan, et D. Collen. 1993. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene-Deficient Mice. II. Effects on Hemostasis, Thrombosis, and Thrombolysis ». *The Journal of Clinical Investigation* 92 (6): 2756-60.
- Chadderton N, Cowen R L, Sheppard F C D, Robinson S, Greco O, Scott S D, Stratford I J, Patterson A I, et Williams K J. 2005. « Dual Responsive Promoters to Target Therapeutic Gene Expression to Radiation-Resistant Hypoxic Tumor Cells ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 62 (1): 213-22.
- Chang C, Lerman O Z, Thanik V D, Scharf C L, Greives M R, Schneider R J, Formenti S C, Saadeh P B, Warren S M, et Levine J P. 2009. « Dose-Dependent Effect of Radiation on Angiogenic and Angiostatic CXC Chemokine Expression in Human Endothelial Cells ». *Cytokine* 48 (3): 295-302.
- Ch'ang H-J, Maj J G, Paris F, Xing H R, Zhang J, Truman J P, Cardon-Cardo C, Haimovitz-Friedman A, Kolesnick R, et Fuks Z. 2005. « ATM Regulates Target Switching to Escalating Doses of Radiation in the Intestines ». *Nature Medicine* 11 (5): 484-90.
- Chaudhary N I, Schnapp A, et Park J E. 2006. « Pharmacologic Differentiation of Inflammation and Fibrosis in the Rat Bleomycin Model ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 173 (7): 769-76.
- Cheng, H., et C. P. Leblond. 1974. « Origin, Differentiation and Renewal of the Four Main Epithelial Cell Types in the Mouse Small Intestine. V. Unitarian Theory of the Origin of the Four Epithelial Cell Types ». *The American Journal of Anatomy* 141 (4): 537-61.

- Chen Y, Kelm R J, Budd R C, Sobel B E, et Schneider D J. 2004. « Inhibition of Apoptosis and Caspase-3 in Vascular Smooth Muscle Cells by Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 ». *Journal of Cellular Biochemistry* 92 (1): 178-88.
- Cho C-H, Kammerer R A, Lee H J, Yasunaga K, Kim K-T, Choi H-H, Kim W. 2004. « Designed Angiopoietin-1 Variant, COMP-Ang1, Protects against Radiation-Induced Endothelial Cell Apoptosis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (15): 5553-58.
- Cho E, Lee K J, Seo J-W, Byun C J, Chung S-J, Suh D C, Carmeliet P, Koh J-Y, Kim J S, et Lee J-Y. 2012. « Neuroprotection by Urokinase Plasminogen Activator in the Hippocampus ». *Neurobiology of Disease* 46 (1): 215-24.
- Cho S, Kang J, Lyttle C, Harris K, Daley B, Grammer L, Avila P, Kumar R, et Schleimer R. 2011. « Association of Elevated Plasminogen Activator Inhibitor 1 Levels with Diminished Lung Function in Patients with Asthma ». *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 106 (5): 371-77.
- Citrin D E, Shankavaram U, Horton J A, Shield W, Zhao S, Asano H, White A, Sowers A, Thetford A, et Chung E J. 2013. « Role of Type II Pneumocyte Senescence in Radiation-Induced Lung Fibrosis ». *Journal of the National Cancer Institute* 105 (19): 1474-84.
- Classen A, Lloberas J, et Celada A. 2009. « Macrophage Activation: Classical versus Alternative ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 531: 29-43.
- Claxton S, Kostourou V, Jadeja S, Chambon P, Hodivala-Dilke K, et Fruttiger M. 2008. « Efficient, Inducible Cre-Recombinase Activation in Vascular Endothelium ». *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 46 (2): 74-80.
- Clouthier, D. E., S. A. Comerford, et R. E. Hammer. 1997. « Hepatic Fibrosis, Glomerulosclerosis, and a Lipodystrophy-like Syndrome in PEPCK-TGF-beta1 Transgenic Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 100 (11): 2697-2713.
- Cole H A, Ohba T, Nyman J S, Hirota H, Cates J M M, Flick M J, Degen J L, et Schoenecker J G. 2014. « Fibrin Accumulation Secondary to Loss of Plasmin-Mediated Fibrinolysis Drives Inflammatory Osteoporosis in Mice ». *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66 (8): 2222-33.
- Cole L K, Jacobs R L, et Vance D E. 2010. « Tamoxifen Induces Triacylglycerol Accumulation in the Mouse Liver by Activation of Fatty Acid Synthesis ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 52 (4): 1258-65.
- Collet, J. P., G. Montalescot, E. Vicaut, A. Ankri, F. Walylo, C. Lesty, R. Choussat, et al. 2003. « Acute Release of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Predicts Mortality ». *Circulation* 108 (4): 391-94.
- Collins-Underwood J R, Zhao W, Sharpe J G, et Robbins M E. 2008. « NADPH Oxidase Mediates Radiation-Induced Oxidative Stress in Rat Brain Microvascular Endothelial Cells ». *Free Radical Biology & Medicine* 45 (6): 929-38.
- Comi, P., R. Chiamonte, et J. A. Maier. 1995. « Senescence-Dependent Regulation of Type 1 Plasminogen Activator Inhibitor in Human Vascular Endothelial Cells ». *Experimental Cell Research* 219 (1): 304-8.
- Connolly B M., Choi E Y, Gårdsvoll H, Bey A L, Currie B M, Chavakis T, Liu S. 2010. « Selective Abrogation of the uPA-uPAR Interaction in Vivo Reveals a Novel Role in Suppression of Fibrin-Associated Inflammation ». *Blood* 116 (9): 1593-1603.
- Constien, R., A. Forde, B. Liliensiek, H. J. Gröne, P. Nawroth, G. Hämmerling, et B. Arnold. 2001. « Characterization of a Novel EGFP Reporter Mouse to Monitor Cre Recombination as Demonstrated by a Tie2 Cre Mouse Line ». *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 30 (1): 36-44.
- Conway E M, Van de Wouwer M, Pollefeyt S, Van Aken K J H, De Vriese A, Weitz J I. 2002. « The Lectin-like Domain of Thrombomodulin Confers Protection from Neutrophil-Mediated Tissue Damage by Suppressing Adhesion Molecule Expression via Nuclear Factor kappaB and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways ». *The Journal of Experimental Medicine* 196 (5): 565-77.

- Cook A D, Braine E L, Campbell I K, et Hamilton J A. 2002. « Differing Roles for Urokinase and Tissue-Type Plasminogen Activator in Collagen-Induced Arthritis ». *The American Journal of Pathology* 160 (3): 917-26.
- Coppé J-P, Desprez P-Y, Krtolica A, et Campisi J. 2010. « The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression ». *Annual Review of Pathology* 5: 99-118.
- Corre I, Guillonneau M, et Paris F. 2013. « Membrane Signaling Induced by High Doses of Ionizing Radiation in the Endothelial Compartment. Relevance in Radiation Toxicity ». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (11): 22678-96.
- Courey A J, Horowitz J C, Kim K K, Koh T J, Novak M L, Subbotina N, Warnock M. 2011. « The Vitronectin-Binding Function of PAI-1 Exacerbates Lung Fibrosis in Mice ». *Blood* 118 (8): 2313-21
- Cullen J P, Nicholl S M, Sayeed S, Sitzmann J V, Okada S, Cahill P A, et Redmond E M. 2004. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 Deficiency Enhances Flow-Induced Smooth Muscle Cell Migration ». *Thrombosis Research* 114 (1): 57-65.
- Cushman, M., J. P. Costantino, R. P. Tracy, K. Song, L. Buckley, J. D. Roberts, et D. N. Krag. 2001. « Tamoxifen and Cardiac Risk Factors in Healthy Women: Suggestion of an Anti-Inflammatory Effect ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21 (2): 255-61.
- Czekay R-P, K Aertgeerts, S A. Curriden, et D J. Loskutoff. 2003. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 Detaches Cells from Extracellular Matrices by Inactivating Integrins ». *The Journal of Cell Biology* 160 (5): 781-91.
- Dabbagh, K., G. J. Laurent, R. J. McAnulty, et R. C. Chambers. 1998. « Thrombin Stimulates Smooth Muscle Cell Procollagen Synthesis and mRNA Levels via a PAR-1 Mediated Mechanism ». *Thrombosis and Haemostasis* 79 (2): 405-9.
- Danielian, P. S., R. White, S. A. Hoare, S. E. Fawell, et M. G. Parker. 1993. « Identification of Residues in the Estrogen Receptor That Confer Differential Sensitivity to Estrogen and Hydroxytamoxifen ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 7 (2): 232-40.
- Danø, K., P. A. Andreasen, J. Grøndahl-Hansen, P. Kristensen, L. S. Nielsen, et L. Skriver. 1985. « Plasminogen Activators, Tissue Degradation, and Cancer ». *Advances in Cancer Research* 44: 139-266.
- Dawson, S. J., B. Wiman, A. Hamsten, F. Green, S. Humphries, et A. M. Henney. 1993. « The Two Allele Sequences of a Common Polymorphism in the Promoter of the Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Gene Respond Differently to Interleukin-1 in HepG2 Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 268 (15): 10739-45.
- Debrock, S., et P. J. Declerck. 1997. « Neutralization of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Inhibitory Properties: Identification of Two Different Mechanisms ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1337 (2): 257-66.
- De Giorgio-Miller A, S Bottoms, G Laurent, P Carmeliet, et S Herrick. 2005. « Fibrin-Induced Skin Fibrosis in Mice Deficient in Tissue Plasminogen Activator ». *The American Journal of Pathology* 167 (3): 721-32.
- Degryse B., J G. Neels, R-P Czekay, K. Aertgeerts, Y-I Kamikubo, et D J. Loskutoff. 2004. « The Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Is a Motogenic Receptor for Plasminogen Activator Inhibitor-1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (21): 22595-604.
- Deng, G., S. A. Curriden, G. Hu, R. P. Czekay, et D. J. Loskutoff. 2001. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 Regulates Cell Adhesion by Binding to the Somatomedin B Domain of Vitronectin ». *Journal of Cellular Physiology* 189 (1): 23-33.
- Denham, J. W., M. Hauer-Jensen, et L. J. Peters. 2001. « Is It Time for a New Formalism to Categorize Normal Tissue Radiation Injury? ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 50 (5): 1105-6.
- Dennler, S., S. Itoh, D. Vivien, P. ten Dijke, S. Huet, et J. M. Gauthier. 1998. « Direct Binding of Smad3 and Smad4 to Critical TGF Beta-Inducible Elements in the Promoter of Human Plasminogen Activator Inhibitor-Type 1 Gene ». *The EMBO Journal* 17 (11): 3091-3100.
- Deryugina, E. I., et J. P. Quigley. 2012. « Cell Surface Remodeling by Plasmin: A New Function for an Old Enzyme ». *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2012: 564259.

- Devy, L., S. Blacher, C. Grignet-Debrus, K. Bajou, V. Masson, R. D. Gerard, A. Gils, et al. 2002. « The pro- or Antiangiogenic Effect of Plasminogen Activator Inhibitor 1 Is Dose Dependent ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (2): 147-54.
- Diebold, R. J., M. J. Eis, M. Yin, I. Ormsby, G. P. Boivin, B. J. Darrow, J. E. Saffitz, et T. Doetschman. 1995. « Early-Onset Multifocal Inflammation in the Transforming Growth Factor Beta 1-Null Mouse Is Lymphocyte Mediated ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (26): 12215-19.
- Diéval, J., G. Nguyen, S. Gross, J. Delobel, et E. K. Kruthof. 1991. « A Lifelong Bleeding Disorder Associated with a Deficiency of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 ». *Blood* 77 (3): 528-32.
- Di X., A. T. Bright, R. Bellott, E. Gaskins, J. Robert, S. Holt, D. Gewirtz, et L. Elmore. 2008. « A Chemotherapy-Associated Senescence Bystander Effect in Breast Cancer Cells ». *Cancer Biology & Therapy* 7 (6): 864-72.
- Docagne, F., O. Nicole, H. H. Marti, E. T. MacKenzie, A. Buisson, et D. Vivien. 1999. « Transforming Growth Factor-beta1 as a Regulator of the Serpins/t-PA Axis in Cerebral Ischemia ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13 (11): 1315-24.
- Dohgu S., F. Takata, J. Matsumoto, M. Oda, E. Harada, T. Watanabe, T. Nishioku, H. Shuto, A. Yamauchi, et Y. Kataoka. 2011. « Autocrine and Paracrine up-Regulation of Blood-Brain Barrier Function by Plasminogen Activator Inhibitor-1 ». *Microvascular Research* 81 (1): 103-7.
- Dörr W. 1997. « Three A's of Repopulation during Fractionated Irradiation of Squamous Epithelia: Asymmetry Loss, Acceleration of Stem-Cell Divisions and Abortive Divisions ». *International Journal of Radiation Biology* 72 (6): 635-43.
- Dupont D. M., J. B. Madsen, T. Kristensen, J. Stove Bodker, G. E. Blouse, T. Wind, et P. A. Andreasen. 2009. « Biochemical Properties of Plasminogen Activator Inhibitor-1 ». *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 14: 1337-61.
- Ebrahimian T. G, C. Squiban, T. Roque, H. Lugo-Martinez, M. Hneino, V. Buard, P. Gourmelon, M. Benderitter, F. Milliat, et R. Tamarat. 2012. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 Controls Bone Marrow-Derived Cells Therapeutic Effect through MMP9 Signaling: Role in Physiological and Pathological Wound Healing ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 30 (7): 1436-46.
- Ehling M., S. Adams, R. Benedito, et R. H. Adams. 2013. « Notch Controls Retinal Blood Vessel Maturation and Quiescence ». *Development (Cambridge, England)* 140 (14): 3051-61.
- Eickelberg, O., E. Köhler, F. Reichenberger, S. Bertschin, T. Woodtli, P. Erne, A. P. Perruchoud, et M. Roth. 1999. « Extracellular Matrix Deposition by Primary Human Lung Fibroblasts in Response to TGF-beta1 and TGF-beta3 ». *The American Journal of Physiology* 276 (5 Pt 1): L814-24.
- Eitzman, D. T., R. D. McCoy, X. Zheng, W. P. Fay, T. Shen, D. Ginsburg, et R. H. Simon. 1996. « Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Transgenic Mice That Either Lack or Overexpress the Murine Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene ». *The Journal of Clinical Investigation* 97 (1): 232-37.
- Eitzman, D. T., R. J. Westrick, E. G. Nabel, et D. Ginsburg. 2000. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Vitronectin Promote Vascular Thrombosis in Mice ». *Blood* 95 (2): 577-80.
- Elzi D. J., Y. Lai, M. Song, K. Hakala, S. T. Weintraub, et Y. Shiio. 2012. « Plasminogen Activator Inhibitor 1--Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3 Cascade Regulates Stress-Induced Senescence ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (30): 12052-57.
- Emeis, J. J., et T. Kooistra. 1986. « Interleukin 1 and Lipopolysaccharide Induce an Inhibitor of Tissue-Type Plasminogen Activator in Vivo and in Cultured Endothelial Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 163 (5): 1260-66.

