



**HAL**  
open science

# Changements phénotypiques des cellules endothéliales irradiées au cours du développement des lésions radiques pulmonaires

Jeremy Lavigne

► **To cite this version:**

Jeremy Lavigne. Changements phénotypiques des cellules endothéliales irradiées au cours du développement des lésions radiques pulmonaires. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066308 . tel-01721440

**HAL Id: tel-01721440**

**<https://theses.hal.science/tel-01721440>**

Submitted on 2 Mar 2018

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

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

# Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale 394 : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

*IRSN/PSE-SANTE/SERAMED/ Laboratoire de Radiobiologie Médicale*

## **Changements phénotypiques des cellules endothéliales irradiées au cours du développement des lésions radiques pulmonaires**

Présentée par

**Jérémy LAVIGNE**

Thèse de doctorat de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Dirigée par le Docteur Agnès FRANCOIS

Présentée et soutenue publiquement le 16 octobre 2017

Devant un jury composé de :

Professeur Laurence BODINEAU

Docteur Keren BORENSZTAJN

Professeur Pierre VERRELLE

Docteur Isabelle CORRE

Professeur Benoit PAQUETTE

Docteur Agnès FRANCOIS

Présidente

Rapporteuse

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directeur de thèse

*A los de qui cau.*

## Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier chacun des membres du jury pour avoir accepté de prendre le temps d'évaluer le travail issu de ces trois années. Merci donc au Professeur **Laurence Bodineau** d'avoir accepté de présider ce jury, au Docteur **Keren Borensztajn** et au Professeur **Pierre Verrelle** d'avoir accepté d'en être les rapporteurs ainsi qu'au Docteur **Isabelle Corre** et au Professeur **Benoit Paquette** d'avoir accepté d'en être les examinateurs.

Un immense merci ensuite à ma Directrice de thèse, **Agnès**. Merci beaucoup de m'avoir accordé ta confiance là où d'autres se seraient arrêtés à quelques notes sur un bulletin scolaire. Merci d'avoir cru en mes capacités et de m'avoir permis de réaliser cette thèse, atteignant ainsi l'objectif que je m'étais fixé il y a de ça des années. Ça a été un réel plaisir que de travailler avec toi au quotidien, merci pour ton aide, tes conseils, ton soutien, ta disponibilité, ta bonne humeur et ta grande gentillesse. Ces trois années auront été un réel plaisir ! Merci également de m'avoir encouragé dans mon envie de participer aux concours de vulgarisation scientifique. D'ailleurs, bonne chance pour la première édition de ce nouveau concours « Mon thésard en trois minutes » ! Je compte sur toi ! Ah, et au prochain CIRFA n'hésites pas à raconter la fameuse histoire traitant de Piña colada et de charentaises, il n'y a pas de raison que je sois le seul à me retrouver à parler de trompette dans mes présentations... (Non, Fred, Annaïg, Mariam ne me remerciez pas, c'est de bon cœur !)

Pour continuer, un sincère merci à notre chef de laboratoire, **Fabien**. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité, pour tout ce que tu fais au quotidien pour les gens qui travaillent avec toi. Merci de mener cette équipe avec humanité, respect, altruisme, fraternité et... Humour ! Merci pour ton aide et tes nombreux conseils avisés en réunion et en dehors ! Comme Agnès merci de m'avoir soutenu dès le premier jour pour que je puisse réaliser cette thèse ainsi que dans mon envie de la valoriser autrement que simplement via la paillasse. A ce propos, ne m'en veux pas de ne pas avoir approfondi ton idée de « radiothérapie bio ». Honnêtement les super-héros ça me paraissait un peu plus fun à présenter... Mais je note l'effort de brainstorming !

En parlant de brainstorming, merci à **Olivier** dont les capacités de réflexion sont aussi utiles en réunion à propos d'une manip que dans la recherche d'un nom d'équipe pour les Estivales. Merci pour ta gentillesse, ta rigueur scientifique et tes remarques toujours pertinentes ! Merci à mon confrère sudiste **Vincent**. Merci pour ta gentillesse, ton humour et

ta générosité (à grands coups de nougat et de Toblerone) ! Je compte sur toi pour continuer à faire vivre l'esprit du Sud-Ouest même après mon départ ! Il faut d'ailleurs qu'on aille partager la sangria un de ces jours ! (Et si un jour ils arrivent à te déguiser pour les Estivales j'exige qu'on me transmette les photos, ça serait collector...) Merci également à **Céline**. Merci pour ta gentillesse, tes conseils et ta bonne humeur communicative ! Merci à **Valérie** et **Georges**. Ahlalala, même sur cette page impossible de vous dissocier ! Un TRES grand merci à vous deux pour vos nombreux conseils, votre disponibilité perpétuelle, votre immense gentillesse, et tous ces fous rires partagés à votre bureau ou en manip ! Je ne compte plus le nombre de fois où je vous ai sollicité durant ces trois ans et vous avez toujours fait de votre mieux (et souvent ce qu'il fallait !) pour m'aider. Si j'osais, je dirais presque que vous êtes les mascottes du labo. Oh et puis soyons fous, j'ose le dire ! Merci encore pour tout et restez comme vous êtes !

Merci également à **Laurence Hamard** et **Iman Momken** de l'Université d'Evry-Val d'Essonne pour avoir accepté de collaborer avec nous et de nous prêter un de leurs tapis de course pour rongeurs.

Viens ensuite le tour de mes partenaires de galère ! **Emilie**, comment te définir en quelques mots... Tu es folle, je crois que c'est ce qui te résume le mieux ! Mais c'est bien parfois d'avoir des gens un peu fous à ses côtés ! Tu es une fille adorable et j'ai beaucoup apprécié les quelques mois pendant lesquels on s'est côtoyé au labo, sans compter les repas et soirées. Une chose est sûre, depuis ton départ je ne me suis plus approché d'un rouleau de Scotch à moins de dix mètres ! **Elodie**, ah sacrée Elo ! Merci pour ton naturel quelle que soit la situation, ça aura quand-même été à l'origine de pas mal de fous rires... Tu es une fille super et ça aura été un grand plaisir d'être ton voisin pendant ces trois ans. Si ça peut te rassurer j'ai appliqué et restitué avec minutie tes célèbres techniques de coulage de gels d'agarose. N'aie pas peur la relève est assurée ! Ah et au fait quand parfois tu gagnais lors des soirées jeux de société c'est parce que je te laissais faire ! (Comment ça je suis un mauvais perdant ?!) **Cyprien**, puits de connaissances et modèle de raffinement ! Merci pour ta bonne humeur à toute épreuve et ta douce folie qui nous a tant fait rire ! Merci également pour tes nombreux conseils divers et variés ! Bon par contre j'espère que tu réalises le nombre incroyable d'heures que tu nous as fait perdre en découpant tes pamplemousses quartier par quartier, hein ?! Heureusement qu'on ne pointait pas encore à l'époque ! **Benoit**, notre thésard d'adoption au L3R. Pour toi aussi que dire en seulement quelques mots... Merci pour ton humour si « délicat » et « raffiné » qui nous aura tant fait rire ! Derrière tes coups de gueules