- Ennifar E., J. E. W. Meyer, F. Buchholz, A. F. Stewart, et D. Suck. 2003. « Crystal Structure of a Wild-Type Cre Recombinase-loxP Synapse Reveals a Novel Spacer Conformation Suggesting an Alternative Mechanism for DNA Cleavage Activation ». *Nucleic Acids Research* 31 (18): 5449-60.
- Eren M., A. E. Boe, S. B. Murphy, A. T. Place, V. Nagpal, L. Morales-Nebreda, D. Urich. 2014. « PAI-1-Regulated Extracellular Proteolysis Governs Senescence and Survival in Klotho Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (19): 7090-95.
- Eren M., C. A. Painter, J. B. Atkinson, P. J. Declerck, et D. E. Vaughan. 2002. « Age-Dependent Spontaneous Coronary Arterial Thrombosis in Transgenic Mice That Express a Stable Form of Human Plasminogen Activator Inhibitor-1 ». *Circulation* 106 (4): 491-96.
- Eriksson, I. 1990. « Reconstructive Surgery for Deep Vein Valve Incompetence in the Lower Limb ». *European Journal of Vascular Surgery* 4 (3): 211-18.
- Eriksson, P., B. Kallin, F. M. van 't Hooft, P. Båvenholm, et A. Hamsten. 1995. « Allele-Specific Increase in Basal Transcription of the Plasminogen-Activator Inhibitor 1 Gene Is Associated with Myocardial Infarction ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (6): 1851-55.
- Fay, W. P., A. C. Parker, L. R. Condrey, et A. D. Shapiro. 1997. « Human Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Deficiency: Characterization of a Large Kindred with a Null Mutation in the PAI-1 Gene ». *Blood* 90 (1): 204-8.
- Fearns, C., et D. J. Loskutoff. 1997. « Induction of Plasminogen Activator Inhibitor 1 Gene Expression in Murine Liver by Lipopolysaccharide. Cellular Localization and Role of Endogenous Tumor Necrosis Factor-Alpha ». *The American Journal of Pathology* 150 (2): 579-90.
- Feil, R., J. Brocard, B. Mascrez, M. LeMeur, D. Metzger, et P. Chambon. 1996. « Ligand-Activated Site-Specific Recombination in Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (20): 10887-90.
- Feil, R., J. Wagner, D. Metzger, et P. Chambon. 1997. « Regulation of Cre Recombinase Activity by Mutated Estrogen Receptor Ligand-Binding Domains ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 237 (3): 752-57.
- Fernandez-Cadenas, I., A. Del Rio-Espinola, M. Rubiera, M. Mendioroz, S. Domingues-Montanari, E. Cuadrado, M. Hernandez-Guillamon, et al. 2010. « PAI-1 4G/5G Polymorphism Is Associated with Brain Vessel Reocclusion after Successful Fibrinolytic Therapy in Ischemic Stroke Patients ». *The International Journal of Neuroscience* 120 (4): 245-51.
- Festa A., R. D'Agostino, R. P. Tracy, S. M. Haffner. 2002. « Elevated Levels of Acute-Phase Proteins and Plasminogen Activator Inhibitor-1 Predict the Development of Type 2 Diabetes: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study ». *Diabetes* 51 (4): 1131-37.
- Fink T., A. Kazlauskas, L. Poellinger, P. Ebbesen, et V. Zachar. 2002. « Identification of a Tightly Regulated Hypoxia-Response Element in the Promoter of Human Plasminogen Activator Inhibitor-1 ». *Blood* 99 (6): 2077-83.
- Fitsialos G., A-A. Chassot, L. Turchi, M. A. Dayem, K. LeBrigand, C. Moreilhon, G. Meneguzzi. 2007. « Transcriptional Signature of Epidermal Keratinocytes Subjected to in Vitro Scratch Wounding Reveals Selective Roles for ERK1/2, p38, and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathways ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (20): 15090-102.
- Flanders K. C., C. D. Sullivan, M. Fujii, A. Sowers, M. A. Anzano, A. Arabshahi, C. Major. 2002. « Mice Lacking Smad3 Are Protected against Cutaneous Injury Induced by Ionizing Radiation ». *The American Journal of Pathology* 160 (3): 1057-68.
- Fleetwood A. J., A. Achuthan, H. Schultz, A. Nansen, K. Almholt, P. Usher, et J.A. Hamilton. 2014. « Urokinase Plasminogen Activator Is a Central Regulator of Macrophage Three-Dimensional Invasion, Matrix Degradation, and Adhesion ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192 (8): 3540-47.

- Flick M. J., C. M. LaJeunesse, K. E. Talmage, D. P. Witte, J. S. Palumbo, M. D. Pinkerton, S. Thornton, et J. L. Degen. 2007. « Fibrin(ogen) Exacerbates Inflammatory Joint Disease through a Mechanism Linked to the Integrin α M β 2 Binding Motif ». *The Journal of Clinical Investigation* 117 (11): 3224-35.
- Flier, S. N., H. Tanjore, E. G. Kokkotou, H. Sugimoto, M. Zeisberg, et R. Kalluri. 2010. « Identification of Epithelial to Mesenchymal Transition as a Novel Source of Fibroblasts in Intestinal Fibrosis ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (26): 20202-12.
- Florova G., A. Azghani, S. Karandashova, C. Schaefer, K. Koenig, K. Stewart-Evans, P. J. Declerck, S. Idell, et A. A. Komissarov. 2014. « Targeting of Plasminogen Activator Inhibitor 1 Improves Fibrinolytic Therapy for Tetracycline Induced Pleural Injury in Rabbits ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, août.
- Forde A., R. Constien, H-J. Gröne, G. Hämmerling, et B. Arnold. 2002. « Temporal Cre-Mediated Recombination Exclusively in Endothelial Cells Using Tie2 Regulatory Elements ». *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 33 (4): 191-97.
- Fuhrmann-Benzakein, E., I. García-Gabay, M. S. Pepper, J. D. Vassalli, et P. L. Herrera. 2000. « Inducible and Irreversible Control of Gene Expression Using a Single Transgene ». *Nucleic Acids Research* 28 (23): E99.
- Gaber M. W., H. Y., J. T. Killmar, M. D. Naimark, M. F. Kiani, et T. E. Merchant. 2004. « An Intravital Microscopy Study of Radiation-Induced Changes in Permeability and Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in the Microvessels of the Rat Pia Mater and Cremaster Muscle ». *Brain Research. Brain Research Protocols* 13 (1): 1-10.
- Gabriel C., C. Ali, S. Lesné, M. Fernández-Monreal, F. Docagne, L. Plawinski, E. T. MacKenzie, A. Buisson, et D. Vivien. 2003. « Transforming Growth Factor Alpha-Induced Expression of Type 1 Plasminogen Activator Inhibitor in Astrocytes Rescues Neurons from Excitotoxicity ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (2): 277-79..
- Gabriels K., S. Hoving, M. J. Gijbels, J. F. Pol, J. A. te Poele, E. A. Biessen, M. J. Daemen, F. A. Stewart, et S. Heeneman. 2014. « Irradiation of Existing Atherosclerotic Lesions Increased Inflammation by Favoring pro-Inflammatory Macrophages ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 110 (3): 455-60.
- Gabriely I., X. M. Yang, J. A. Cases, X. H. Ma, L. Rossetti, et N. Barzilai. 2002. « Hyperglycemia Induces PAI-1 Gene Expression in Adipose Tissue by Activation of the Hexosamine Biosynthetic Pathway ». *Atherosclerosis* 160 (1): 115-22.
- García L., I. Hernández, A. Sandoval, A. Salazar, J. Garcia, J. Vera, G. Grijalva, P. Muriel, S. Margolin, et J. Armendariz-Borunda. 2002. « Pirfenidone Effectively Reverses Experimental Liver Fibrosis ». *Journal of Hepatology* 37 (6): 797-805.
- Gaugler, M.-H., V. Vereycken-Holler, C. Squiban, et J. Aigueperse. 2004. « PECAM-1 (CD31) Is Required for Interactions of Platelets with Endothelial Cells after Irradiation ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 2 (11): 2020-26.
- Ghosh A. K., W. S. Bradham, L. A. Gleaves, B. De Taeye, S. B. Murphy, J. W. Covington, et D. E. Vaughan. 2010. « Genetic Deficiency of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promotes Cardiac Fibrosis in Aged Mice: Involvement of Constitutive Transforming Growth Factor-Beta Signaling and Endothelial-to-Mesenchymal Transition ». *Circulation* 122 (12): 1200-1209.
- Ghosh A. K., et D. E. Vaughan. 2012. « PAI-1 in Tissue Fibrosis ». *Journal of Cellular Physiology* 227 (2): 493-507.
- Gierut J. J., P. S. Mathur, W. Bie, J. Han, et A. L. Tyner. 2012. « Targeting Protein Tyrosine Kinase 6 Enhances Apoptosis of Colon Cancer Cells Following DNA Damage ». *Molecular Cancer Therapeutics* 11 (11): 2311-20.
- Goldstein, S., E. J. Moerman, S. Fujii, et B. E. Sobel. 1994. « Overexpression of Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 in Senescent Fibroblasts from Normal Subjects and Those with Werner Syndrome ». *Journal of Cellular Physiology* 161 (3): 571-79.

- Gomes-Giacoia, E., M. Miyake, S. Goodison, et C. J. Rosser. 2013. « Targeting Plasminogen Activator Inhibitor-1 Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth in a Human Cancer Xenograft Model ». *Molecular Cancer Therapeutics* 12 (12): 2697-2708.
- Gory, S., M. Vernet, M. Laurent, E. Dejana, J. Dalmon, et P. Huber. 1999. « The Vascular Endothelial-Cadherin Promoter Directs Endothelial-Specific Expression in Transgenic Mice ». *Blood* 93 (1): 184-92.
- Göthert J. R., S. E. Gustin, J. A. M. van Eekelen, U. Schmidt, M. A. Hall, S. M. Jane, A. R. Green, B. Göttgens, D. J. Izon, et C. G. Begley. 2004. « Genetically Tagging Endothelial Cells in Vivo: Bone Marrow-Derived Cells Do Not Contribute to Tumor Endothelium ». *Blood* 104 (6): 1769-77.
- Gottlieb, T. M., et M. Oren. 1996. « p53 in Growth Control and Neoplasia ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1287 (2-3): 77-102.
- Gourmelon P., M. Benderitter, J. M. Bertho, C. Huet, N. C. Gorin, et P. De Revel. 2010. « European Consensus on the Medical Management of Acute Radiation Syndrome and Analysis of the Radiation Accidents in Belgium and Senegal ». *Health Physics* 98 (6): 825-32.
- Grey, S. T., A. Tsuchida, H. Hau, C. L. Orthner, H. H. Salem, et W. W. Hancock. 1994. « Selective Inhibitory Effects of the Anticoagulant Activated Protein C on the Responses of Human Mononuclear Phagocytes to LPS, IFN-Gamma, or Phorbol Ester ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 153 (8): 3664-72.
- Gu, H., J. D. Marth, P. C. Orban, H. Mossmann, et K. Rajewsky. 1994. « Deletion of a DNA Polymerase Beta Gene Segment in T Cells Using Cell Type-Specific Gene Targeting ». *Science (New York, N.Y.)* 265 (5168): 103-6.
- Gustafsson, E., C. Brakebusch, K. Hietanen, et R. Fässler. 2001. « Tie-1-Directed Expression of Cre Recombinase in Endothelial Cells of Embryoid Bodies and Transgenic Mice ». *Journal of Cell Science* 114 (Pt 4): 671-76.
- Gutierrez, L. S., A. Schulman, T. Brito-Robinson, F. Noria, V. A. Ploplis, et F. J. Castellino. 2000. « Tumor Development Is Retarded in Mice Lacking the Gene for Urokinase-Type Plasminogen Activator or Its Inhibitor, Plasminogen Activator Inhibitor-1 ». *Cancer Research* 60 (20): 5839-47.
- Haegebarth A., A. O. Perekatt, W. Bie, J. J. Gierut, et A. L. Tyner. 2009. « Induction of Protein Tyrosine Kinase 6 in Mouse Intestinal Crypt Epithelial Cells Promotes DNA Damage-Induced Apoptosis ». *Gastroenterology* 137 (3): 945-54.
- Hageman J., B. J. Eggen, T. Rozema, K. Damman, H. H. Kampinga, et R. P. Coppes. 2005. « Radiation and Transforming Growth Factor-Beta Cooperate in Transcriptional Activation of the Profibrotic Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11 (16): 5956-64.
- Haimovitz-Friedman, A., C. C. Kan, D. Ehleiter, R. S. Persaud, M. McLoughlin, Z. Fuks, et R. N. Kolesnick. 1994. « Ionizing Radiation Acts on Cellular Membranes to Generate Ceramide and Initiate Apoptosis ». *The Journal of Experimental Medicine* 180 (2): 525-35.
- Halamkova J., I. Kiss, Z. Pavlovsky, J. Jarkovsky, J. Tomasek, S. Tucek, L. Hanakova. 2011. « Clinical Relevance of uPA, uPAR, PAI 1 and PAI 2 Tissue Expression and Plasma PAI 1 Level in Colorectal Carcinoma Patients ». *Hepato-Gastroenterology* 58 (112): 1918-25.
- Hallahan D. E., L. Geng, et Y. Shyr. 2002. « Effects of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) Null Mutation on Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis and Respiratory Insufficiency in Mice ». *Journal of the National Cancer Institute* 94 (10): 733-41.
- Hallahan, D. E., et S. Virudachalam. 1997. « Ionizing Radiation Mediates Expression of Cell Adhesion Molecules in Distinct Histological Patterns within the Lung ». *Cancer Research* 57 (11): 2096-99.
- Hallahan, D., J. Kuchibhotla, et C. Wyble. 1996. « Cell Adhesion Molecules Mediate Radiation-Induced Leukocyte Adhesion to the Vascular Endothelium ». *Cancer Research* 56 (22): 5150-55.

- Hamano K., M. Iwano, Y. Akai, H. Sato, A. Kubo, Y. Nishitani, H. Uyama. 2002. « Expression of Glomerular Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 in Glomerulonephritis ». *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation* 39 (4): 695-705.
- Handschel, J., F. J. Prott, C. Sunderkötter, D. Metz, U. Meyer, et U. Joos. 1999. « Irradiation Induces Increase of Adhesion Molecules and Accumulation of beta2-Integrin-Expressing Cells in Humans ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 45 (2): 475-81.
- Harbeck N., R. E. Kates, M. Schmitt, K. Gauger, M. Kiechle, F. Janicke, C. Thomassen, M. P. Look, et J. A. Foekens. 2004. « Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor Type 1 Predict Disease Outcome and Therapy Response in Primary Breast Cancer ». *Clinical Breast Cancer* 5 (5): 348-52.
- Hattori, N., J. L. Degen, T. H. Sisson, H. Liu, B. B. Moore, R. G. Pandrangi, R. H. Simon, et A. F. Drew. 2000. « Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Fibrinogen-Null Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 106 (11): 1341-50.
- Hauer-Jensen M., J. W Denham, et H J. N Andreyev. 2014. « Radiation Enteropathy-Pathogenesis, Treatment and Prevention ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, avril.
- Hauer-Jensen, M, L Poulakos, et J W Osborne. 1988. « Effects of Accelerated Fractionation on Radiation Injury of the Small Intestine: A New Rat Model ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 14 (6): 1205-12.
- Hauer Jensen, M, T Sauer, F Devik, et K Nygaard. 1983. « Effects of Dose Fractionation on Late Roentgen Radiation Damage of Rat Small Intestine ». *Acta Radiologica. Oncology* 22 (5): 381-84.
- Haydont V., D. Mathé, C. Bourcier, J. Abdelali, J. Aigueperse, J. Bourhis, et M-C. Vozenin-Brotons. 2005. « Induction of CTGF by TGF-beta1 in Normal and Radiation Enteritis Human Smooth Muscle Cells: Smad/Rho Balance and Therapeutic Perspectives ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 76 (2): 219-25.
- Haydont V., B. L. Riser, J. Aigueperse, et M-C. Vozenin-Brotons. 2008. « Specific Signals Involved in the Long-Term Maintenance of Radiation-Induced Fibrogenic Differentiation: A Role for CCN2 and Low Concentration of TGF-beta1 ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 294 (6): C1332-41.
- Heffner C. S., C. H. Pratt, R. P. Babiuk, Y. Sharma, S. F. Rockwood, L. R. Donahue, J.T. Eppig, et S. A. Murray. 2012. « Supporting Conditional Mouse Mutagenesis with a Comprehensive Cre Characterization Resource ». *Nature Communications* 3: 1218.
- Henderson, B. W., H. I. Bicher, et R. J. Johnson. 1983. « Loss of Vascular Fibrinolytic Activity Following Irradiation of the Liver--an Aspect of Late Radiation Damage ». *Radiation Research* 95 (3): 646-52.
- Herz, J., et D. K. Strickland. 2001. « LRP: A Multifunctional Scavenger and Signaling Receptor ». *The Journal of Clinical Investigation* 108 (6): 779-84.
- Higgins S. P., R. Samarakoon, C. E. Higgins, J. Freytag, C. E. Wilkins-Port, et P. J. Higgins. 2009. « TGF-β1-Induced Expression of the Anti-Apoptotic PAI-1 Protein Requires EGFR Signaling ». *Cell Communication Insights* 2: 1-11.
- Hinz B., S. H. Phan, V. J. Thannickal, A. Galli, M-L. Bochaton-Piallat, et G. Gabbiani. 2007. « The Myofibroblast: One Function, Multiple Origins ». *The American Journal of Pathology* 170 (6): 1807-16.
- Hirata Y., M. Tabata, H. Kurobe, T. Motoki, M. Akaike, C. Nishio, M. Higashida. 2011. « Coronary Atherosclerosis Is Associated with Macrophage Polarization in Epicardial Adipose Tissue ». *Journal of the American College of Cardiology* 58 (3): 248-55.
- Hisatsune H., K. Matsumura, M. Ogawa, A. Uemura, N. Kondo, J. K. Yamashita, H. Katsuta, S. Nishikawa, T. Chiba, et S-I. Nishikawa. 2005. « High Level of Endothelial Cell-Specific Gene Expression by a Combination of the 5' Flanking Region and the 5' Half of the First Intron of the VE-Cadherin Gene ». *Blood* 105 (12): 4657-63.