et ta rudesse apparente se cache en réalité un mec avec le cœur sur la main. Merci donc pour ta générosité et ton altruisme, sans oublier tes nombreuses odes à ma gloire et tes fameux montages photo me définissant si bien ! **Frédéric**, sous certains aspects tu pourrais presque être mon double ! Merci pour ces nombreuses discussions de geeks, ces délires et ces nombreuses chansons françaises entonnées en chœur (mais j'entends siffler le train, mais j'entends siffler le train...) ! Bon courage pour cette dernière année, je ne me fais pas de soucis pour toi, tu vas gérer ! **Mariam**, après un stage de M2 où tu étais assez réservée, tu t'es bien lâchée depuis le début de la thèse et ça fait plaisir à voir ! Merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur ! Tu es une fille très sympa et ça aura été fort amusant de te taquiner ces derniers mois ! Je te souhaite de faire une super thèse, je suis certain que ça va bien se passer ! **Annaïg**, la miss 2000 Volts de l'équipe ! Merci de nous apporter ton dynamisme au quotidien ! Toi aussi, pour peu que tu arrives à canaliser toute cette énergie débordante, tu as toutes les qualités pour réussir ! Je n'oublie pas non plus les postdocs qui ont participé à cette formidable aventure ! **Fanny**, la touche japonisante du labo. Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur communicative et ton humour qui a égayé nombre de nos repas ! **Sonia**, merci pour ta gentillesse et tes conseils sur les Caraïbes ! **Jérémy C**, mon homologue. Merci pour ta grande gentillesse, ton aide, tes conseils et tes délires. Merci également d'avoir été l'une des rares personnes avec qui j'ai pu parler football ! Ça faisait du bien ! T'es un mec super sympa et je te souhaite le meilleur pour la suite ! Enfin, j'ai une pensée pour les stagiaires qui nous ont rejoints le temps de quelques semaines ou mois dans cette épopée ! **Christine K**, merci pour ta joie de vivre quotidienne ! L'une des rares personnes que j'ai toujours vue à son avantage sur les photos des attractions du parc Astérix ! **Cyrielle**, ma stagiaire de stagiaire. Merci pour ta bonne humeur perpétuelle, ton autodérision et ton humour ! Mine de rien te taquiner m'a bien aidé à me changer les idées pendant cette période peu drôle de rédaction ! Bonne continuation dans le Sud (en voilà une bonne idée !) ! **Cory**, merci pour ta gentillesse et merci pour toutes ces chouquettes et viennoiseries ! **Alexandra**, merci pour ta gentillesse et ton altruisme. Merci également pour tout le boulot que tu as réalisé sur la mise au point du projet stéréotaxie ! Enfin, comment finir le tour du labo sur quelqu'un d'autre... **Nicolas V**, merci pour toute l'aide que tu m'as apporté durant ces six mois. Mine de rien ta présence aura permis de continuer à faire avancer ce projet stéréotaxie tout en me permettant de me libérer du temps pour la rédaction. Surtout que je ne t'ai pas toujours laissé les trucs les plus drôles à faire... Merci pour ta curiosité permanente et la grande motivation dont tu as fait preuve au quotidien. Merci également pour ton humour, ton soutien et toutes les discussions qu'on a eu tout du long. Même si je t'ai pas mal charrié, non seulement tu as fait du bon boulot mais en

plus tu es un chouette type. Bon je ne te cache cependant pas que des fois tu m'as bien épuisé avec toutes les âneries que tu peux balancer à longueur de journée ! On se retrouve en dehors de l'IRSN pour monter avec Fred le groupe des amateurs des vieilles chansons françaises !

Ces trois années passées au sein du L3R auront donc été une aventure inoubliable, pleine de supers souvenirs. J'ai trouvé avec vous une véritable seconde famille. Merci pour tous ces bons moments, ces discussions passionnées et ces incalculables fous-rires ! Cette formidable aventure ne s'est toutefois pas limitée aux frontières de notre laboratoire et s'est étendue à l'échelle du service et même en dehors. J'ai ainsi rencontré durant cette épopée toute une flopée de personnes géniales dont je garderai d'excellents souvenirs.

Tout d'abord, un merci particulier à quelques personnes qui ont été aussi particulièrement indispensables à cette thèse. Merci ainsi à **Morgane**. Merci pour ta gentillesse, ton altruisme et ces nombreuses discussions à propos de cinéma, voyages et autres hobbies lors des longues journées passées entre quatre murs (étroits...) pour les irradiations au SARRP. Promis, même si on t'a malgré nous catalogué avec les « vieux » on ne t'apprécie pas moins pour autant ! Merci à **Yoann**, pour ton aide et ta compagnie pendant ces nombreuses heures passées à ALPHEE. Merci pour ta grande gentillesse, ton humour ainsi que pour toutes ces discussions de geeks et ces débats footballistiques ! Et... Reste confiant, la prochaine fois on vaincra ! Merci à **Véronique, Sandra et Chloé** pour leur gentillesse extrême, la qualité de leur travail et leur apport indispensable à la vie du service. Sans vous notre quotidien serait bien plus difficile et bien moins joyeux ! Une pensée particulière pour Sandra, notre Beyoncé *made in* Fontenay aux Roses. Merci pour ton sourire et ta douce folie qui illuminent inéluctablement nos journées ! Tu es une fille géniale et ça a toujours été un plaisir de te côtoyer ! Reste comme tu es et bonne continuation pour la suite !

Au sein du LR2I : **Alain**, censé être le garde-fou du bureau mais étant peut-être parfois lui-même le plus fou d'entre nous. Et dire que le premier jour je me disais que tu avais l'air sévère... Ça n'aura pas duré bien longtemps ! Merci pour ta bonne humeur permanente et ta jeunesse éternelle ! Merci pour tes nombreux conseils théoriques et techniques ainsi que ces nombreuses discussions. Ça aura été un grand plaisir de partager ce bureau avec toi pendant ces trois ans. **Alexia et Alexandre**, merci pour votre sympathie ainsi que pour ces bons moments partagés à l'IRSN et pendant les journées des thèses ! Bon courage pour la suite ! (Alexia, le jour où tu vas en Occitanie, préviens moi je te ferai un laissez passer !) **Lara et Stéphane** merci pour votre humour, votre gentillesse et les nombreuses discussions qu'on a

partagées au cours de ces trois ans ! **Virginie**, merci pour ta grande gentillesse, ton soutien au cours de ces dernières semaines de rédaction ainsi que pour tes conseils dans l'organisation de la soutenance ! **Claire, Christelle, Christine, Carine, Noëlle, Valérie, Alysso, Bruno, Bastien et Samir**, merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur ! Vous êtes toutes et tous des personnes supers !

Au sein du LDB : **Aurélie et Amélie**, merci beaucoup pour tous ces bons moments passés ensemble ! Merci pour votre jovialité communicative, toutes ces discussions et tous ces éclats de rire. Ça a été un réel plaisir de vous côtoyer tout au long de cette aventure ! Et Amélie, bon courage pour cette troisième année ! **Éric et Gaëtan**, merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur quotidienne ! Merci également à **Géraldine, Delphine, Cécile, Pascale, Sandrine et Céline**.

Au sein du LRTOX : Merci à l'inséparable duo de choc, **Dimitri et Stéphane**. Merci pour votre bonne humeur perpétuelle et votre humour ! Je dois vous avouer un truc, si j'ai fait autant de PCR à moment donné c'était uniquement pour avoir l'occasion de vous croiser dans les labos ! Bon... Peut-être quand-même, mais en tout cas c'était toujours un plaisir quand ça arrivait ! Merci pour tous ces bons moments ! Merci également à **Maâmar** pour sa courtoisie et sa gentillesse quasi-légendaire, à faire si souvent le tour de tous les bureaux simplement pour nous saluer ! Un merci particulier également à **Philippe et Teni** pour leur gentillesse. Merci également à **Dalila et Alice** pour leur sympathie. Bon courage pour vos fins de thèses respectives ! Merci aussi à **Jean-Marc, Yann, Christelle, Chrystelle et Line**.

Au LEPID, merci à **Lucie et Sabine**. Merci les filles pour votre sourire, votre gentillesse et votre bonne humeur ! Bonne chance pour la suite ! Mais je ne m'inquiète pas trop pour vous ça devrait bien se passer !

Au GSEA, pour la qualité de leur travail quotidien dans la gestion des élevages mais aussi pour leur gentillesse, leur aide et leur disponibilité. Un grand merci donc à **Mélanie, Amandine, Romain, Sébastien, Frédéric et Delphine**, sans oublier **Salif et Antoine**.

Merci enfin à **Marc et Laurence** pour m'avoir accueilli au sein du SRBE ainsi qu'à **Radia** pour les discussions et conseils lors du RADRES 2016. Merci aussi à **Coralie**, dont la rencontre est la preuve que même un évènement malencontreux peut avoir de belles conséquences ! Tu es une fille vraiment chouette, sympa, agréable et j'ai pris beaucoup de

plaisir à discuter et rigoler avec toi lors de nos petites pauses café ! Dommage que nos emplois du temps respectifs ne nous aient pas permis d'en faire plus souvent !

Mais parce que les membres du service n'ont pas été les seules personnes formidables côtoyées durant ces trois années, merci tout d'abord aux membres de l'Ad'i[N] pour tous ces bons moments, ces soirées, ces discussions, ces échanges et ces fous-rires ! **Miriam**, ma partenaire de croisière ! Tu es une fille drôle, sympa et toujours souriante. Malgré la distance on a partagé beaucoup de très bons moments et tu resteras l'une des plus belles rencontres que j'ai pu faire ! Merci de plus pour le soutien que tu m'as apporté au cours de ces derniers mois ! **Nadia** et **Thomas**, merci pour votre humour, votre gentillesse, votre bonne humeur perpétuelle et votre folie ! Merci pour toutes ces soirées passés ensemble à jouer aux jeux de société jusqu'à pas d'heure ! Vous êtes géniaux ! **Nicolas G**, merci pour ta gentillesse et ces bons moments passés à la ludothèque de Fontenay ! **Nicolas Tkatchenko**. Dommage que tu n'as pas souvent pu te joindre à nous car ça a toujours été un plaisir de te croiser et de discuter avec toi ! Bon courage pour ta dernière année mec ! **Geoffrey** et **Youssef**, les deux premiers doctorants hors SRBE avec qui j'ai sympathisé. Merci pour votre gentillesse et pour tous ces moments partagés en formation et aux Journées des thèses. Même si à cause de la distance on ne se voyait pas souvent, on a en quelque sorte traversé cette aventure ensemble de part en part et ce fut pour moi avec grand plaisir ! **Michaël** et **Mathias**, merci pour ces superbes passes, centres et appels en profondeur ! Merci aussi et surtout pour ces bons moments partagés sur et en-dehors du terrain ! Enfin, merci également à **Manon, Tiffany et Nicolas Tang**. On a eu assez peu d'occasions de vraiment faire connaissance mais ça a toujours été sympa de vous voir tant vous êtes sympas ! Bonne continuation pour la suite de votre thèse !

J'ai envie d'autre part de remercier chaleureusement l'ensemble de mes coéquipiers pour tous ces lundis soir passés ensemble à fouler la pelouse et taper dans le ballon. Vous êtes tous des mecs géniaux avec qui j'ai pris un grand plaisir à jouer ainsi qu'à discuter avant et après les matchs ! Grâce à vous j'ai pu garder la fraîcheur et l'équilibre mental nécessaires au bon déroulement de cette période chargée en travail. **Franck C, Mathieu, Guillaume C, François M, Julien G, Arnaud, Hervé R, Benoit, Sébastien, Jean-Baptiste, Guillaume K, Franck R, Jean, Alex, Hervé J, Julien C, Tanguy, Alexis, Alain, François C, Adama, Thomas, Nicolas, David, Fabrice, Pierre, Tony et Bruno**, merci à tous !