- Hneino M., K. Blirando, V. Buard, G. Tarlet, M. Benderitter, P. Hoodless, A. François, et F. Milliat. 2012. « The TG-Interacting Factor TGIF1 Regulates Stress-Induced Proinflammatory Phenotype of Endothelial Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (46): 38913-21.
- Hneino M., A. François, V. Buard, G. Tarlet, R. Abderrahmani, K. Blirando, P. A. Hoodless, M. Benderitter, et F. Milliat. 2012. « The TGF- β /Smad Repressor TG-Interacting Factor 1 (TGIF1) Plays a Role in Radiation-Induced Intestinal Injury Independently of a Smad Signaling Pathway ». *PloS One* 7 (5): e35672.
- Hoffmann J. N., B. Vollmar, M. W. Laschke, D. Inthorn, J. Fertmann, F. W. Schildberg, et M. D. Menger. 2004. « Microhemodynamic and Cellular Mechanisms of Activated Protein C Action during Endotoxemia ». *Critical Care Medicine* 32 (4): 1011-17.
- Hofstra J. J., A. D. Cornet, P. J. Declerck, B. Dixon, H. Aslami, A. P. J. Vlaar, J. J. Roelofs, T. van der Poll, M. Levi, et M. J. Schultz. 2013. « Nebulized Fibrinolytic Agents Improve Pulmonary Fibrinolysis but Not Inflammation in Rat Models of Direct and Indirect Acute Lung Injury ». *PloS One* 8 (2): e55262.
- Holgerson K., P. H. Kvist, A. Kornerup Hansen, et T. Lindebo Holm. 2014. « Predictive Validity and Immune Cell Involvement in the Pathogenesis of Piroxicam-Accelerated Colitis in Interleukin-10 Knockout Mice ». *International Immunopharmacology* 21 (1): 137-47.
- Holler V., V. Buard, M-H. Gaugler, O. Guipaud, C. Baudelin, A. Sache, M. del R. Perez. 2009. « Pravastatin Limits Radiation-Induced Vascular Dysfunction in the Skin ». *The Journal of Investigative Dermatology* 129 (5): 1280-91.
- Horowitz J. C., D. S. Rogers, R. H. Simon, T. H. Sisson, et V. J. Thannickal. 2008. « Plasminogen Activation Induced Pericellular Fibronectin Proteolysis Promotes Fibroblast Apoptosis ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 38 (1): 78-87.
- Howell, D. C., N. R. Goldsack, R. P. Marshall, R. J. McAnulty, R. Starke, G. Purdy, G. J. Laurent, et R. C. Chambers. 2001. « Direct Thrombin Inhibition Reduces Lung Collagen, Accumulation, and Connective Tissue Growth Factor mRNA Levels in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis ». *The American Journal of Pathology* 159 (4): 1383-95.
- Hua G., T. H. Thin, R. Feldman, A. Haimovitz-Friedman, H. Clevers, Z. Fuks, et R. Kolesnick. 2012. « Crypt Base Columnar Stem Cells in Small Intestines of Mice Are Radioresistant ». *Gastroenterology* 143 (5): 1266-76.
- Huang W-T., P. K. Vayalil, T. Miyata, J. Hagoood, et R-M. Liu. 2012. « Therapeutic Value of Small Molecule Inhibitor to Plasminogen Activator Inhibitor-1 for Lung Fibrosis ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 46 (1): 87-95.
- Huax F., T. Liu, B. McGarry, M. Ullenbruch, et S. H. Phan. 2003. « Dual Roles of IL-4 in Lung Injury and Fibrosis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170 (4): 2083-92.
- Hu P-F., Y-W. Zhu, W. Zhong, Y-X. Chen, Y. Lin, X. Zhang, C. Yin, H-Y. Yue, et W-F. Xie. 2008. « Inhibition of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression by siRNA in Rat Hepatic Stellate Cells ». *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 23 (12): 1917-25.
- Ichimura A., S. Matsumoto, S. Suzuki, T. Dan, S. Yamaki, Y. Sato, H. Kiyomoto. 2013. « A Small Molecule Inhibitor to Plasminogen Activator Inhibitor 1 Inhibits Macrophage Migration ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33 (5): 935-42.
- Igarashi K., et M. Miura. 2008. « Inhibition of a Radiation-Induced Senescence-like Phenotype: A Possible Mechanism for Potentially Lethal Damage Repair in Vascular Endothelial Cells ». *Radiation Research* 170 (4): 534-39.
- Igarashi K., I. Sakimoto, K. Kataoka, K. Ohta, et M. Miura. 2007. « Radiation-Induced Senescence-like Phenotype in Proliferating and Plateau-Phase Vascular Endothelial Cells ». *Experimental Cell Research* 313 (15): 3326-36.
- Ikawa Y., P-S. Ng, K. Endo, M. Kondo, S. Chujo, W. Ishida, F. Shirasaki, M. Fujimoto, et K. Takehara. 2008. « Neutralizing Monoclonal Antibody to Human Connective Tissue Growth Factor Ameliorates Transforming Growth Factor-Beta-Induced Mouse Fibrosis ». *Journal of Cellular Physiology* 216 (3): 680-87.

- Ikeda, Y., M. Ito, M. Matsuu, K. Shichijo, E. Fukuda, T. Nakayama, M. Nakashima, S. Naito, et I. Sekine. 2000. « Expression of ICAM-1 and Acute Inflammatory Cell Infiltration in the Early Phase of Radiation Colitis in Rats ». *Journal of Radiation Research* 41 (3): 279-91.
- Indra, A. K., X. Warot, J. Brocard, J. M. Bornert, J. H. Xiao, P. Chambon, et D. Metzger. 1999. « Temporally-Controlled Site-Specific Mutagenesis in the Basal Layer of the Epidermis: Comparison of the Recombinase Activity of the Tamoxifen-Inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) Recombinases ». *Nucleic Acids Research* 27 (22): 4324-27.
- Isogai, C., W. E. Laug, H. Shimada, P. J. Declerck, M. F. Stins, D. L. Durden, A. Erdreich-Epstein, et Y. A. DeClerck. 2001. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promotes Angiogenesis by Stimulating Endothelial Cell Migration toward Fibronectin ». *Cancer Research* 61 (14): 5587-94.
- Izuhara Y., S. Takahashi, M. Nangaku, S. Takizawa, H. Ishida, K. Kurokawa, C. van Ypersele de Strihou, N. Hirayama, et T. Miyata. 2008. « Inhibition of Plasminogen Activator Inhibitor-1: Its Mechanism and Effectiveness on Coagulation and Fibrosis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28 (4): 672-77.
- Jackson I. L., P-T. Xu, G. Nguyen, J. D. Down, C. S. Johnson, B. P. Katz, C. C. Hadley, et Z. Vujaskovic. 2014. « Characterization of the Dose Response Relationship for Lung Injury Following Acute Radiation Exposure in Three Well-Established Murine Strains: Developing an Interspecies Bridge to Link Animal Models with Human Lung ». *Health Physics* 106 (1): 48-55.
- Jahroudi, N., A. M. Ardekani, et J. S. Greenberger. 1996. « Ionizing Irradiation Increases Transcription of the von Willebrand Factor Gene in Endothelial Cells ». *Blood* 88 (10): 3801-14.
- Jobling M. F., J. D. Mott, M. T. Finnegan, V. Jurukovski, A. C. Erickson, P. J. Walian, S. E. Taylor. 2006. « Isoform-Specific Activation of Latent Transforming Growth Factor Beta (LTGF-Beta) by Reactive Oxygen Species ». *Radiation Research* 166 (6): 839-48.
- Johnson L. Banka, A. A. Riaz, D. Adawi, L. Wittgren, S. Bäck, C. Thornberg, N. Osman, V. Gadaleanu, H. Thorlacius, et B. Jeppsson. 2004. « Radiation Enteropathy and Leucocyte-Endothelial Cell Reactions in a Refined Small Bowel Model ». *BMC Surgery* 4: 10.
- Juhan-Vague, I., S. D. Pyke, M. C. Alessi, J. Jespersen, F. Haverkate, et S. G. Thompson. 1996. « Fibrinolytic Factors and the Risk of Myocardial Infarction or Sudden Death in Patients with Angina Pectoris. ECAT Study Group. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities ». *Circulation* 94 (9): 2057-63.
- Kaikita, K., A. B. Fogo, L. Ma, J. A. Schoenhard, N. J. Brown, et D. E. Vaughan. 2001. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 Deficiency Prevents Hypertension and Vascular Fibrosis in Response to Long-Term Nitric Oxide Synthase Inhibition ». *Circulation* 104 (7): 839-44.
- Kao C-L., L-K. Chen, Y-L. Chang, M-C. Yung, C-C. Hsu, Y-C. Chen, W-L. Lo, S-J. Chen, H-H. Ku, et S-J. Hwang. 2010. « Resveratrol Protects Human Endothelium from H(2)O(2)-Induced Oxidative Stress and Senescence via SirT1 Activation ». *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 17 (9): 970-79.
- Karamanavi E., K. Angelopoulou, S. Lavrentiadou, A. Tsingotjidou, Z. Abas, I. Taitzoglou, I. Vlemmas, S. E. Erdman, et T. Poutahidis. 2014. « Urokinase-Type Plasminogen Activator Deficiency Promotes Neoplasmatogenesis in the Colon of Mice ». *Translational Oncology* 7 (2): 174-87.e5.
- Khallou-Laschet J., A. Varthaman, G. Fornasa, C. Compain, A-T. Gaston, M. Clement, M. Dussiot. 2010. « Macrophage Plasticity in Experimental Atherosclerosis ». *PLoS One* 5 (1): e8852.
- Killewich, L. A., A. W. Gardner, R. F. Macko, D. J. Hanna, A. P. Goldberg, D. K. Cox, et W. R. Flinn. 1998. « Progressive Intermittent Claudication Is Associated with Impaired Fibrinolysis ». *Journal of Vascular Surgery* 27 (4): 645-50.

- Kim D., A. S. Lee, Y. J. Jung, K. H. Yang, S. Lee, S. K. Park, W. Kim, et K. P. Kang. 2014. « Tamoxifen Ameliorates Renal Tubulointerstitial Fibrosis by Modulation of Estrogen Receptor A-Mediated Transforming Growth Factor- β 1/Smad Signaling Pathway ». *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 29 (11): 2043-53.
- Kirsch D. G., P. M. Santiago, E. di Tomaso, J. M. Sullivan, W-S. Hou, T. Dayton, L. B. Jeffords. 2010. « p53 Controls Radiation-Induced Gastrointestinal Syndrome in Mice Independent of Apoptosis ». *Science (New York, N.Y.)* 327 (5965): 593-96.
- Kjøller, L., S. M. Kanse, T. Kirkegaard, K. W. Rodenburg, E. Rønne, S. L. Goodman, K. T. Preissner, L. Ossowski, et P. A. Andreasen. 1997. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 Represses Integrin- and Vitronectin-Mediated Cell Migration Independently of Its Function as an Inhibitor of Plasminogen Activation ». *Experimental Cell Research* 232 (2): 420-29.
- Komarova E. A., R. V. Kondratov, K. Wang, K. Christov, T. V. Golovkina, J. R. Goldblum, et A. V. Gudkov. 2004. « Dual Effect of p53 on Radiation Sensitivity in Vivo: p53 Promotes Hematopoietic Injury, but Protects from Gastro-Intestinal Syndrome in Mice ». *Oncogene* 23 (19): 3265-71.
- Konstantinides, S., K. Schäfer, T. Thinner, et D. J. Loskutoff. 2001. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Its Cofactor Vitronectin Stabilize Arterial Thrombi after Vascular Injury in Mice ». *Circulation* 103 (4): 576-83.
- Kortlever R. M., P. J. Higgins, et R. Bernards. 2006. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 Is a Critical Downstream Target of p53 in the Induction of Replicative Senescence ». *Nature Cell Biology* 8 (8): 877-84.
- Krag S., C. C. Danielsen, P. Carmeliet, J. Nyengaard, et L. Wogensen. 2005. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene Deficiency Attenuates TGF-beta1-Induced Kidney Disease ». *Kidney International* 68 (6): 2651-66.
- Krag, S., R. Osterby, Q. Chai, C. B. Nielsen, C. Hermans, et L. Wogensen. 2000. « TGF-beta1-Induced Glomerular Disorder Is Associated with Impaired Concentrating Ability Mimicking Primary Glomerular Disease with Renal Failure in Man ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 80 (12): 1855-68.
- Kruithof E. K. O. 2008. « Regulation of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Gene Expression by Inflammatory Mediators and Statins ». *Thrombosis and Haemostasis* 100 (6): 969-75.
- Kruse J. J. C. M., B. G. J. Floot, J. A. M. te Poele, N. S. Russell, et F. A. Stewart. 2009. « Radiation-Induced Activation of TGF-Beta Signaling Pathways in Relation to Vascular Damage in Mouse Kidneys ». *Radiation Research* 171 (2): 188-97.
- Kucich, U., J. C. Rosenbloom, D. J. Herrick, W. R. Abrams, A. D. Hamilton, S. M. Sebt, et J. Rosenbloom. 2001. « Signaling Events Required for Transforming Growth Factor-Beta Stimulation of Connective Tissue Growth Factor Expression by Cultured Human Lung Fibroblasts ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 395 (1): 103-12.
- Kuilman T., C. Michaloglou, W. J. Mooi, et D. S. Peeper. 2010. « The Essence of Senescence ». *Genes & Development* 24 (22): 2463-79. doi:10.1101/gad.1971610.
- Kuilman T., et D.S. Peeper. 2009. « Senescence-Messaging Secretome: SMS-Ing Cellular Stress ». *Nature Reviews. Cancer* 9 (2): 81-94. doi:10.1038/nrc2560.
- Kwaan, H. C., J. Wang, K. Svoboda, et P. J. Declerck. 2000. « Plasminogen Activator Inhibitor 1 May Promote Tumour Growth through Inhibition of Apoptosis ». *British Journal of Cancer* 82 (10): 1702-8.
- Lademann U., M. U. Rømer, P. B. Jensen, K. F. Hofland, L. Larsen, I. J. Christensen, et N. Brüner. 2005. « Malignant Transformation of Wild-Type but Not Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene-Deficient Fibroblasts Decreases Cellular Sensitivity to Chemotherapy-Mediated Apoptosis ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 41 (7): 1095-1100.
- Lambert, V., C. Munaut, A. Noël, F. Franken, K. Bajou, R. Gerard, P. Carmeliet, M. P. Defresne, J. M. Foidart, et J. M. Rakic. 2001. « Influence of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 on Choroidal Neovascularization ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (6): 1021-27.