Parce que durant tout ce temps je ne suis pas non plus resté cloîtré à l'IRSN, merci également à mes compères de soirées. **Damien, Simon, Fabien, Anthony, Fabio et Nicolas**,

vous êtes des mecs supers, je ne compte plus le nombre d'heures passées tous ensemble ! Toutes ces discussions, ces délires, ces fous-rires, ces parties de billard, de jeux de société et... Ces pintes de bières, faut bien l'avouer... Bref parce qu'il faut bien se détendre régulièrement pour rester à fond côté boulot, merci pour tous ces moments ainsi que votre soutien dans les moments un peu plus difficiles. **Diane**, la preuve vivante qu'on rencontre des gens forts sympathiques dans les congrès ! Tu es une fille drôle, joviale, gentille et j'ai toujours eu beaucoup de plaisir à te voir (et à t'éclater au bowling) ! Une pensée également pour **Sabine, Nathalie et Axel** rencontrés également via la SIRLAF et dont j'ai beaucoup apprécié faire la connaissance ! Dommage qu'on se voit si peu souvent... De même merci à **Julie C.** Tu es une fille brillante et ça me motive à me dépasser pour rivaliser avec toi en termes de qualité de présentation et en nombre de distinction ! Merci pour ta gentillesse et tes conseils concernant la thèse et la suite ! **Thomas**, à défaut d'une victoire l'expérience de MT180 m'aura au moins permis de faire la connaissance d'un mec super. Merci pour tous ces bons moments partagés en Escape Game (dire qu'on a sauvé le monde et que personne ne le sait...) ou autour d'un bon jeu de société. Je te souhaite le meilleur pour ton expérience en Guyane, on reste en contact ! **Auréli**e, après ces quelques années où on s'est un peu perdu de vue, tout en gardant contact, ça a été une super nouvelle de te voir arriver sur Paris ! Tu es une fille d'une rare gentillesse, une amie précieuse et c'est toujours chouette d'aller boire un coup ou faire un ciné avec toi ! Merci pour ces années d'amitié auxquelles d'autres s'ajouteront à coup sûr ! **Cyril**, avec toi aussi notre amitié a traversé les années et les villes, les années lycée me paraissent si proches et si lointaines en même temps... C'est d'ailleurs l'occasion de remercier également **Bastien, Bruno et Florian**, vous êtes tous les quatre des mecs géniaux (bien qu'un peu tarés !). Tant de délires mythiques, de fous-rires mémorables et d'innombrables moments de joie... Merci pour votre soutien depuis toutes ces années. C'est devenu de plus en plus compliqué de se retrouver tous ensemble mais c'est toujours un plaisir immense de vous revoir et je sais que notre amitié restera intact. Une pensée également pour **Alex et Georges**, d'autres mecs supers que j'ai toujours plaisir à voir à l'occasion ! **Elodie B**, tu es une fille adorable et que j'apprécie énormément. Tu as vraiment été une belle rencontre et je regrette beaucoup qu'on ne puisse pas se voir plus souvent, les moments passés ensemble pendant et après le M2 me manquent... Merci pour ta gentillesse et ton soutien au cours de ces cinq dernières années ! **Yoan H**, merci pour cette amitié qui dure depuis toujours. Derrière ton côté bourru au premier abord, tu es un mec super. On se voit trop peu souvent à mon goût, j'espère que l'avenir arrangera cela ! Quitte à remercier les sudistes, je ne peux oublier **Audrey, Yoan, Ludo, Claude et Marc**. Merci pour votre amitié et tout ce que vous m'avez

apporté professionnellement mais aussi personnellement. Vous avez participé à faire de moi l'homme et le chercheur que je suis actuellement donc merci beaucoup à vous tous !

Déjà sept pages et il reste encore mes principaux soutiens à remercier. Mais c'était important que chacun d'entre vous sache l'importance que vous avez eu pour moi au cours de ces trois ans (voir plus pour certains). J'ai conscience d'avoir écrit un nombre conséquent de fois les mots « gentillesse » et « bons moments » mais si je devais résumer cette aventure en quelques mots ce sont ceux-là qui la définiraient le mieux ! Ce fut un chapitre merveilleux et je sais que le départ va être terriblement difficile... Mais c'est désormais une nouvelle aventure qui s'ouvre à moi. Merci encore à toutes et à tous ! Je ne vous oublierai pas !

Pour finir un énorme merci à ma famille pour tout ce qu'ils m'apportent au quotidien, leur amour et leur soutien inébranlable. Merci à **Martine, Fabrice, Eurédyce, Evan et Corentin ; Jean-Jacques et Nathalie ; Alain et Nathalie ; Gérard ; Jean-Michel, Isabelle et Maëva ; Patrice, Stéphanie, Mathéo et Enzo ; Cédric et Elias ; Elodie ; Delphine, Jackmey, Tiyah et Tairys ; Domi, Luigi et Angéline**. Je n'ai pas de mots suffisamment forts pour définir l'affection que j'ai pour vous tous... Merci d'être vous, je sais la chance que j'ai de vous avoir et c'est ce qui chaque jour me rend heureux. Merci pour votre présence et vos encouragements permanents, quelle que soit la situation ! **Julien**, une dédicace spéciale à mon futur confrère ! Tu es un mec adorable et attachant, d'une gentillesse et d'une simplicité inouïes. Merci pour tous ces moments partagés depuis qu'on est gamins. Bon courage pour cette dernière année, tu vas tout déchirer j'en suis sûr. Et s'il met possible de faire un souhait, j'espère qu'un jour on pourra travailler ensemble et monter notre propre équipe ! On fera un duo de choc, je n'en doute pas. Merci également à **Isabelle et Jean-Pierre** ainsi qu'à **Danielle et François** pour leur gentillesse et leurs encouragements.

Un immense merci enfin à mes grands-mères **Annie et Ginette**, à mes grands-pères partis trop tôt, **Fernand et Henri**, ainsi qu'à mes parents **Nicole et Gilbert**. Que dire... Vous avez toujours fait ce qu'il fallait pour faire de moi un homme bien, vous avez toujours fait tout ce qu'il était possible, et plus encore, pour m'élever dans les meilleures conditions, m'aider et me permettre de croire en mes rêves. Si aujourd'hui je suis celui que je suis devenu c'est grâce à vous, votre soutien et votre amour. Je sais que je ne le dis jamais, par pudeur j'ai tendance à garder mes sentiments en moi, mais si je me bats jour après jour pour franchir les barrières, atteindre et dépasser mes objectifs, c'est autant pour vous que pour moi. C'est certes pour mon avenir mais aussi pour vous remercier et que vous soyez fiers de moi.

Ces derniers mots sont dédiés à ma famille. Comme diraient deux jeunes artistes toulousains : « La réussite c'est la fierté dans les yeux des gens que l'on aime ». Malgré les galères, les coups durs et les déceptions, quand je regarde vos yeux je sais que j'ai réussi. Je continuerai d'avancer pour que vous restiez fiers de moi. Je vous aime.

**Mercés a totas e a totes !**

# Sommaire

Remerciements .....	3
Table des illustrations et tableaux.....	15
Table des abréviations.....	17
Prix et communications .....	20
Avant-propos .....	22
Introduction.....	24
<b>Chapitre I : La radiothérapie .....</b>	<b>24</b>
1. Les rayonnements ionisants.....	25
A. Les différents types de rayonnements .....	25
B. Les effets biologiques des rayonnements ionisants .....	26
2. Irradiation et réponse inflammatoire.....	30
3. Organisation tissulaire et impact des rayonnements ionisants .....	33
4. Prévisions de traitements en radiothérapie et organes à risques .....	34
5. Les différentes techniques en radiothérapie.....	41
A. Les radiothérapies champ large en trois dimensions .....	41
B. La radiothérapie en conditions stéréotaxiques .....	42
C. L'hadronthérapie.....	44
<b>Chapitre II : Compartiment vasculaire et réponse aux rayonnements ionisants .....</b>	<b>46</b>
1. Structure et composition du réseau vasculaire.....	46
2. Rôles physiologiques de l'endothélium .....	47
A. La perméabilité vasculaire .....	47
B. L'homéostasie vasculaire .....	47
C. Le tonus vasomoteur.....	47
D. L'angiogenèse .....	48
E. La réponse immunitaire.....	48
3. Réponse de l'endothélium vasculaire face aux rayonnements ionisants .....	49
A. L'apoptose endothéliale radio-induite.....	49
B. L'activation de l'endothélium après irradiation .....	50
4. Les acteurs vasculaires des dommages radio-induits aux tissus sains .....	51
A. Le Plasminogen Activator Inhibitor-type 1 (PAI-1).....	51
B. L'Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 $\alpha$ ).....	53
C. La transition endothélio-mésenchymateuse .....	55
<b>Chapitre III : Physiologie, radiobiologie et radiopathologie pulmonaire.....</b>	<b>57</b>

1. Appareil respiratoire et anatomie pulmonaire.....	57
2. Physiologie pulmonaire .....	60
A. La ventilation pulmonaire .....	61
B. Les échanges gazeux alvéolo-capillaires.....	62
C. Explorations fonctionnelles respiratoires (EFR) .....	63
3. Pathologies pulmonaires .....	69
A. Au niveau trachéo-bronchique .....	69
B. Au niveau alvéolaire .....	70
C. Les cancers pulmonaires.....	71
4. Radiobiologie pulmonaire .....	72
A. Effets des radiations sur le compartiment épithélial.....	73
B. Effets des radiations sur le compartiment mésenchymateux .....	75
C. Effets des radiations sur le compartiment endothélial .....	76
5. Radiopathologie pulmonaire .....	78
A. La pneumonite aiguë radio-induite .....	78
B. La fibrose pulmonaire radio-induite.....	78
C. Données cliniques et thérapies des pneumopathies radiques.....	80
D. Les principaux acteurs de la fibrose pulmonaire radio-induite .....	83
E. Modélisation de la fibrose pulmonaire radio-induite.....	85
<b>Problématique et objectifs .....</b>	<b>88</b>
<b>Résultats.....</b>	<b>89</b>
<b>Discussion et Perspectives .....</b>	<b>153</b>
1. Les modèles d'irradiation .....	153
2. Promoteur VE-Cadhérine et invalidations endothélium-spécifique.....	158
3. Invalidation endothélium-spécifique de PAI-1 et irradiation thoracique .....	159
4. Caractérisation des lésions après irradiation pulmonaire en conditions stéréotaxiques.....	163
5. Invalidation endothélium-spécifique de HIF-1 $\alpha$ et lésions radiques pulmonaires	168
6. Perspective directe en cours au laboratoire : La sénescence endothéliale pulmonaire radio-induite .....	171
7. Conclusion générale.....	173
<b>Annexe 1 : Réponse aux rayonnements ionisants des souris déficientes en PAI-1 .....</b>	<b>175</b>
<b>Annexe 2 : Génération des souris déficientes en PAI-1 spécifiquement dans le compartiment endothélial : Système CreLoxP .....</b>	<b>178</b>
1. Génération des souris PAI-1flx/flx.....	178

<b>2. Génération des souris PAI-1 KOendo .....</b>	<b>180</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>182</b>

## Table des illustrations et tableaux

---

Figure 1 : Représentation schématique des différents niveaux de pénétration des rayonnements ionisants.....	25
Figure 2 : Effets directs et indirects des rayonnements ionisants sur l'ADN.....	26
Figure 3 : Répartition des points de contrôle au cours du cycle cellulaire.....	27
Figure 4 : Cinétique des événements cellulaires et moléculaire majeurs impliqués dans la réponse tissulaire radio-induite.....	30
Figure 5 : Concept de la fenêtre thérapeutique .....	34
Figure 6 : Effets du fractionnement sur les tissus en fonction de leur vitesse de prolifération ....	35
Figure 7 : Les différents volumes-cibles en radiothérapie.....	37
Figure 8 : Comparaison des isodoses entre des irradiations 3D-CRT (à gauche) et IMRT (à droite) pour une dose totale de 45 Gy distribuée en fraction de 1,8 Gy (cancer de l'anus).....	42
Figure 9 : Exemple de répartition des doses pour une irradiation stéréotaxique de 60 Gy .....	44
Figure 10 : Comparaison des volumes irradiés entre des radiothérapies crâniospinales photonique (à gauche) et protonique (à droite) pour une dose totale de 36 Gy délivrée en fractions de 1,8 Gy.....	45
Figure 11 : Structure des artères et veines.....	46
Figure 12 : Conséquences de l'activation de PAI-1 sur l'équilibre fibrinogène/fibrinolyse et rôle dans la fibrose tissulaire.....	51
Figure 13 : Rôles de HIF-1 $\alpha$ .....	53
Figure 14 : Transition endothélio-mésenchymateuse.....	55
Figure 15 : L'arbre trachéo-bronchique .....	57
Figure 16 : Anatomie du parenchyme pulmonaire.....	60
Figure 17 : Capacités et volumes pulmonaires .....	62
Figure 18 : VEMS et CVF .....	64
Figure 19 : Courbes débit-volume et syndromes pulmonaire .....	65
Figure 20 : Enceinte de pléthysmographie corps entier chez la souris.....	67
Figure 21 : Tapis de course pour rongeurs .....	68
Figure 22 : Illustration de la BPCO.....	69
Figure 23 : Illustration de sacs alvéolaires affectés par une pneumonie ou un emphysème.....	70
Figure 24 : Effets des radiations sur le compartiment alvéolo-capillaire.....	73
Figure 25 : Poumon sain (à gauche) et fibrosé à deux (au centre) et vingt semaines (à droite) après une irradiation stéréotaxique à 90 Gy. Marquage des collagènes au Trichrome de Masson (en bleu).....	80
Figure 26 : Courbes de survie des animaux contrôle et PAI-1 KO après des irradiations corps entier à 9, 11, 13, 15 et 17 Gy.....	176