- LaVerne, J. A. 2000. « OH Radicals and Oxidizing Products in the Gamma Radiolysis of Water ». *Radiation Research* 153 (2): 196-200.
- Lee, M. H., E. Vosburgh, K. Anderson, et J. McDonagh. 1993. « Deficiency of Plasma Plasminogen Activator Inhibitor 1 Results in Hyperfibrinolytic Bleeding ». *Blood* 81 (9): 2357-62.
- Leibowitz B. J., W. Qiu, H. Liu, T. Cheng, L. Zhang, et J. Yu. 2011. « Uncoupling p53 Functions in Radiation-Induced Intestinal Damage via PUMA and p21 ». *Molecular Cancer Research: MCR* 9 (5): 616-25.
- Leik, C. E., E. J. Su, P. Nambi, D. L. Crandall, et D. A. Lawrence. 2006. « Effect of Pharmacologic Plasminogen Activator Inhibitor-1 Inhibition on Cell Motility and Tumor Angiogenesis ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 4 (12): 2710-15.
- Lentz, S. R., M. Tsiang, et J. E. Sadler. 1991. « Regulation of Thrombomodulin by Tumor Necrosis Factor-Alpha: Comparison of Transcriptional and Posttranscriptional Mechanisms ». *Blood* 77 (3): 542-50.
- Letterio, J. J., A. G. Geiser, A. B. Kulkarni, N. S. Roche, M. B. Sporn, et A. B. Roberts. 1994. « Maternal Rescue of Transforming Growth Factor-Beta 1 Null Mice ». *Science (New York, N.Y.)* 264 (5167): 1936-38.
- Levi, M., D. Roem, A. M. Kamp, J. P. de Boer, C. E. Hack, et J. W. ten Cate. 1993. « Assessment of the Relative Contribution of Different Protease Inhibitors to the Inhibition of Plasmin in Vivo ». *Thrombosis and Haemostasis* 69 (2): 141-46.
- Liao, W. C., A. Haimovitz-Friedman, R. S. Persaud, M. McLoughlin, D. Ehleiter, N. Zhang, M. Gatei, M. Lavin, R. Kolesnick, et Z. Fuks. 1999. « Ataxia Telangiectasia-Mutated Gene Product Inhibits DNA Damage-Induced Apoptosis via Ceramide Synthase ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (25): 17908-17.
- Licht A. H., S. Raab, U. Hofmann, et G. Breier. 2004. « Endothelium-Specific Cre Recombinase Activity in Flk-1-Cre Transgenic Mice ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 229 (2): 312-18.
- Lijnen H. R., E. Maquoi, P. Morange, G. Voros, B. Van Hoef, F. Kopp, D. Collen, I. Juhan-Vague, et M-C. Alessi. 2003. « Nutritionally Induced Obesity Is Attenuated in Transgenic Mice Overexpressing Plasminogen Activator Inhibitor-1 ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (1): 78-84.
- Linard C., C. Marquette, J. Mathieu, A. Pennequin, D. Clarençon, et D. Mathé. 2004. « Acute Induction of Inflammatory Cytokine Expression after Gamma-Irradiation in the Rat: Effect of an NF-kappaB Inhibitor ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 58 (2): 427-34.
- Lincz L. F., S. A. Gupta, C. R. Wratten, J. Kilmurray, S. Nash, M. Seldon, P. C. O'Brien, K. J. L. Bell, et J. W. Denham. 2009. « Thrombin Generation as a Predictor of Radiotherapy Induced Skin Erythema ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 90 (1): 136-40.
- Lindahl, T. L., O. Sigurdardottir, et B. Wiman. 1989. « Stability of Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-1) ». *Thrombosis and Haemostasis* 62 (2): 748-51.
- Lin Y., X. Yang, W. Yue, X. Xu, B. Li, L. Zou, et R. He. 2014. « Chemerin Aggravates DSS-Induced Colitis by Suppressing M2 Macrophage Polarization ». *Cellular & Molecular Immunology* 11 (4): 355-66.
- Liot G., K. Benchenane, F. Léveillé, J. P. López-Atalaya, M. Fernández-Monreal, A. Ruocco, E.T. Mackenzie, A. Buisson, C. Ali, et D. Vivien. 2004. « 2,7-Bis-(4-Amidinobenzylidene)-Cycloheptan-1-One Dihydrochloride, tPA Stop, Prevents tPA-Enhanced Excitotoxicity Both in Vitro and in Vivo ». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 24 (10): 1153-59.
- Lira F. S., J. C. Rosa, A. E. Lima-Silva, H. A. Souza, E. C. Caperuto, M. C. Seelaender, A. R. Damaso, L. M. Oyama, et R. V. T. Santos. 2010. « Sedentary Subjects Have Higher PAI-1 and Lipoproteins Levels than Highly Trained Athletes ». *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2: 7.

- Li S-H., A. A. Reinke, K. L. Sanders, C. D. Emal, J. C. Whisstock, J. A. Stuckey, et D. A. Lawrence. 2013. « Mechanistic Characterization and Crystal Structure of a Small Molecule Inactivator Bound to Plasminogen Activator Inhibitor-1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (51): E4941-49.
- Loeffler, J S, J R Harris, W K Dahlberg, et J B Little. 1990. « In Vitro Radiosensitivity of Human Diploid Fibroblasts Derived from Women with Unusually Sensitive Clinical Responses to Definitive Radiation Therapy for Breast Cancer ». *Radiation Research* 121 (2): 227-31.
- Lo Sasso G., K. J. Menzies, A. Mottis, A. Piersigilli, A. Perino, H. Yamamoto, K. Schoonjans, et J. Auwerx. 2014. « SIRT2 Deficiency Modulates Macrophage Polarization and Susceptibility to Experimental Colitis ». *PloS One* 9 (7): e103573.
- Loskutoff, D. J., et F. Samad. 1998. « The Adipocyte and Hemostatic Balance in Obesity: Studies of PAI-1 ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 18 (1): 1-6.
- Loureiro J., P. Sandoval, G. del Peso, G. González-Mateo, V. Fernández-Millara, B. Santamaria, M. A. Bajo. 2013. « Tamoxifen Ameliorates Peritoneal Membrane Damage by Blocking Mesothelial to Mesenchymal Transition in Peritoneal Dialysis ». *PloS One* 8 (4): e61165.
- Lowe D., et K. Raj. 2014. « Premature Aging Induced by Radiation Exhibits pro-Atherosclerotic Effects Mediated by Epigenetic Activation of CD44 Expression ». *Aging Cell*, juillet.
- Lumeng C. N., J.L. Bodzin, et A. R. Saltiel. 2007. « Obesity Induces a Phenotypic Switch in Adipose Tissue Macrophage Polarization ». *The Journal of Clinical Investigation* 117 (1): 175-84.
- Lundberg, A. S., W. C. Hahn, P. Gupta, et R. A. Weinberg. 2000. « Genes Involved in Senescence and Immortalization ». *Current Opinion in Cell Biology* 12 (6): 705-9.
- Lupu, F., G. E. Bergonzelli, D. A. Heim, E. Cousin, C. Y. Genton, F. Bachmann, et E. K. Kruthof. 1993. « Localization and Production of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Human Healthy and Atherosclerotic Arteries ». *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology / American Heart Association* 13 (7): 1090-1100.
- Madoiwa S., S. Nunomiya, T. Ono, Y. Shintani, T. Ohmori, J. Mimuro, et Y. Sakata. 2006. « Plasminogen Activator Inhibitor 1 Promotes a Poor Prognosis in Sepsis-Induced Disseminated Intravascular Coagulation ». *International Journal of Hematology* 84 (5): 398-405.
- Ma L-J., S-L. Mao, K. L. Taylor, T. Kanjanabuch, Y. F. Guan, Y.H. Zhang, N. J. Brown. 2004. « Prevention of Obesity and Insulin Resistance in Mice Lacking Plasminogen Activator Inhibitor 1 ». *Diabetes* 53 (2): 336-46.
- Marathe, S., S. L. Schissel, M. J. Yellin, N. Beatini, R. Mintzer, K. J. Williams, et I. Tabas. 1998. « Human Vascular Endothelial Cells Are a Rich and Regulatable Source of Secretory Sphingomyelinase. Implications for Early Atherogenesis and Ceramide-Mediated Cell Signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (7): 4081-88.
- Margaglione, M., G. Cappucci, M. d' Addetta, D. Colaizzo, N. Giuliani, G. Vecchione, G. Mascolo, E. Grandone, et G. Di Minno. 1998. « PAI-1 Plasma Levels in a General Population without Clinical Evidence of Atherosclerosis: Relation to Environmental and Genetic Determinants ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 18 (4): 562-67.
- Martens J. W. M., A. M. Sieuwerts, J. Bolt-deVries, P. T. Bosma, S. J. J. Swiggers, J. G. M. Klijn, et J. A. Foekens. 2003. « Aging of Stromal-Derived Human Breast Fibroblasts Might Contribute to Breast Cancer Progression ». *Thrombosis and Haemostasis* 89 (2): 393-404.
- Masuda T., N. Hattori, T. Senoo, S. Akita, N. Ishikawa, K. Fujitaka, Y. Haruta, H. Murai, et N. Kohno. 2013. « SK-216, an Inhibitor of Plasminogen Activator Inhibitor-1, Limits Tumor Progression and Angiogenesis ». *Molecular Cancer Therapeutics* 12 (11): 2378-88.
- Matsuno, N., T. Ikeda, K. Ikeda, K. Hama, H. Iwamoto, M. Uchiyama, K. Kozaki, et al. 2001. « Changes of Cytokines in Direct Endotoxin Adsorption Treatment on Postoperative Multiple Organ Failure ». *Therapeutic Apheresis: Official Journal of the International Society for Apheresis and the Japanese Society for Apheresis* 5 (1): 36-39.
- McGill, J. B., D. J. Schneider, C. L. Arfken, C. L. Lucre, et B. E. Sobel. 1994. « Factors Responsible for Impaired Fibrinolysis in Obese Subjects and NIDDM Patients ». *Diabetes* 43 (1): 104-9.

- McIlroy M., M. O'Rourke, S. R. McKeown, D. G. Hirst, et T. Robson. 2006. « Pericytes Influence Endothelial Cell Growth Characteristics: Role of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1) ». *Cardiovascular Research* 69 (1): 207-17.
- McMahon, G. A., E. Petittlerc, S. Stefansson, E. Smith, M. K. Wong, R. J. Westrick, D. Ginsburg, P. C. Brooks, et D. A. Lawrence. 2001. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 Regulates Tumor Growth and Angiogenesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (36): 33964-68.
- McManus, L. M., K. K. Ostrom, C. Lear, E. B. Luce, D. L. Gander, R. N. Pinckard, et S. W. Redding. 1993. « Radiation-Induced Increased Platelet-Activating Factor Activity in Mixed Saliva ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 68 (1): 118-24.
- Meeren, A. V., J. M. Bertho, M. Vandamme, et M. H. Gaugler. 1997. « Ionizing Radiation Enhances IL-6 and IL-8 Production by Human Endothelial Cells ». *Mediators of Inflammation* 6 (3): 185-93.
- Meltzer, M. E., T. Lisman, P. G. de Groot, J. C. M. Meijers, S. le Cessie, C. J. M. Doggen, et F. R. Rosendaal. 2010. « Venous Thrombosis Risk Associated with Plasma Hypofibrinolysis Is Explained by Elevated Plasma Levels of TAFI and PAI-1 ». *Blood* 116 (1): 113-21.
- Merritt, A. J., T. D. Allen, C. S. Potten, et J. A. Hickman. 1997. « Apoptosis in Small Intestinal Epithelial from p53-Null Mice: Evidence for a Delayed, p53-Independent G2/M-Associated Cell Death after Gamma-Irradiation ». *Oncogene* 14 (23): 2759-66.
- Mertens I., D. Ballaux, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, M. Van der Planken, A. Verrijken, J. B. Ruige, et L. F. Van Gaal. 2005. « Inverse Relationship between Plasminogen Activator Inhibitor-I Activity and Adiponectin in Overweight and Obese Women. Interrelationship with Visceral Adipose Tissue, Insulin Resistance, HDL-Chol and Inflammation ». *Thrombosis and Haemostasis* 94 (6): 1190-95.
- Mesters, R. M., N. Flörke, H. Ostermann, et J. Kienast. 1996. « Increase of Plasminogen Activator Inhibitor Levels Predicts Outcome of Leukocytopenic Patients with Sepsis ». *Thrombosis and Haemostasis* 75 (6): 902-7.
- Metcalfe C., N. M. Kljavin, R. Ybarra, et F. J. de Sauvage. 2014. « Lgr5+ Stem Cells Are Indispensable for Radiation-Induced Intestinal Regeneration ». *Cell Stem Cell* 14 (2): 149-59.
- Metzger, D., J. Clifford, H. Chiba, et P. Chambon. 1995. « Conditional Site-Specific Recombination in Mammalian Cells Using a Ligand-Dependent Chimeric Cre Recombinase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (15): 6991-95.
- Milliat F., A. François, M. Isoir, E. Deutsch, R. Tamarat, G. Tarlet, A. Atfi. 2006. « Influence of Endothelial Cells on Vascular Smooth Muscle Cells Phenotype after Irradiation: Implication in Radiation-Induced Vascular Damages ». *The American Journal of Pathology* 169 (4): 1484-95.
- Milliat F., J-C. Sabourin, G. Tarlet, V. Holler, E. Deutsch, V. Buard, R. Tamarat, A. Atfi, M. Benderitter, et A. François. 2008. « Essential Role of Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 in Radiation Enteropathy ». *The American Journal of Pathology* 172 (3): 691-701.
- Moeller B. J., Y. Cao, C. Y. Li, et M. W. Dewhirst. 2004. « Radiation Activates HIF-1 to Regulate Vascular Radiosensitivity in Tumors: Role of Reoxygenation, Free Radicals, and Stress Granules ». *Cancer Cell* 5 (5): 429-41.
- Mollà M., M. Gironella, R. Miquel, V. Tovar, P. Engel, A. Biete, J. M. Piqué, et J. Panés. 2003. « Relative Roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the Pathogenesis of Experimental Radiation-Induced Intestinal Inflammation ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 57 (1): 264-73.
- Mollà M., et J. Panes. 2007. « Radiation-Induced Intestinal Inflammation ». *World Journal of Gastroenterology: WJG* 13 (22): 3043-46.
- Mollà M., M. Gironella, A. Salas, R. Miquel, S. Pérez-del-Pulgar, C. Conill, P. Engel, A. Biete, J. M. Piqué, et J. Panés. 2001. « Role of P-Selectin in Radiation-Induced Intestinal Inflammatory Damage ». *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 96 (2): 99-109.