<b>Figure 27 : Courbes de survie des animaux contrôle et PAI-1 KO après une irradiation localisée d'une anse intestinale à 19 Gy .....</b>	<b>177</b>
<b>Figure 28 : Courbes de survie des souris PAI-1flx/flx et PAI-1 KOendo après une irradiation localisée d'une anse intestinale à 19 Gy.....</b>	<b>177</b>
<b>Figure 29 : Structure du transgène inséré dans le vecteur cible .....</b>	<b>178</b>
<b>Figure 30 : Obtention des souris chimères puis hétérozygotes pour le locus recombiné SERPINE1.....</b>	<b>179</b>
<b>Figure 31 : Obtention des souris PAI-1flx/flx .....</b>	<b>179</b>
<b>Figure 32 : Stratégie de croisement permettant l'obtention des souris PAI-1 KOendo.....</b>	<b>180</b>
<b>Tableau 1 : Principaux organes à risque en radiothérapie. D'après le Guide des Procédures en Radiothérapie Externe 2007, Cancérologie pour le Praticien 1986 .....</b>	<b>38</b>
<b>Tableau 2 : Principaux organes à risque en radiothérapie thoracique .....</b>	<b>40</b>
<b>Tableau 3 : Evolution du nombre de centre ayant pratiqué les techniques .....</b>	<b>44</b>
<b>Tableau 4 : Techniques pratiquées dans les centres en 2013.....</b>	<b>44</b>
<b>Tableau 5 : Localisation tumorales traitées par stéréotaxie extra-crânienne en 2013.....</b>	<b>44</b>

## Table des abréviations

<b>3D-CRT</b>	Three-dimensional conformal radiation therapy	<b>DAMPs</b>	Damage-Associated Molecular Pattern
<b>ACE-1</b>	Angiotensin Converting Enzyme-Inhibitor	<b>DEM</b>	Débit Expiratoire Moyen
<b>ACTH</b>	Adrenocorticotrop hormone	<b>DEP</b>	Débit Expiratoire de Pointe
<b>ADH</b>	Antidiuretic Hormone	<b>DPI</b>	Diphenyleiodonium
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique	<b>DTA</b>	Diphtheria Toxin
<b>AP-1</b>	Activator Protein-1	<b>EDHF</b>	Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor
<b>ATM</b>	Ataxia Telangiectasia Mutated	<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>BAEC</b>	Bovine Aortic Endothelial Cells	<b>EMT</b>	Epithelial–Mesenchymal Transition
<b>Bcl-2</b>	B-cell lymphoma 2	<b>eNOS</b>	endothelial Nitric-Oxyde Synthase
<b>BED</b>	Biologically Effective Dose	<b>EORTC</b>	European Organism for Research and Treatment of Cancer
<b>bFGF</b>	basic Fibroblast Growth Factor	<b>ET-1</b>	Endothéline-1
<b>BPCO</b>	Bronchopneumopathie Chronique Obstructive	<b>ETS1</b>	Avian erythroblastosis virus E26 homolog-1
<b>CAM</b>	Cell Adhesion Molecule	<b>FACS</b>	Fluorescence-Activated Cell Sorting
<b>CBCT</b>	Cone Beam CT	<b>Flp</b>	Flippase
<b>CDK</b>	Cyclin Dependent Kinase	<b>FOT</b>	Forced Oscillations Technique
<b>CPT</b>	Capacité Pulmonaire Totale	<b>FRT</b>	Flippase Recognition Target
<b>CsA</b>	Cyclosporine A	<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>CTCAE</b>	Common Terminology Criteria for Adverse Events	<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
<b>CTV</b>	Clinical Target Volume	<b>GN</b>	Granulocytes Neutrophiles
<b>CVF</b>	Capacité Vitale Forcée	<b>GTV</b>	Gross Tumor Volume
<b>CXCL8</b>	CXC-Chemokine Ligand 8	<b>HDV</b>	Histogrammes Doses–Volumes

<b>HEY2</b>	Hairy/Enhancer-of-Split Related with YRPW Motif Protein 2	<b>NK</b>	Natural Killer
<b>HIF-1</b>	Hypoxia-Inducible Factor-1	<b>NOX</b>	NADPH oxidase
<b>HMVEC-L</b>	Human Lung Microvascular Endothelial Cells	<b>NSCLC</b>	Non-Small Cell Lung Cancer
<b>HRE</b>	Hypoxia-Response Element	<b>OAR</b>	Organe à Risque
<b>HUVEC</b>	Human Umbilical Vein Endothelial Cells	<b>PAEC</b>	Porcine Aorta Endothelial Cells
<b>ICAM-1</b>	Intercellular Adhesion Molecule-1	<b>PAI-1</b>	Plasminogen Activator Inhibitor-type 1
<b>IFN</b>	Interféron	<b>PDGF</b>	Platelet-derived growth factor
<b>IGFBP</b>	Insulin-like Growth Factor-Binding Protein	<b>Penh</b>	Enhanced Pause Parameter
<b>IL</b>	Interleukine	<b>PGI2</b>	Prostaglandine I <sub>2</sub>
<b>IMRT</b>	Intensity Modulated Radiation Therapy	<b>PHD</b>	Prolyl Hydroxylase
<b>IPF</b>	Idiopathic Pulmonary Fibrosis	<b>pro-SFPC</b>	Prosurfactant Protein C
<b>IRM</b>	Imagerie par Résonance Magnétique	<b>PTV</b>	Planned Target Volume
<b>KCO</b>	Coefficient de transfert du monoxyde de carbone	<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>LDH</b>	Lactate Déshydrogénase	<b>RP</b>	Radiation Pneumonitis
<b>LINAC</b>	Linear Accelerator	<b>RTOG</b>	Radiation Therapy Oncology Group
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharides	<b>SARRP</b>	Small Animal Radiation Research Platform
<b>LQ</b>	Linear-Quadratic Model	<b>SASP</b>	Senescence-Associated Secretory Phenotype
<b>LT</b>	Lymphocytes T	<b>SBRT</b>	Stereotactic Body Radiation Therapy
<b>M1</b>	Macrophages de type 1	<b>SERPINE</b>	Inhibiteur des Protéases à Sérine
<b>M2</b>	Macrophages de type 2	<b>SERPINE1</b>	Serpin Family E Member 1
<b>MLD</b>	Mean Lung Dose	<b>SGI</b>	Syndrome Gastro-Intestinal
<b>MMP</b>	Matrix MetalloProteinases	<b>siRNA</b>	small interfering RNA
<b>NHEJ</b>	Non-Homologous End-Joining	<b>TFPI</b>	Tissue Factor Pathway Inhibitor