- Montgomery R. K., D. L. Carlone, C. A. Richmond, L. Farilla, M. E. G. Kranendonk, D. E. Henderson, N. Y. Baffour-Awuah. 2011. « Mouse Telomerase Reverse Transcriptase (mTert) Expression Marks Slowly Cycling Intestinal Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (1): 179-84.
- Monvoisin A., J. A Alva, J. J Hofmann, A. C Zovein, T. F Lane, et M L. Iruela-Arispe. 2006. « VE-Cadherin-CreERT2 Transgenic Mouse: A Model for Inducible Recombination in the Endothelium ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 235 (12): 3413-22.
- Morange, P. E., H. R. Lijnen, M. C. Alessi, F. Kopp, D. Collen, et I. Juhan-Vague. 2000. « Influence of PAI-1 on Adipose Tissue Growth and Metabolic Parameters in a Murine Model of Diet-Induced Obesity ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20 (4): 1150-54.
- Moriwaki H., A. Stempien-Otero, M. Kremen, A. E. Cozen, et D. A. Dichek. 2004. « Overexpression of Urokinase by Macrophages or Deficiency of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Causes Cardiac Fibrosis in Mice ». *Circulation Research* 95 (6): 637-44.
- Mosnier L. O., et B. N. Bouma. 2006. « Regulation of Fibrinolysis by Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor, an Unstable Carboxypeptidase B That Unites the Pathways of Coagulation and Fibrinolysis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (11): 2445-53.
- Motoike T., D. W. Markham, J. Rossant, et T. N. Sato. 2003. « Evidence for Novel Fate of Flk1+ Progenitor: Contribution to Muscle Lineage ». *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 35 (3): 153-59.
- Moussad, E. E., et D. R. Brigstock. 2000. « Connective Tissue Growth Factor: What's in a Name? ». *Molecular Genetics and Metabolism* 71 (1-2): 276-92.
- Mouthon M-A., V. Vereycken-Holler, A. Van der Meeren, et M-H. Gaugler. 2003. « Irradiation Increases the Interactions of Platelets with the Endothelium in Vivo: Analysis by Intravital Microscopy ». *Radiation Research* 160 (5): 593-99.
- Muñoz J., D. E. Stange, A. G. Schepers, M. van de Wetering, B-K. Koo, S. Itzkovitz, R. Volckmann. 2012. « The Lgr5 Intestinal Stem Cell Signature: Robust Expression of Proposed Quiescent "+4" Cell Markers ». *The EMBO Journal* 31 (14): 3079-91.
- Murakami, J., A. Ohtani, et S. Murata. 1997. « Protective Effect of T-686, an Inhibitor of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Production, against the Lethal Effect of Lipopolysaccharide in Mice ». *Japanese Journal of Pharmacology* 75 (3): 291-94.
- Mu, X. C., et P. J. Higgins. 1995. « Differential Growth State-Dependent Regulation of Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 Expression in Senescent IMR-90 Human Diploid Fibroblasts ». *Journal of Cellular Physiology* 165 (3): 647-57.
- Nagai, N., M. De Mol, H. R. Lijnen, P. Carmeliet, et D. Collen. 1999. « Role of Plasminogen System Components in Focal Cerebral Ischemic Infarction: A Gene Targeting and Gene Transfer Study in Mice ». *Circulation* 99 (18): 2440-44.
- Nagai, N., Y. Suzuki, B. Van Hoef, H. R. Lijnen, et D. Collen. 2005. « Effects of Plasminogen Activator Inhibitor-1 on Ischemic Brain Injury in Permanent and Thrombotic Middle Cerebral Artery Occlusion Models in Mice ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 3 (7): 1379-84.
- Naito, M., H. Nagai, S. Kawano, H. Umezu, H. Zhu, H. Moriyama, T. Yamamoto, H. Takatsuka, et Y. Takei. 1996. « Liposome-Encapsulated Dichloromethylene Diphosphonate Induces Macrophage Apoptosis in Vivo and in Vitro ». *Journal of Leukocyte Biology* 60 (3): 337-44.
- Nakase H., K. Okazaki, Y. Tabata, M. Ozeki, N. Watanabe, M. Ohana, S. Uose. 2002. « New Cytokine Delivery System Using Gelatin Microspheres Containing Interleukin-10 for Experimental Inflammatory Bowel Disease ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 301 (1): 59-65.
- Newby A. C. 2005. « Dual Role of Matrix Metalloproteinases (matrixins) in Intimal Thickening and Atherosclerotic Plaque Rupture ». *Physiological Reviews* 85 (1): 1-31.

- Nishikawa, S. I., S. Nishikawa, M. Hirashima, N. Matsuyoshi, et H. Kodama. 1998. « Progressive Lineage Analysis by Cell Sorting and Culture Identifies FLK1+VE-Cadherin+ Cells at a Diverging Point of Endothelial and Hemopoietic Lineages ». *Development (Cambridge, England)* 125 (9): 1747-57.
- Oda, T., Y O Jung, H S Kim, X Cai, J M López-Guisa, Y Ikeda, et A A Eddy. 2001. « PAI-1 Deficiency Attenuates the Fibrogenic Response to Ureteral Obstruction ». *Kidney International* 60 (2): 587-96.
- Oga T., T. Matsuoka, C. Yao, K. Nonomura, S. Kitaoka, D. Sakata, Y. Kita, et al. 2009. « Prostaglandin F(2alpha) Receptor Signaling Facilitates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis Independently of Transforming Growth Factor-Beta ». *Nature Medicine* 15 (12): 1426-30.
- Oh, C. W., E. A. Bump, J. S. Kim, D. Janigro, et M. R. Mayberg. 2001. « Induction of a Senescence-like Phenotype in Bovine Aortic Endothelial Cells by Ionizing Radiation ». *Radiation Research* 156 (3): 232-40.
- Ohji, T., H. Urano, A. Shirahata, M. Yamagishi, K. Higashi, S. Gotoh, et Y. Karasaki. 1995. « Transforming Growth Factor Beta 1 and Beta 2 Induce down-Modulation of Thrombomodulin in Human Umbilical Vein Endothelial Cells ». *Thrombosis and Haemostasis* 73 (5): 812-18.
- Oikawa, T., M. Freeman, W. Lo, D. E. Vaughan, et A. Fogo. 1997. « Modulation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Vivo: A New Mechanism for the Anti-Fibrotic Effect of Renin-Angiotensin Inhibition ». *Kidney International* 51 (1): 164-72.
- Orban, P. C., D. Chui, et J. D. Marth. 1992. « Tissue- and Site-Specific DNA Recombination in Transgenic Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (15): 6861-65.
- Osterholzer J. J, P. J Christensen, V. Lama, J. C Horowitz, N. Hattori, N. Subbotina, A. Cunningham. 2012. « PAI-1 Promotes the Accumulation of Exudate Macrophages and Worsens Pulmonary Fibrosis Following Type II Alveolar Epithelial Cell Injury ». *The Journal of Pathology* 228 (2): 170-80.
- Ota H., M. Akishita, M. Eto, K. Iijima, M. Kaneki, et Y. Ouchi. 2007. « Sirt1 Modulates Premature Senescence-like Phenotype in Human Endothelial Cells ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 43 (5): 571-79.
- Panés, J., D. C. Anderson, M. Miyasaka, et D. N. Granger. 1995. « Role of Leukocyte-Endothelial Cell Adhesion in Radiation-Induced Microvascular Dysfunction in Rats ». *Gastroenterology* 108 (6): 1761-69.
- Panganiban R. Allan M., et R. M. Day. 2013. « Inhibition of IGF-1R Prevents Ionizing Radiation-Induced Primary Endothelial Cell Senescence ». *PloS One* 8 (10): e78589.
- Paris, F, Z Fuks, A Kang, P Capodiecici, G Juan, D Ehleiter, A Haimovitz-Friedman, C Cordon-Cardo, et R Kolesnick. 2001. « Endothelial Apoptosis as the Primary Lesion Initiating Intestinal Radiation Damage in Mice ». *Science (New York, N.Y.)* 293 (5528): 293-97.
- Parra, M., M. Jardí, M. Koziczak, Y. Nagamine, et P. Muñoz-Cánoves. 2001. « p53 Phosphorylation at Serine 15 Is Required for Transcriptional Induction of the Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Gene by the Alkylating Agent N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (39): 36303-10.
- Peña L. A., Z. Fuks, et R. N. Kolesnick. 2000. « Radiation-Induced Apoptosis of Endothelial Cells in the Murine Central Nervous System: Protection by Fibroblast Growth Factor and Sphingomyelinase Deficiency ». *Cancer Research* 60 (2): 321-27.
- Ploplis V. A., R. Balsara, M. J. Sandoval-Cooper, Z. J. Yin, J. Batten, N. Modi, D. Gadoua, D. Donahue, J. A. Martin, et F. J. Castellino. 2004. « Enhanced in Vitro Proliferation of Aortic Endothelial Cells from Plasminogen Activator Inhibitor-1-Deficient Mice ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (7): 6143-51.

- Poggi, M., O. Paulmyer-Lacroix, M. Verdier, F. Peiretti, D. Bastelica, J. Boucraut, H. R. Lijnen, I. Juhan-Vague, et M. C. Alessi. 2007. « Chronic Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Overexpression Dampens CD25+ Lymphocyte Recruitment after Lipopolysaccharide Endotoxemia in Mouse Lung ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 5 (12): 2467-75.
- Potten, C. S. 1977. « Extreme Sensitivity of Some Intestinal Crypt Cells to X and Gamma Irradiation ». *Nature* 269 (5628): 518-21.
- Powell A. E., Y. Wang, Y. Li, E. J. Poulin, A. L. Means, M. K. Washington, J. N. Higginbotham. 2012. « The Pan-ErbB Negative Regulator Lrig1 Is an Intestinal Stem Cell Marker That Functions as a Tumor Suppressor ». *Cell* 149 (1): 146-58.
- Pralong, G., T. Calandra, M. P. Glauser, J. Schellekens, J. Verhoef, F. Bachmann, et E. K. Kruihof. 1989. « Plasminogen Activator Inhibitor 1: A New Prognostic Marker in Septic Shock ». *Thrombosis and Haemostasis* 61 (3): 459-62.
- Proia R. R., P. R. Nelson, M. J. Mulligan-Kehoe, R. J. Wagner, A. J. Kehas, et R. J. Powell. 2002. « The Effect of Endothelial Cell Overexpression of Plasminogen Activator Inhibitor-1 on Smooth Muscle Cell Migration ». *Journal of Vascular Surgery* 36 (1): 164-71.
- Puck T. T., et P. I. Marcus. 1956. « Action of X-Rays on Mammalian Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 103 (5): 653-66.
- Qi, J., S. Goralnick, et D. L. Kreutzer. 1997. « Fibrin Regulation of Interleukin-8 Gene Expression in Human Vascular Endothelial Cells ». *Blood* 90 (9): 3595-3602.
- Qi, J., D. L. Kreutzer, et T. H. Piela-Smith. 1997. « Fibrin Induction of ICAM-1 Expression in Human Vascular Endothelial Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 158 (4): 1880-86.
- Qiu W., E. B. Carson-Walter, H. Liu, M. Epperly, J. S. Greenberger, G. P. Zambetti, L. Zhang, et J. Yu. 2008. « PUMA Regulates Intestinal Progenitor Cell Radiosensitivity and Gastrointestinal Syndrome ». *Cell Stem Cell* 2 (6): 576-83.
- Qiu, W., B. Leibowitz, L. Zhang, et J. Yu. 2010. « Growth Factors Protect Intestinal Stem Cells from Radiation-Induced Apoptosis by Suppressing PUMA through the PI3K/AKT/p53 Axis ». *Oncogene* 29 (11): 1622-32.
- Qualls J. E., A. M. Kaplan, N. van Rooijen, et D. A. Cohen. 2006. « Suppression of Experimental Colitis by Intestinal Mononuclear Phagocytes ». *Journal of Leukocyte Biology* 80 (4): 802-15.
- Quarumby, S., P. Kumar, et S. Kumar. 1999. « Radiation-Induced Normal Tissue Injury: Role of Adhesion Molecules in Leukocyte-Endothelial Cell Interactions ». *International Journal of Cancer*. 82 (3): 385-95.
- Raaphorst, J., A. B. J. Groeneveld, A. W. Bossink, et C. E. Hack. 2001. « Early Inhibition of Activated Fibrinolysis Predicts Microbial Infection, Shock and Mortality in Febrile Medical Patients ». *Thrombosis and Haemostasis* 86 (2): 543-49.
- Raeven, P., S. Drechsler, K. M. Weixelbaumer, D. Bastelica, F. Peiretti, A. Klotz, M. Jafarmadar, et al. 2014. « Systemic Inhibition and Liver-Specific over-Expression of PAI-1 Failed to Improve Survival in All-Inclusive Populations or Homogenous Cohorts of CLP Mice ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 12 (6): 958-69.
- Redmond, E. M., J. P. Cullen, P. A. Cahill, J. V. Sitzmann, S. Stefansson, D. A. Lawrence, et S. S. Okada. 2001. « Endothelial Cells Inhibit Flow-Induced Smooth Muscle Cell Migration: Role of Plasminogen Activator Inhibitor-1 ». *Circulation* 103 (4): 597-603.
- Renckens R., J. J. T. H. Roelofs, P. I. Bonta, S. Florquin, C. J. M. de Vries, M. Levi, P. Carmeliet, C. van't Veer, et T. van der Poll. 2007. « Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Is Protective during Severe Gram-Negative Pneumonia ». *Blood* 109 (4): 1593-1601.
- Repin, V. S., V. V. Dolgov, O. E. Zaikina, I. D. Novikov, A. S. Antonov, M. A. Nikolaeva, et V. N. Smirnov. 1984. « Heterogeneity of Endothelium in Human Aorta. A Quantitative Analysis by Scanning Electron Microscopy ». *Atherosclerosis* 50 (1): 35-52.

- Ribo M., J. Montaner, C. A. Molina, J. F. Arenillas, E. Santamarina, M. Quintana, et J. Alvarez-Sabín. 2004. « Admission Fibrinolytic Profile Is Associated with Symptomatic Hemorrhagic Transformation in Stroke Patients Treated with Tissue Plasminogen Activator ». *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 35 (9): 2123-27.
- Richter, K. K., L. M. Fink, B. M. Hughes, H. M. Shmaysani, C. C. Sung, et M. Hauer-Jensen. 1998. « Differential Effect of Radiation on Endothelial Cell Function in Rectal Cancer and Normal Rectum ». *American Journal of Surgery* 176 (6): 642-47.
- Richter, K. K., L. M. Fink, B. M. Hughes, C. C. Sung, et M. Hauer-Jensen. 1997. « Is the Loss of Endothelial Thrombomodulin Involved in the Mechanism of Chronicity in Late Radiation Enteropathy? ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 44 (1): 65-71.
- Rieder F., S. P. Kessler, G. A. West, S. Bhilocha, C. de la Motte, T. M. Sadler, B. Gopalan, E. Stylianou, et C. Fiocchi. 2011. « Inflammation-Induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition: A Novel Mechanism of Intestinal Fibrosis ». *The American Journal of Pathology* 179 (5): 2660-73..
- Rijneveld A. W., S. Florquin, P. Bresser, M. Levi, V. De Waard, R. Lijnen, J. S. Van Der Zee, P. Speelman, P. Carmeliet, et T. Van Der Poll. 2003. « Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 Deficiency Does Not Influence the Outcome of Murine Pneumococcal Pneumonia ». *Blood* 102 (3): 934-39.
- Riquier H., A-C. Wera, A-C. Heuskin, O. Feron, S. Lucas, et C. Michiels. 2013. « Comparison of X-Ray and Alpha Particle Effects on a Human Cancer and Endothelial Cells: Survival Curves and Gene Expression Profiles ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 106 (3): 397-403.
- Risau, W. 1995. « Differentiation of Endothelium ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (10): 926-33.
- Robinson, S. P., C. J. Parker, et V. C. Jordan. 1990. « Preclinical Studies with Toremifene as an Antitumor Agent ». *Breast Cancer Research and Treatment* 16 Suppl (août): S9-17.
- Rømer M. U., L. Larsen, H. Offenberg, N. Brünner, et U. A. Lademann. 2008. « Plasminogen Activator Inhibitor 1 Protects Fibrosarcoma Cells from Etoposide-Induced Apoptosis through Activation of the PI3K/Akt Cell Survival Pathway ». *Neoplasia (New York, N.Y.)* 10 (10): 1083-91.
- Roninson I. B. 2003. « Tumor Cell Senescence in Cancer Treatment ». *Cancer Research* 63 (11): 2705-15.
- Ross C. C., S. L. MacLeod, J. R. Plaxco, J. W. Froude, L. M. Fink, J. Wang, W. E. Stites, et M. Hauer-Jensen. 2008. « Inactivation of Thrombomodulin by Ionizing Radiation in a Cell-Free System: Possible Implications for Radiation Responses in Vascular Endothelium ». *Radiation Research* 169 (4): 408-16.
- Rosignol P., E. Anglès-Cano, et H. Roger Lijnen. 2006. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 Impairs Plasminogen Activation-Mediated Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis ». *Thrombosis and Haemostasis* 96 (5): 665-70.
- Rosignol P., B. Ho-Tin-Noé, R. Vranckx, M-C. Bouton, O. Meilhac, H. Roger Lijnen, M-C. Guillin, J-B. Michel, et E. Anglès-Cano. 2004. « Protease Nexin-1 Inhibits Plasminogen Activation-Induced Apoptosis of Adherent Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (11): 10346-56.
- Rotolo J. A., J. G. Maj, R. Feldman, D. Ren, A. Haimovitz-Friedman, C. Cordon-Cardo, E. H.-Y. Cheng, R. Kolesnick, et Z. Fuks. 2008. « Bax and Bak Do Not Exhibit Functional Redundancy in Mediating Radiation-Induced Endothelial Apoptosis in the Intestinal Mucosa ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 70 (3): 804-15.
- Rotolo J. A., B. Stancevic, J. Zhang, G. Hua, J. Fuller, X. Yin, A. Haimovitz-Friedman. 2012. « Anti-Ceramide Antibody Prevents the Radiation Gastrointestinal Syndrome in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (5): 1786-90.
- Rubin, P., et G. W. Casarett. 1968. « Clinical Radiation Pathology as Applied to Curative Radiotherapy ». *Cancer* 22 (4): 767-78.

- Rubin, P, C J Johnston, J P Williams, S McDonald, et J N Finkelstein. 1995. « A Perpetual Cascade of Cytokines Postirradiation Leads to Pulmonary Fibrosis ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 33 (1): 99-109.
- Rubio, C. A., et M. Jalnas. 1996. « Dose-Time-Dependent Histological Changes Following Irradiation of the Small Intestine of Rats ». *Digestive Diseases and Sciences* 41 (2): 392-401.
- Sangiorgi E., et M. R. Capecchi. 2008. « Bmi1 Is Expressed in Vivo in Intestinal Stem Cells ». *Nature Genetics* 40 (7): 915-20.
- Santana, P., L. A. Peña, A. Haimovitz-Friedman, S. Martin, D. Green, M. McLoughlin, C. Cordon-Cardo, E. H. Schuchman, Z. Fuks, et R. Kolesnick. 1996. « Acid Sphingomyelinase-Deficient Human Lymphoblasts and Mice Are Defective in Radiation-Induced Apoptosis ». *Cell* 86 (2): 189-99.
- Santivasi W. L., et F. Xia. 2014. « Ionizing Radiation-Induced DNA Damage, Response, and Repair ». *Antioxidants & Redox Signaling*, février.
- Sauer, B., et N. Henderson. 1988. « The Cyclization of Linear DNA in Escherichia Coli by Site-Specific Recombination ». *Gene* 70 (2): 331-41.
- Sawdey M., T. J. Podor, et D. J. Loskutoff. 1989. « Regulation of Type 1 Plasminogen Activator Inhibitor Gene Expression in Cultured Bovine Aortic Endothelial Cells. Induction by Transforming Growth Factor-Beta, Lipopolysaccharide, and Tumor Necrosis Factor-Alpha ». *The Journal of Biological Chemistry* 264 (18): 10396-401.
- Sawdey M. S., et D. J. Loskutoff. 1991. « Regulation of Murine Type 1 Plasminogen Activator Inhibitor Gene Expression in Vivo. Tissue Specificity and Induction by Lipopolysaccharide, Tumor Necrosis Factor-Alpha, and Transforming Growth Factor-Beta ». *The Journal of Clinical Investigation* 88 (4): 1346-53.
- Schafer K., K. Müller, A. Hecke, E. Mounier, J. Goebel, D. J. Loskutoff, et S. Konstantinides. 2003. « Enhanced Thrombosis in Atherosclerosis-Prone Mice Is Associated with Increased Arterial Expression of Plasminogen Activator Inhibitor-1 ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (11): 2097-2103.
- Scharpfenecker M., B. Floot, R. Korlaar, N. S. Russell, et F. A. Stewart. 2011. « ALK1 Heterozygosity Delays Development of Late Normal Tissue Damage in the Irradiated Mouse Kidney ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 99 (3): 349-55.
- Scharpfenecker M., J. J. C. M. Kruse, D. Sprong, N. S. Russell, P. T. Dijke, et F. A. Stewart. 2009. « Ionizing Radiation Shifts the PAI-1/ID-1 Balance and Activates Notch Signaling in Endothelial Cells ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 73 (2): 506-13.
- Schilling D., C. Bayer, A. Geurts-Moespot, F. C. G. J. Sweep, M. Pruschy, K. Mengele, L. D. Sprague, et M. Molls. 2007. « Induction of Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 (PAI-1) by Hypoxia and Irradiation in Human Head and Neck Carcinoma Cell Lines ». *BMC Cancer* 7: 143.
- Schleef, R. R., D. L. Higgins, E. Pillemer, et L. J. Levitt. 1989. « Bleeding Diathesis due to Decreased Functional Activity of Type 1 Plasminogen Activator Inhibitor ». *The Journal of Clinical Investigation* 83 (5): 1747-52.
- Schneider D. J., M. Hayes, M. Wadsworth, H. Taatjes, M. Rincón, D. J. Taatjes, et B. E. Sobel. 2004. « Attenuation of Neointimal Vascular Smooth Muscle Cellularity in Atheroma by Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1) ». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 52 (8): 1091-99.
- Schneiderman, J., G. M. Bordin, I. Engelberg, R. Adar, D. Seiffert, T. Thinnes, E. F. Bernstein, R. B. Dilley, et D. J. Loskutoff. 1995. « Expression of Fibrinolytic Genes in Atherosclerotic Abdominal Aortic Aneurysm Wall. A Possible Mechanism for Aneurysm Expansion ». *The Journal of Clinical Investigation* 96 (1): 639-45.

- Schneiderman, J., M. S. Sawdey, M. R. Keeton, G. M. Bordin, E. F. Bernstein, R. B. Dilley, et D. J. Loskutoff. 1992. « Increased Type 1 Plasminogen Activator Inhibitor Gene Expression in Atherosclerotic Human Arteries ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (15): 6998-7002.
- Schuller B. W., P. J. Binns, K. J. Riley, L. Ma, M. F. Hawthorne, et J. A. Coderre. 2006. « Selective Irradiation of the Vascular Endothelium Has No Effect on the Survival of Murine Intestinal Crypt Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (10): 3787-92.
- Schuller B. W., A. B. Rogers, K. S. Cormier, K. J. Riley, P. J. Binns, R. Julius, M. F. Hawthorne, et J. A. Coderre. 2007. « No Significant Endothelial Apoptosis in the Radiation-Induced Gastrointestinal Syndrome ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 68 (1): 205-10.
- Schwenk, F., R. Kuhn, P. O. Angrand, K. Rajewsky, et A. F. Stewart. 1998. « Temporally and Spatially Regulated Somatic Mutagenesis in Mice ». *Nucleic Acids Research* 26 (6): 1427-32.
- Senoo T., N. Hattori, T. Tanimoto, M. Furonaka, N. Ishikawa, K. Fujitaka, Y. Haruta, H. Murai, A. Yokoyama, et N. Kohno. 2010. « Suppression of Plasminogen Activator Inhibitor-1 by RNA Interference Attenuates Pulmonary Fibrosis ». *Thorax* 65 (4): 334-40.
- Senzaki H., T. Kobayashi, H. Nagasaka, H. Nakano, S. Kyo, Y. Yokote, et N. Sasakid. 2003. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Patients with Kawasaki Disease: Diagnostic Value for the Prediction of Coronary Artery Lesion and Implication for a New Mode of Therapy ». *Pediatric Research* 53 (6): 983-88.
- Shao L., W. Feng, H. Li, D. Gardner, Y. Luo, Y. Wang, L. Liu, A. Meng, N. E. Sharpless, et D. Zhou. 2014. « Total Body Irradiation Causes Long-Term Mouse BM Injury via Induction of HSC Premature Senescence in an Ink4a- and Arf-Independent Manner ». *Blood* 123 (20): 3105-15.
- Shay J. W., et I. B. Roninson. 2004. « Hallmarks of Senescence in Carcinogenesis and Cancer Therapy ». *Oncogene* 23 (16): 2919-33. doi:10.1038/sj.onc.1207518.
- Sherr C. J., et F. McCormick. 2002. « The RB and p53 Pathways in Cancer ». *Cancer Cell* 2 (2): 103-12.
- Shetty S. K., Y. P. Bhandary, A. S. Marudamuthu, D. Abernathy, T. Velusamy, B. Starcher, et S. Shetty. 2012. « Regulation of Airway and Alveolar Epithelial Cell Apoptosis by p53-Induced Plasminogen Activator Inhibitor-1 during Cigarette Smoke Exposure Injury ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 47 (4): 474-83.
- Skurk, T., et H. Hauner. 2004. « Obesity and Impaired Fibrinolysis: Role of Adipose Production of Plasminogen Activator Inhibitor-1 ». *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 28 (11): 1357-64.
- Skwarchuk, M. W., et E. L. Travis. 1998. « Murine Strain Differences in the Volume Effect and Incidence of Radiation-Induced Colorectal Obstruction ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 41 (4): 889-95.
- Smith, D. F., et D. O. Toft. 1993. « Steroid Receptors and Their Associated Proteins ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 7 (1): 4-11.
- Soeda S., S. Koyanagi, Y. Kuramoto, M. Kimura, M. Oda, T. Kozako, S. Hayashida, et H. Shimeno. 2008. « Anti-Apoptotic Roles of Plasminogen Activator Inhibitor-1 as a Neurotrophic Factor in the Central Nervous System ». *Thrombosis and Haemostasis* 100 (6): 1014-20.
- Soeda S., M. Oda, T. Ochiai, et H. Shimeno. 2001. « Deficient Release of Plasminogen Activator Inhibitor-1 from Astrocytes Triggers Apoptosis in Neuronal Cells ». *Brain Research. Molecular Brain Research* 91 (1-2): 96-103.
- Soff G. A., J. Sanderowitz, S. Gately, E. Verrusio, I. Weiss, S. Brem, et H. C. Kwaan. 1995. « Expression of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 by Human Prostate Carcinoma Cells Inhibits Primary Tumor Growth, Tumor-Associated Angiogenesis, and Metastasis to Lung and Liver in an Athymic Mouse Model ». *The Journal of Clinical Investigation* 96 (6): 2593-2600.
- Soriano, P. 1999. « Generalized lacZ Expression with the ROSA26 Cre Reporter Strain ». *Nature Genetics* 21 (1): 70-71.

- Stanulis-Praeger, B. M. 1987. « Cellular Senescence Revisited: A Review ». *Mechanisms of Ageing and Development* 38 (1): 1-48.
- Stefansson, S., et D. A. Lawrence. 1996. « The Serpin PAI-1 Inhibits Cell Migration by Blocking Integrin Alpha V Beta 3 Binding to Vitronectin ». *Nature* 383 (6599): 441-43.
- Stefansson, Steingrímur, Grainne A. McMahon, Eric Petitclerc, et Daniel A. Lawrence. 2003. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Tumor Growth, Angiogenesis and Vascular Remodeling ». *Current Pharmaceutical Design* 9 (19): 1545-64.
- Stern, D. M., E. Kaiser, et P. P. Nawroth. 1988. « Regulation of the Coagulation System by Vascular Endothelial Cells ». *Haemostasis* 18 (4-6): 202-14.
- Stouffer, G. A., Z. Hu, M. Sajid, H. Li, G. Jin, M. T. Nakada, S. R. Hanson, et M. S. Runge. 1998. « Beta3 Integrins Are Upregulated after Vascular Injury and Modulate Thrombospondin- and Thrombin-Induced Proliferation of Cultured Smooth Muscle Cells ». *Circulation* 97 (9): 907-15.
- Strup-Perrot C., D. Mathé, C. Linard, D. Violot, F. Milliat, A. François, J. Bourhis, et M-C. Vozenin-Brotons. 2004. « Global Gene Expression Profiles Reveal an Increase in mRNA Levels of Collagens, MMPs, and TIMPs in Late Radiation Enteritis ». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 287 (4): G875-85.
- Strup-Perrot C., M-C. Vozenin-Brotons, M. Vandamme, M. Benderitter, et D. Mathe. 2006. « Expression and Activation of MMP -2, -3, -9, -14 Are Induced in Rat Colon after Abdominal X-Irradiation ». *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 41 (1): 60-70.
- Strup-Perrot C., M-C. Vozenin-Brotons, M. Vandamme, C. Linard, et D. Mathé. 2005. « Expression of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor Metalloproteinases Increases in X-Irradiated Rat Ileum despite the Disappearance of CD8a T Cells ». *World Journal of Gastroenterology: WJG* 11 (40): 6312-21.
- Sugiura, Y., L. Ma, B. Sun, H. Shimada, W. E. Laug, R. C. Seeger, et Y. A. DeClerck. 1999. « The Plasminogen-Plasminogen Activator (PA) System in Neuroblastoma: Role of PA Inhibitor-1 in Metastasis ». *Cancer Research* 59 (6): 1327-36.
- Swiatkowska M., J. Szymraj, et C. S. Cierniewski. 2005. « Induction of PAI-1 Expression by Tumor Necrosis Factor Alpha in Endothelial Cells Is Mediated by Its Responsive Element Located in the 4G/5G Site ». *The FEBS Journal* 272 (22): 5821-31.
- Tabernerero, M. D., A. Estellés, V. Vicente, I. Alberca, et J. Aznar. 1989. « Incidence of Increased Plasminogen Activator Inhibitor in Patients with Deep Venous Thrombosis And/or Pulmonary Embolism ». *Thrombosis Research* 56 (4): 565-70.
- Tager A. M., P. LaCamera, B. S. Shea, G. S. Campanella, M. Selman, Z. Zhao, V. Polosukhin. 2008. « The Lysophosphatidic Acid Receptor LPA1 Links Pulmonary Fibrosis to Lung Injury by Mediating Fibroblast Recruitment and Vascular Leak ». *Nature Medicine* 14 (1): 45-54.
- Takeda N., R. Jain, M. R. LeBoeuf, Q. Wang, M. M. Lu, et J. A. Epstein. 2011. « Interconversion between Intestinal Stem Cell Populations in Distinct Niches ». *Science (New York, N.Y.)* 334 (6061): 1420-24.
- Takeshita K., M. Hayashi, S. Iino, T. Kondo, Y. Inden, M. Iwase, T. Kojima. 2004. « Increased Expression of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Cardiomyocytes Contributes to Cardiac Fibrosis after Myocardial Infarction ». *The American Journal of Pathology* 164 (2): 449-56.
- Tani, T., K. Hanasawa, M. Kodama, H. Imaizumi, M. Yonekawa, M. Saito, T. Ikeda, et al. 2001. « Correlation between Plasma Endotoxin, Plasma Cytokines, and Plasminogen Activator Inhibitor-1 Activities in Septic Patients ». *World Journal of Surgery* 25 (5): 660-68.
- Tapia-Gonzalez S., P. Carrero, O. Pernia, L. M. Garcia-Segura, et Y. Diz-Chaves. 2008. « Selective Oestrogen Receptor (ER) Modulators Reduce Microglia Reactivity in Vivo after Peripheral Inflammation: Potential Role of Microglial ERs ». *The Journal of Endocrinology* 198 (1): 219-30.