<b>TGF</b>	Tumor Growth Factor	<b>uPA</b>	Urokinase
<b>Th</b>	Lymphocytes T helper	<b>VA</b>	Volume Alvéolaire
<b>TIMP</b>	Tissue Inhibitors of MetalloProteinases	<b>VCAM-1</b>	Vascular Cell-Adhesion Molecule-1
<b>TLDA</b>	TaqMan Low Density Arrays	<b>VE-Cad</b>	Vascular Endothelial-Cadherin
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor	<b>VEGF-A</b>	Vascular Endothelial Growth Factor-A
<b>TNFR1</b>	Tumor Necrosis Factor Receptor 1	<b>VEMS</b>	Volume Expiratoire Maximal par Seconde
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor alpha	<b>VHL</b>	Von Hippel-Lindau
<b>tPA</b>	tissue Plasminogen Activator	<b>VR</b>	Volume Résiduel
<b>TPS</b>	Treatment Planning Systems	<b>vWF</b>	von Willebrand Factor
<b>Tregs</b>	Lymphocytes T régulateurs	<b>WPB</b>	Weibel–Palade Bodies
<b>TXA2</b>	Thromboxane A2	<b>ZEB1</b>	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1
<b>Ulinastatin</b>	Urinary Trypsin Inhibitor	<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	alpha-Smooth Muscle Actin

## Prix et communications

---

### Publications :

**Lavigne J**, Soysouvanh F, Buard V, Tarlet G, Guipaud O, Paget V, Milliat F and François A. *Conditional PAI-1 deletion in the endothelial compartment has no benefit on radiation-induced lung damage in mice* – Accepté Juillet 2017 dans l'**International Journal of Radiation Oncology Biology Physics (IJROBP)**

Mintet E, **Lavigne J**, Paget V, Tarlet G, Buard V, Guipaud O, Sabourin JC, Milliat F and François A. *Conditional deletion of Hey2 in the endothelium reduces endoMT and mitigates radiation proctitis in mice* – Accepté en juin 2017 dans **Scientific Reports**

Zappa M, Doblaz S, Garteiser P, Cazals-Hatem D, Milliat F, François A, **Lavigne J**, Vilgrain V, Van Beers B and Ogier-Denis E *MR imaging in murine radiation-induced rectocolitis: correlation with histopathological inflammation score* - Soumis dans **NMR in Biomedicine**

### Communications orales :

**Lavigne J**, Suissa A, Buard V, Soysouvanh F, Milliat F and François A. *Phenotypic changes in irradiated endothelial cells and roles in lung following radiation therapy* - **Journées des thèses de l'IRSN 2017**, Carry-le-Rouet (France).

**Lavigne J**, Buard V, Soysouvanh F, Milliat F and François A. *Phenotypic changes in irradiated endothelial cells and roles in lung following radiation therapy* - **Journées des thèses de l'IRSN 2016**, Le Croisic, (France).

**Lavigne J**, Buard V, Soysouvanh F, Milliat F and François A. *Phenotypic changes in irradiated endothelial cells and roles in lung following radiation therapy* - **Colloque International de Radiobiologie Fondamentale et Appliquée 2015**, Obernai, (France).

### Communications affichées :

**Lavigne J**, Suissa A, Buard V, Soysouvanh F, Milliat F and François A. *Phenotypic changes in irradiated endothelial cells and roles in lung following radiation therapy* - **Journées des thèses de l'ED394 2017**, Paris (France).

**Lavigne J**, Suissa A, Buard V, Soysouvanh F, Milliat F and François A. *Phenotypic changes in irradiated endothelial cells and roles in lung following radiation therapy* - **Radiation Research Society 2016**, Hawaii (USA).

**Lavigne J**, Suissa A, Buard V, Soysouvanh F, Milliat F and François A. *Phenotypic changes in irradiated endothelial cells and roles in lung following radiation therapy* - **Workshop de radiobiologie de l'IRBA 2016**, Paris (France).

**Lavigne J**, Suissa A, Buard V, Soysouvanh F, Milliat F and François A. *Phenotypic changes in irradiated endothelial cells and roles in lung following radiation therapy* - **Young Researcher in Life Sciences 2016**, Paris (France).

**Lavigne J**, Suissa A, Buard V, Soysouvanh F, Milliat F and François A. *Phenotypic changes in irradiated endothelial cells and roles in lung following radiation therapy* - **Journées des thèses de l'ED394 2016**, Paris (France).

**Lavigne J**, Milliat F and François A. *Phenotypic changes in irradiated endothelial cells and roles in lung following radiation therapy* - **Journées des thèses de l'ED394 2015**, Paris (France).

**Lavigne J**, Milliat F and François A. *Phenotypic changes in irradiated endothelial cells and roles in lung following radiation therapy* - **Journées des thèses de l'IRSN 2015**, L'Isle-sur-la-Sorgue (France).

**Prix / Distinctions :**

**Travel Award for the 62th annual meeting of the Radiation Research Society :**

**Lavigne J**, Suissa A, Buard V, Soysouvanh F, Milliat F and François A. *Phenotypic changes in irradiated endothelial cells and roles in lung following radiation therapy* - **Radiation Research Society 2016**, Hawaii (USA).

**Meilleure communication orale catégorie « jeunes chercheurs » :**

**Lavigne J**, Buard V, Soysouvanh F, Milliat F and François A. *Phenotypic changes in irradiated endothelial cells and roles in lung following radiation therapy* - **Colloque International de Radiobiologie Fondamentale et Appliquée 2015**, Obernai, (France).

Finaliste concours national Famelab 2017

Finaliste Sorbonne Universités « Ma thèse en 180 secondes » 2016

## Avant-propos

---

Les origines de la radiothérapie remontent à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle avec la découverte des rayons X en 1895 par Wilhelm Roentgen, puis du radium en 1898 par Pierre et Marie Curie. Ces découvertes ont rapidement suscité un grand enthousiasme et ouvert de nouvelles perspectives en médecine. La capacité de ces rayonnements à traverser les tissus biologiques a très vite été utilisée dans un but diagnostique pour visualiser l'intérieur des corps vivants. Leur potentiel thérapeutique, notamment contre le cancer, a par la suite été démontré sous l'impulsion de Marie Curie et de Claudius Regaud. C'est ainsi que la Fondation Curie et le premier centre de lutte contre le cancer virent le jour en 1921. La roentgentherapie, la radiumthérapie et la curiethérapie ont par la suite évolué au fil des nouvelles connaissances et innovations technologiques pour aboutir à la radiothérapie moderne.