- Thøgersen, A. M., J. H. Jansson, K. Boman, T. K. Nilsson, L. Weinehall, F. Huhtasaari, et G. Hallmans. 1998. « High Plasminogen Activator Inhibitor and Tissue Plasminogen Activator Levels in Plasma Precede a First Acute Myocardial Infarction in Both Men and Women: Evidence for the Fibrinolytic System as an Independent Primary Risk Factor ». *Circulation* 98 (21): 2241-47.
- Thomas, K. R., et M. R. Capecchi. 1987. « Site-Directed Mutagenesis by Gene Targeting in Mouse Embryo-Derived Stem Cells ». *Cell* 51 (3): 503-12.
- Tian H., B. Biehs, S. Warming, K. G. Leong, L. Rangell, O. D. Klein, et F. J. de Sauvage. 2011. « A Reserve Stem Cell Population in Small Intestine Renders Lgr5-Positive Cells Dispensable ». *Nature* 478 (7368): 255-59.
- Tipping, P. G., P. Davenport, M. Gallicchio, E. L. Filonzi, J. Apostolopoulos, et J. Wojta. 1993. « Atheromatous Plaque Macrophages Produce Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 and Stimulate Its Production by Endothelial Cells and Vascular Smooth Muscle Cells ». *The American Journal of Pathology* 143 (3): 875-85.
- Torres S., L. Thim, F. Milliat, M-C. Vozenin-Brotons, U. B. Olsen, I. Ahnfelt-Rønne, J. Bourhis, M. Benderitter, et A. François. 2007. « Glucagon-like Peptide-2 Improves Both Acute and Late Experimental Radiation Enteritis in the Rat ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 69 (5): 1563-71.
- Travis E. L., G. Rachakonda, X. Zhou, K. Korhonen, K. R. Sekhar, S. Biswas, et M. L. Freeman. 2011. « NRF2 Deficiency Reduces Life Span of Mice Administered Thoracic Irradiation ». *Free Radical Biology & Medicine* 51 (6): 1175-83.
- Truman J-P., M. García-Barros, M. Kaag, D. Hambarzumyan, B. Stancevic, M. Chan, Z. Fuks, R. Kolesnick, et A. Haimovitz-Friedman. 2010. « Endothelial Membrane Remodeling Is Obligate for Anti-Angiogenic Radiosensitization during Tumor Radiosurgery ». *PLoS One* 5 (9).
- Tuttolomondo A., R. Di Sciacca, D. Di Raimondo, A. Serio, G. D'Aguanno, S. La Placa, R. Pecoraro. 2009. « Plasma Levels of Inflammatory and Thrombotic/fibrinolytic Markers in Acute Ischemic Strokes: Relationship with TOAST Subtype, Outcome and Infarct Site ». *Journal of Neuroimmunology* 215 (1-2): 84-89.
- Ueno, A., K. Murakami, K. Yamanouchi, M. Watanabe, et T. Kondo. 1996. « Thrombin Stimulates Production of Interleukin-8 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells ». *Immunology* 88 (1): 76-81.
- Ulfhammer, E., P. Larsson, L. Karlsson, T. Hrafnkelsdóttir, M. Bokarewa, A. Tarkowski, et S. Jern. 2006. « TNF-Alpha Mediated Suppression of Tissue Type Plasminogen Activator Expression in Vascular Endothelial Cells Is NF-kappaB- and p38 MAPK-Dependent ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 4 (8): 1781-89. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.02035.x.
- Vande Berg J. S., M. A. Rose, P. L. Haywood-Reid, R. Rudolph, W.G. Payne, et M. C. Robson. 2005. « Cultured Pressure Ulcer Fibroblasts Show Replicative Senescence with Elevated Production of Plasmin, Plasminogen Activator Inhibitor-1, and Transforming Growth Factor-beta1 ». *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 13 (1): 76-83.
- Van De Craen B., I. Scroyen, R. Abdelnabi, E. Brouwers, H. Roger Lijnen, P. J. Declerck, et A. Gils. 2011. « Characterization of a Panel of Monoclonal Antibodies toward Mouse PAI-1 That Exert a Significant Profibrinolytic Effect in Vivo ». *Thrombosis Research* 128 (1): 68-76.
- Van Landeghem L., M. A. Santoro, A. E. Krebs, A. T. Mah, J.J. Dehmer, A. D. Gracz, B. P. Scull, K. McNaughton, S. T. Magness, et P. K. Lund. 2012. « Activation of Two Distinct Sox9-EGFP-Expressing Intestinal Stem Cell Populations during Crypt Regeneration after Irradiation ». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 302 (10): G1111-32.
- Van Rooijen, N. 1989. « The Liposome-Mediated Macrophage "Suicide" Technique ». *Journal of Immunological Methods* 124 (1): 1-6.
- Vaughan, D. E. 2001. « Angiotensin, Fibrinolysis, and Vascular Homeostasis ». *The American Journal of Cardiology* 87 (8A): 18C - 24C.
- Vaughan D E. 2005. « PAI-1 and Atherothrombosis ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 3 (8): 1879-83.

- Verheij, M., et H Bartelink. 2000. « Radiation-Induced Apoptosis ». *Cell and Tissue Research* 301 (1): 133-42.
- Verheij, M., R. Bose, X. H. Lin, B. Yao, W. D. Jarvis, S. Grant, M. J. Birrer, et al. 1996. « Requirement for Ceramide-Initiated SAPK/JNK Signalling in Stress-Induced Apoptosis ». *Nature* 380 (6569): 75-79.
- Verrecchia, F., M. L. Chu, et A. Mauviel. 2001. « Identification of Novel TGF-Beta /Smad Gene Targets in Dermal Fibroblasts Using a Combined cDNA Microarray/promoter Transactivation Approach ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (20): 17058-62.
- Vidal O., A. Soriano-Izquierdo, M. Pera, J. I. Elizalde, A. Palacín, A. Castells, J. M. Piqué, A. Volant, et J. P. Metges. 2008. « Positive VEGF Immunostaining Independently Predicts Poor Prognosis in Curatively Resected Gastric Cancer Patients: Results of a Study Assessing a Panel of Angiogenic Markers ». *Journal of Gastrointestinal Surgery: Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 12 (6): 1005-14.
- Vivien D., et C. Ali. 2012. « Traumatic Brain Injury: Tissue-Type Plasminogen Activator--Harmful or Beneficial? ». *Nature Reviews. Neurology* 8 (10): 538-39.
- Voswinkel J., S. Francois, J-M. Simon, M. Benderitter, N-C. Gorin, M. Mohty, L. Fouillard, et A. Chapel. 2013. « Use of Mesenchymal Stem Cells (MSC) in Chronic Inflammatory Fistulizing and Fibrotic Diseases: A Comprehensive Review ». *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 45 (2): 180-92.
- Vozenin-Brotons M-C., F. Milliat, C. Linard, C. Strup, A. François, J-C. Sabourin, P. Lasser. 2004. « Gene Expression Profile in Human Late Radiation Enteritis Obtained by High-Density cDNA Array Hybridization ». *Radiation Research* 161 (3): 299-311.
- Vozenin-Brotons M-C., F. Milliat, J-C. Sabourin, A. C. de Gouville, A. François, P. Lasser, P. Morice. 2003. « Fibrogenic Signals in Patients with Radiation Enteritis Are Associated with Increased Connective Tissue Growth Factor Expression ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 56 (2): 561-72.
- Wallez Y., et P. Huber. 2008. « Endothelial Adherens and Tight Junctions in Vascular Homeostasis, Inflammation and Angiogenesis ». *Biochimica and Biophysica Acta* 1778 (3): 794-809.
- Wang, Hongtao, Yan Zhang, et Robert O Heuckeroth. 2007. « PAI-1 Deficiency Reduces Liver Fibrosis after Bile Duct Ligation in Mice through Activation of tPA ». *FEBS Letters* 581 (16): 3098-3104.
- Wang J, C. M. Albertson, H. Zheng, L. M. Fink, J-M. Herbert, et M. Hauer-Jensen. 2002. « Short-Term Inhibition of ADP-Induced Platelet Aggregation by Clopidogrel Ameliorates Radiation-Induced Toxicity in Rat Small Intestine ». *Thrombosis and Haemostasis* 87 (1): 122-28.
- Wang J., A. Kulkarni, M. Chintala, L. M. Fink, et M. Hauer-Jensen. 2013. « Inhibition of Protease-Activated Receptor 1 Ameliorates Intestinal Radiation Mucositis in a Preclinical Rat Model ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 85 (1): 208-14.
- Wang J., H. Zheng, X. Ou, L. M. Fink, et M. Hauer-Jensen. 2002. « 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 ». *The American Journal of Pathology* 160 (6): 2063-72.
- Wang J., H. Zheng, et M. Hauer-Jensen. 2001. « Influence of Short-Term Octreotide Administration on Chronic Tissue Injury, Transforming Growth Factor Beta (TGF-Beta) Overexpression, and Collagen Accumulation in Irradiated Rat Intestine ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 297 (1): 35-42.
- Wang J., H. Zheng, X. Ou, C. M. Albertson, L. M. Fink, J.-M. Herbert, et M. Hauer-Jensen. 2004. « Hirudin Ameliorates Intestinal Radiation Toxicity in the Rat: Support for Thrombin Inhibition as Strategy to Minimize Side-Effects after Radiation Therapy and as Countermeasure against Radiation Exposure ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 2 (11): 2027-35.
- Wang S., Y. Lee, J. Kim, J. Hyun, K. Lee, Y. Kim, et Y. Jung. 2013. « Potential Role of Hedgehog Pathway in Liver Response to Radiation ». *PloS One* 8 (9): e74141.

- Wan Y-Z., P. Gao, S. Zhou, Z-Q. Zhang, D-L. Hao, L-S. Lian, Y-J. Li, H-Z. Chen, et D-P. Liu. 2014. « SIRT1-Mediated Epigenetic Downregulation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Prevents Vascular Endothelial Replicative Senescence ». *Aging Cell* 13 (5): 890-99.
- Watanabe N., K. Ikuta, K. Okazaki, H. Nakase, Y. Tabata, M. Matsuura, H. Tamaki, C. Kawanami, T. Honjo, et T. Chiba. 2003. « Elimination of Local Macrophages in Intestine Prevents Chronic Colitis in Interleukin-10-Deficient Mice ». *Digestive Diseases and Sciences* 48 (2): 408-14.
- Weisberg S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel, et A. W. Ferrante. 2003. « Obesity Is Associated with Macrophage Accumulation in Adipose Tissue ». *The Journal of Clinical Investigation* 112 (12): 1796-1808.
- Wu J, L. Peng, G. A. McMahon, D. A. Lawrence, et W. P. Fay. 2009. « Recombinant Plasminogen Activator Inhibitor-1 Inhibits Intimal Hyperplasia ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29 (10): 1565-70. doi:10.1161/ATVBAHA.109.189514.
- Wu, W. M., J. L. Suen, B. F. Lin, et B. L. Chiang. 2000. « Tamoxifen Alleviates Disease Severity and Decreases Double Negative T Cells in Autoimmune MRL-Lpr/lpr Mice ». *Immunology* 100 (1): 110-18.
- Wynn T. A. 2004. « Fibrotic Disease and the T(H)1/T(H)2 Paradigm ». *Nature Reviews. Immunology* 4 (8): 583-94.
- Xiang G., M. D. Schuster, T. Seki, P. Witkowski, S. Eshghi, et S. Itescu. 2005. « Downregulated Expression of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Augments Myocardial Neovascularization and Reduces Cardiomyocyte Apoptosis after Acute Myocardial Infarction ». *Journal of the American College of Cardiology* 46 (3): 536-41.
- Xu Y., J. Hagege, B. Mougenot, J. D. Sraer, E. Rønne, et E. Rondeau. 1996. « Different Expression of the Plasminogen Activation System in Renal Thrombotic Microangiopathy and the Normal Human Kidney ». *Kidney International* 50 (6): 2011-19.
- Xu Z., F. J. Castellino, et V. A. Ploplis. 2010. « Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Is Cardioprotective in Mice by Maintaining Microvascular Integrity and Cardiac Architecture ». *Blood* 115 (10): 2038-47.
- Yamamoto K., K. Takeshita, T. Kojima, J. Takamatsu, et H. Saito. 2005a. « Aging and Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Regulation: Implication in the Pathogenesis of Thrombotic Disorders in the Elderly ». *Cardiovascular Research* 66 (2): 276-85.
- Yamamoto K., Takeshita K., Kojima T., Takamatsu J., Saito H. 2005. « Aging and Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Regulation: Implication in the Pathogenesis of Thrombotic Disorders in the Elderly ». *Cardiovascular Research* 66 (2): 276-85.
- Yamamoto T., N. A. Noble, A. H. Cohen, C. C. Nast, A. Hishida, L. I. Gold, et W. A. Border. 1996. « Expression of Transforming Growth Factor-Beta Isoforms in Human Glomerular Diseases ». *Kidney International* 49 (2): 461-69.
- Yamashita J., H. Itoh, M. Hirashima, M. Ogawa, S. Nishikawa, T. Yurugi, M. Naito, K. Nakao, et S. Nishikawa. 2000. « Flk1-Positive Cells Derived from Embryonic Stem Cells Serve as Vascular Progenitors ». *Nature* 408 (6808): 92-96.
- Yan K. S., L. A. Chia, X. Li, A. Ootani, J. Su, J. Y. Lee, N. Su. 2012. « The Intestinal Stem Cell Markers *Bmi1* and *Lgr5* Identify Two Functionally Distinct Populations ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (2): 466-71.
- Yuksel M., K. Okajima, M. Uchiba, S. Horiuchi, et H. Okabe. 2002. « Activated Protein C Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Tumor Necrosis Factor-Alpha Production by Inhibiting Activation of Both Nuclear Factor-Kappa B and Activator Protein-1 in Human Monocytes ». *Thrombosis and Haemostasis* 88 (2): 267-73.
- Zhang A. Y., F. Yi, S. Jin, M. Xia, Q-Z. Chen, E. Gulbins, et P-L. Li. 2007. « Acid Sphingomyelinase and Its Redox Amplification in Formation of Lipid Raft Redox Signaling Platforms in Endothelial Cells ». *Antioxidants & Redox Signaling* 9 (7): 817-28.
- Zhang W. J., J. Wojta, et B. R. Binder. 1997. « Notoginsenoside R1 Counteracts Endotoxin-Induced Activation of Endothelial Cells in Vitro and Endotoxin-Induced Lethality in Mice in Vivo ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17 (3): 465-74.

- Zhang Y-P., W-B. Li, W-L. Wang, J. Liu, S-X. Song, L-L. Bai, Y-Y. Hu, Y-D. Yuan, et M. Zhang. 2012. « siRNA against Plasminogen Activator Inhibitor-1 Ameliorates Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Rats ». *Acta Pharmacologica Sinica* 33 (7): 897-908.
- Zhang Y., C. Riesterer, A. M. Ayral, F. Sablitzky, T. D. Littlewood, et M. Reth. 1996. « Inducible Site-Directed Recombination in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Nucleic Acids Research* 24 (4): 543-48.
- Zhao R., S. Ren, M. H. Moghadasain, J. D. Rempel, et G. X. Shen. 2014. « Involvement of Fibrinolytic Regulators in Adhesion of Monocytes to Vascular Endothelial Cells Induced by Glycated LDL and to Aorta from Diabetic Mice ». *Journal of Leukocyte Biology* 95 (6): 941-49.
- Zhao W., D. R. Spitz, L. W. Oberley, et M. E. Robbins. 2001. « Redox Modulation of the pro-Fibrogenic Mediator Plasminogen Activator Inhibitor-1 Following Ionizing Radiation ». *Cancer Research* 61 (14): 5537-43.
- Zheng, H, J Wang, V E Koteliansky, P J Gotwals, et M Hauer-Jensen. 2000. « Recombinant Soluble Transforming Growth Factor Beta Type II Receptor Ameliorates Radiation Enteropathy in Mice ». *Gastroenterology* 119 (5): 1286-96.
- Zhou A., J. A. Huntington, N. S. Pannu, R. W. Carrell, et R. J. Read. 2003. « How Vitronectin Binds PAI-1 to Modulate Fibrinolysis and Cell Migration ». *Nature Structural Biology* 10 (7): 541-44.
- Zhu M., V. M. Gokhale, L. Szabo, R. M. Munoz, H. Baek, S. Bashyam, L. H. Hurley, D. D. Von Hoff, et H. Han. 2007. « Identification of a Novel Inhibitor of Urokinase-Type Plasminogen Activator ». *Molecular Cancer Therapeutics* 6 (4): 1348-56.
- Zmijewski J. W., H-B. Bae, J. S. Deshane, C. B. Peterson, D. D. Chaplin, et E. Abraham. 2011. « Inhibition of Neutrophil Apoptosis by PAI-1 ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 301 (2): L247-54.
- Zorio E., J. Gilabert-Estellés, F. España, L. A. Ramón, R. Cosín, et A. Estellés. 2008. « Fibrinolysis: The Key to New Pathogenetic Mechanisms ». *Current Medicinal Chemistry* 15 (9): 923-29.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 :	Les effets cellulaires des rayonnements ionisants.....	p16
Figure 2 :	La balance bénéfique/risque en radiothérapie.....	p21
Figure 3 :	Evolution conceptuelle de la pathogénèse des lésions intestinales radio-induite.....	p24
Figure 4 :	Structure de l'intestin.....	p66
Figure 5 :	Organisation de l'épithélium en zones fonctionnelles et proliférantes.....	p28
Figure 6 :	Les techniques d'irradiation localisée de l'intestin grêle chez l'animal.....	p31
Figure 7 :	Lésions radio-induite au niveau de l'intestin grêle chez la souris.....	p32
Figure 8 :	Représentation schématique des voies de signalisation initiées par p53.....	p36
Figure 9 :	Recolonisation de l'épithélium après irradiation par les cellules souches.....	p38
Figure 10 :	Voies de signalisation impliquées dans la fibrose radique.....	p42
Figure 11 :	Organisation des différents types de vaisseaux sanguins.....	p45
Figure 12 :	Vascularisation de l'intestin.....	p46
Figure 13 :	Représentation schématique des principales fonctions de l'endothélium.....	p47
Figure 14 :	Implication des céramides dans l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales ...	p50
Figure 15 :	Activation radio-induite de l'endothélium et recrutement des leucocytes.....	p53
Figure 16 :	Représentation schématique de la perte de la thromborésistance radio-induit.....	p57
Figure 17 :	Implication des cellules endothéliales dans la chronicité de l'entérite radique.....	p63
Figure 18 :	Structure tridimensionnelle de PAI-1.....	p65
Figure 19 :	Représentation schématique du promoteur du gène SERPINE1.....	p67
Figure 20 :	Rôle de PAI-1 dans le maintien de l'homéostasie vasculaire.....	p68
Figure 21 :	Implication de PAI-1 dans le processus de mort cellulaire.....	p73

Figure 22 : Interactions moléculaires impliquées dans la régulation de l'adhésion et de la migration cellulaire par PAI-1	p76
Figure 23 : Modèle de migration des macrophages dans un contexte inflammatoire.....	p78
Figure 24 : Les voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la senescence.....	p80
Figure 25 : Régulation transcriptionnelle de PAI-1 au cours du processus de senescence.....	p82
Figure 26 : Implication de PAI-1 dans la régulation du processus de senescence.....	p85
Figure 27 : Représentation schématique de l'implication de PAI-1 dans différentes pathologies...	p98
Figure 28 : Visualisation de la surexpression radio-induite de PAI-1 au niveau de l'endothélium par immunohistochimie.....	p99
Figure 29 : Résumé de l'implication de PAI-1 sur différents paramètres de l'entérite radique, mis en évidence par l'utilisation de souris PAI-1 $-/-$	p102
Figure 30 : Perspective expérimentale permettant de tester le rôle de PAI-1 dans l'adhésion radio-induite des monocytes sur les cellules endothéliale.....	p161
Figure 31 : Perspective expérimentale permettant de tester l'hypothèse d'un rôle direct de PAI-1 dans la polarisation des macrophages.....	p164
Figure 32 : Perspectives expérimentales permettant de discriminer les liens de causes à effets entre l'infiltrat de macrophages et la sévérité des lésions.....	p165
Figure 33 : Perspectives expérimentales visant à étudier le rôle potentiel d'uPA dans les bénéfices liés à l'inhibition de SERPINE1	p171
Figure 34 : Structure de la Cre recombinase et des séquences LoxP.....	p176
Figure 35 : Mécanisme de recombinaison des séquences LoxP par la Cre.....	p177
Figure 36 : Démonstration <i>in vitro</i> de la fonctionnalité du système CreLox.....	p178
Figure 37 : Mécanisme d'activation de la CreERT2 par le 4-hydroxytamoxifène.....	p180
Figure 38 : Effets de la Cre sur le locus ROSA26R des souris reportrices.....	p183
Figure 39 : Evènements de recombinaison chez les souris VE-Cad-Cre adultes.....	p187

Figure 40 : Evènements de recombinaison induits par le 4OHT chez les souris	
VE-Cad-CreERT2 adultes.....	p189
Figure 41 : Structure du transgène inséré dans le vecteur cible.....	p192
Figure 42 : Sélection des cellules ES recombinantes par une double approche	
PCR/Southern-blot.....	p192
Figure 43 : Obtention de souris chimères puis hétérozygotes pour le locus recombiné	
SERPINE1.....	p193
Figure 44 : Excision de la cassette néomycine <i>in vivo</i>	p194
Figure 45 : Obtention des souris PAI-1 ^{flx/flx}	p194
Figure 46 : Stratégie de croisement permettant l'obtention de souris PAI-1 KO ^{endo}	p195
Figure 47 : Stratégie de croisement permettant l'obtention de souris PAI-1 KO ^{endo(i)}	p196

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales caractéristiques des rayons ionisants.....	p14
Tableau 2 : Les principaux organes à risques en radiothérapie et les complications cliniques associées.....	p19
Tableau 3 : Score de toxicité des dommages radio-induits aux tissus sains	p20
Tableau 4 : Composants du SMS, mis en évidence <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	p78
Tableau 5 : Voies de signalisation impliquées dans la surexpression de PAI-1 par différents stimuli pro-inflammatoires exogènes.....	p88
Tableau 6 : Caractéristiques de quelques lignées Cre parmi les plus courantes.....	p182
Tableau 7 : Caractéristiques des principales lignées Cre endothélium spécifiques.....	p186
Tableau 8 : Caractéristiques des principales lignées CreERT2 spécifiques de l'endothélium.....	p190

LISTE DES ABBREVIATIONS

<i>3D-CRT</i>	3D Conformal Radiation Therapy
<i>ADN</i>	Acide Désoxyribo Nucléique
<i>ALK5</i>	Activin-Like Kinase 5
<i>APC</i>	Activated Protein C
<i>ASMase</i>	Acid SphingoMyelinase
<i>ATLR</i>	Average Telomere Lengh Ratio
<i>AVC</i>	Accident Vasculaire Cérébral
<i>BAEC</i>	Bovine Aortic Endothelial Cell
<i>b-FGF</i>	basic-Fibroblast Growth Factor
<i>Bmi1</i>	B lymphoma Mo-MLV Insertion region 1 homolog
<i>BMMNC</i>	Bone Marrow MonoNuclear Cells
<i>Bq</i>	Becquerel
<i>CBC</i>	Crypt-Based columnar Cells
<i>CCL5</i>	C-C motif Ligand 5
<i>CDK</i>	Cycline-Dependant Kinase
<i>CIVD</i>	Coagulation IntraVasculaire Disséminée
<i>CML</i>	Cellule Musculaire Lisse
<i>CMLV</i>	Cellules Musculaires Lisses Vasculaires
<i>CMV</i>	CytoMégaloVirus
<i>CNP</i>	C-type Natriuretic Peptide
<i>Cre</i>	Cyclization REcombinase
<i>CRP</i>	Ceramide Rich Platform
<i>CTGF</i>	Connective Tissue Growth Factor
<i>DSS</i>	Dextran Sulfate Sodium
<i>eNOS</i>	endothelial NO Synthase
<i>ES cells</i>	Embryonic Stem cells
<i>FDP</i>	Fibrin Degradation Product
<i>FGF2</i>	Fibroblast Growth Factor-2
<i>FLP</i>	FLiPpase
<i>FRT</i>	Flippase Recognition Target
<i>GLP-2</i>	Glucagon-Like Peptide-2

<i>GlyLDL</i>	Glycated Low Density Lipoprotein
<i>GMP</i>	Granulocyte Marker Proteins
<i>Gy</i>	Gray
<i>HBMEC</i>	Human Brain Microvascular Endothelial Cell
<i>HGF</i>	Hepatocyte Growth Factor
<i>HIMEC</i>	Human Intestinal Microvascular Endothelial Cell
<i>Hopx</i>	HomeOdomain-containing Protein
<i>HR</i>	Homologous Recombination
<i>IBD</i>	Inflammatory Bowel Disease
<i>ICAM-1</i>	Intercellular Cell Adhesion Molecule-1
<i>ICAT</i>	Isotope Coded Affinity Tag
<i>IGF</i>	Insulin Growth Factor
<i>IGFBP3</i>	Insulin Growth Factor-Binding Protein 3
<i>IGFR</i>	Insulin Growth Factor Receptor
<i>ILx</i>	InterLeukine x
<i>IMC</i>	Indice de Masse Corporelle
<i>IMRT</i>	Intensity-Modulated Radiation Therapy
<i>IMSR</i>	International Mouse Strain Resource
<i>L3R</i>	Laboratoire de Recherche en Radiobiologie et Radiopathologie
<i>L_B</i>	Lymphocyte B
<i>L_B</i>	Lymphocytes B
<i>LBD</i>	Ligand Binding Domain
<i>Lgr5</i>	Leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled Receptor 5
<i>LoxP</i>	Locus of crossing-over X of P1
<i>LPS</i>	LipoPolySaccharide
<i>LRC</i>	Label-Retaining Cells
<i>Lrig</i>	Leucine-Rich repeats and ImmunoGlobulin-like domains 1
<i>LRP-1</i>	Lipoprotein Receptor-related Protein-1
<i>L_T</i>	Lymphocyte T
<i>Mac-1</i>	MACrophage-1 antigen
<i>MCP-1</i>	Monocyte Chemotactic Protein-1
<i>MEC</i>	Matrice ExtraCellulaire
<i>MT-1</i>	MetalloThionein-1

<i>mTERT</i>	mouse TElomerase Reverse Transcriptase
<i>NHEJ</i>	NonHomologous End-Joining
<i>PAI-1</i>	Plasminogen Activator Inhibitor-type 1
<i>PDGF</i>	Platelet-Derived Growth Factor
<i>PECAM-1</i>	Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
<i>pRB</i>	protéines du RétinoBlastome
<i>PTK6</i>	Protein Tyrosine Kinase 6
<i>PUMA</i>	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
<i>RCL</i>	Reactive Center Loop
<i>ROS</i>	Reactive Oxygen Species
<i>RXR</i>	Retinoïd X Receptor
<i>SASP</i>	Senescence-Associated Secretory Phenotype
<i>SERPIN</i>	Serine Protease Inhibitor
<i>SGI</i>	Syndrome Gastro-Intestinal
<i>shRNA</i>	short hairpin RNA
<i>siRNA</i>	small interferant RNA
<i>SMS</i>	Senescence Messaging Secretome
<i>Sv</i>	Sievert
<i>TAFI</i>	Thrombin-Activable Fibrinolysis Inhibitor
<i>TBI</i>	Total Body Irradiation
<i>TGF-β1</i>	Transforming Growth Factor- β1
<i>TM</i>	Thrombomoduline
<i>t-PA</i>	tissue-type Plasminogen Activator
<i>tTA</i>	tetracycline-responsive TransActivator
<i>u-PA</i>	urokinase-type Plasminogen Activator
<i>VCAM-1</i>	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
<i>VE-Cad</i>	VE-Cadherin
<i>VE-Cadherin</i>	Vascular Endothelial-Cadherin
<i>VEGF</i>	Vascular Endothelial Growth Factor
<i>VN</i>	Vitronectine
<i>α-SMA</i>	α-Smooth Muscle Actin

Les lésions radiques aux tissus sains représentent un réel problème de santé publique, puisqu'elles constituent l'un des principaux facteurs limitants des traitements radiothérapeutiques. Cette problématique figure par ailleurs au cœur du plan Cancer 2014-2017, et implique notamment la recherche clinique. Les concepts qui entourent le développement des lésions radiques ont progressivement évolués vers une vision contemporaine et intégrée de la pathogénèse, qui implique l'ensemble des compartiments qui composent le tissu cible. Parmi eux, l'endothélium semble tenir une place centrale dans la séquence d'évènements interdépendants qui conduisent au développement des lésions radiques, bien que les éléments concrets qui étayent ce concept soient rares. Grâce à l'utilisation de nouveaux modèles murins transgéniques, ce travail de thèse fournit la démonstration directe d'un continuum endothélium-dépendant dans l'évolution des lésions intestinales radiques. En effet, la modification du phénotype endothélial grâce à la délétion ciblée du gène SERPINE1, choisi du fait de son rôle clé dans le développement de l'entérite radique, influence différents paramètres du développement de la pathologie. Ainsi, l'absence de sécrétion de PAI-1 par les cellules endothéliales améliore significativement la survie des animaux, et limite la sévérité des atteintes tissulaires précoces et tardives après irradiation localisée du grêle. En outre, ces souris partiellement déficientes pour PAI-1 présentent une diminution du nombre de cellules intestinales apoptotiques dans les heures qui suivent l'irradiation, de la densité de l'infiltrat de macrophages une semaine après irradiation, ainsi qu'une modification de la polarisation de ces macrophages tout au long du processus physiopathologique. Dans une volonté de protéger les tissus sains des effets secondaires de la radiothérapie sans entraver le traitement anti-cancéreux, l'intérêt de PAI-1 comme cible thérapeutique laisse peu de place aux doutes. De manière conceptuelle, ces travaux représentent la démonstration directe de l'existence d'un lien entre le phénotype endothélial et la pathogénèse de l'entérite radique.

Mots clés : PAI-1, endothélium, entérite radique, macrophages, inflammation, système CreLox

Radiation-induced injury to healthy tissues is a real public health problem, since they are one of the most limiting factors that restrict efficiency of radiation therapy. This problematic is also part of the French Cancer Plan 2014-2017, and involves clinical research. Concepts surrounding the development of radiation-induced damage have gradually evolved into a contemporary and integrated view of the pathogenesis, involving all compartments of target tissue. Among them, endothelium seems to be central in the sequence of interrelated events that lead to the development of radiation-induced damage, although there are rare concrete elements that support this concept. By using new transgenic mouse models, this PhD project provides a direct demonstration of an endothelium-dependent continuum in evolution of radiation-induced intestinal damage. Indeed, changes in the endothelial phenotype through targeted deletion of the gene SERPINE1, chosen because of its key role in the development of radiation enteritis, influences various parameters of the development of the disease. Thus, lack of PAI-1 secretion by endothelial cells significantly improves survival of the animals, and limits severity of early and late tissue damage after a localized small bowel irradiation. Furthermore, these mice partially KO for PAI-1 showed a decrease in the number of apoptotic intestinal stem cells in the hours following irradiation, a decrease in the macrophages infiltrate density one week after irradiation, and a change in the polarization of macrophages throughout the pathophysiological process. In an effort to protect healthy tissues from radiation therapy side effects, without hindering the cancer treatment, PAI-1 seems to be an obvious therapeutic target. Conceptually, this work represents the direct demonstration of the link between endothelium phenotype and radiation enteritis pathogenesis.

Keywords : PAI-1, endothelium, radiation enteropathy, macrophages, inflammation, CreLox system