De nos jours, la radiothérapie est une arme indispensable dans la lutte contre le cancer puisqu'elle intervient dans le traitement de près de 50% d'entre eux. Cependant, bien que depuis ses balbutiements des progrès considérables ont été réalisés pour améliorer la prise en charge des patients, certaines limites persistent encore aujourd'hui. Ainsi, l'irradiation des tissus sains avoisinant la tumeur est la cause du développement de pathologies radio-induites chez certains patients. Alors que de nombreux progrès ont été faits en balistique pour limiter ces expositions, peu de moyens préventifs ou thérapeutiques sont toutefois à la disposition des médecins pour améliorer les conditions de vie des patients affectés par ces pathologies radiques.

C'est pourquoi au sein du Laboratoire de Recherche en Radiobiologie et Radiopathologie nous essayons de mieux comprendre les conséquences des rayonnements ionisants sur les tissus sains via l'utilisation de modèles *in vitro* et *in vivo*. Diverses études menées par notre équipe et d'autres à travers le monde ont démontré une participation active des vaisseaux sanguins dans le développement et la chronicité des lésions radiques. Les cellules endothéliales en particulier sont ainsi devenues une piste d'étude privilégiée pour notre laboratoire. Plusieurs acteurs moléculaires clés ont ainsi pu être identifiés dans le contexte d'irradiations de la sphère abdomino-pelvienne chez la souris. La question qui se posait alors était de savoir si ces résultats pouvaient être valables pour d'autres organes, dont l'organisation et le fonctionnement sont totalement différents. L'objectif de cette thèse était

ainsi d'investiguer sur l'implication éventuelle de ces différentes molécules d'intérêt vis-à-vis du développement des lésions pulmonaires radio-induites.

# Introduction

---

## Chapitre I : La radiothérapie

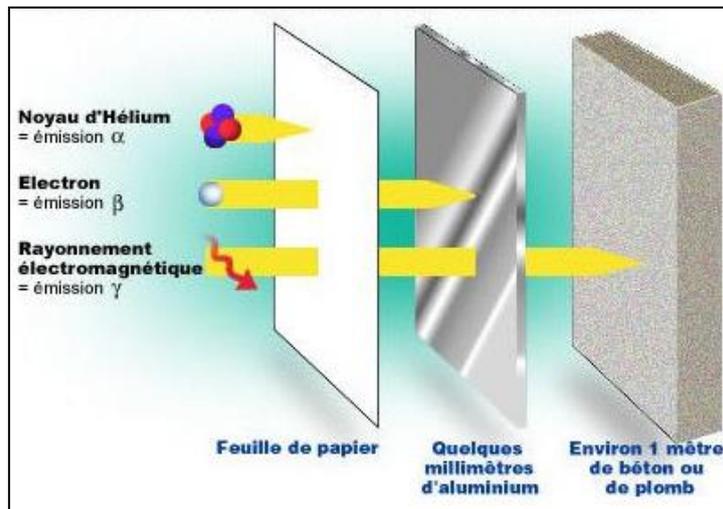
Avec près de 200 000 patients traités chaque année en France, la radiothérapie est, avec l'exérèse chirurgicale et la chimiothérapie, l'une des trois principales stratégies thérapeutiques existant actuellement pour traiter les patients atteints de cancers. Celle-ci consiste en l'utilisation de rayonnements ionisants destinés à traiter de façon localisée et non-invasive la zone tumorale. La prescription de séances de radiothérapie peut être décidée selon plusieurs perspectives. Premièrement, l'irradiation peut être réalisée dans un but curatif afin de stériliser la tumeur. Une association avec de la chimiothérapie ou de la chirurgie est alors possible en fonction de la localisation de la masse tumorale et du degré d'avancement de la maladie. Ces associations permettent de plus de limiter les risques de reprise tumorale en s'assurant de traiter au mieux l'ensemble des cellules atteintes, y compris celles disséminées dans les tissus sains situés à proximité de la zone cible. Secondement, la radiothérapie peut également être proposée aux personnes présentant un cancer trop évolué ou métastatique. L'objectif est alors de contrôler la progression de la maladie à l'aide de doses cumulées plus faibles (traitements courts) pour soulager les patients. On parle alors de radiothérapie palliative. Enfin, la radiothérapie présente également des vertus antalgiques, hémostatiques ou décompressives utiles pour traiter certains symptômes particulièrement gênants pour les malades. Cette utilisation porte le nom de radiothérapie symptomatique.

La radiothérapie est donc une arme de prédilection dans l'arsenal thérapeutique dont disposent les médecins mais celle-ci n'est malheureusement pas sans risque. En effet, l'action des rayonnements ionisants n'étant pas spécifique des cellules cancéreuses, elle affecte également les tissus sains à proximité de la zone à traiter. Des pathologies secondaires, aiguës et/ou chroniques, de sévérité variable, peuvent ainsi apparaître chez les patients dans les semaines ou les mois suivant l'irradiation<sup>1</sup>. Ceci est un problème majeur qui peut altérer de façon drastique la qualité de vie des patients concernés.

# 1. Les rayonnements ionisants

## A. Les différents types de rayonnements

Un rayonnement correspond à une émission d'énergie sous la forme d'une onde ou de particules. En interagissant avec la matière qu'elles traversent, les radiations peuvent « arracher » des électrons aux atomes la constituant. Ceux-ci deviennent ainsi chargés et on parle alors d'ionisation. On distingue plusieurs types de rayonnements ionisants :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , X et neutroniques ; chacun d'entre eux possédant des niveaux d'énergie et de pénétration de la matière différents. Les rayonnements  $\alpha$  et  $\beta$  (avec l'émission respective de noyaux d'hélium ou d'électrons) ont un faible pouvoir de pénétration alors que les rayonnements X et  $\gamma$ , correspondant à des photons énergétiques, sont dits pénétrants. En plus de la nature des particules émises et de leur capacité à entrer dans la matière, l'effet d'un rayonnement va également dépendre du niveau d'énergie des particules émises. De cette façon, les rayonnements sont classés en fonction de la quantité d'énergie qu'ils peuvent déposer. Les rayons X,  $\gamma$  et les particules  $\beta$  entraînent ainsi un faible dépôt d'énergie dans la matière, alors que les particules  $\alpha$  et les neutrons induisent le dépôt d'une plus grande quantité d'énergie. Ainsi pour chaque type de particules, des effets distincts seront provoqués au sein de la matière et des moyens de protection de différentes natures seront nécessaires pour les bloquer (figure 1).

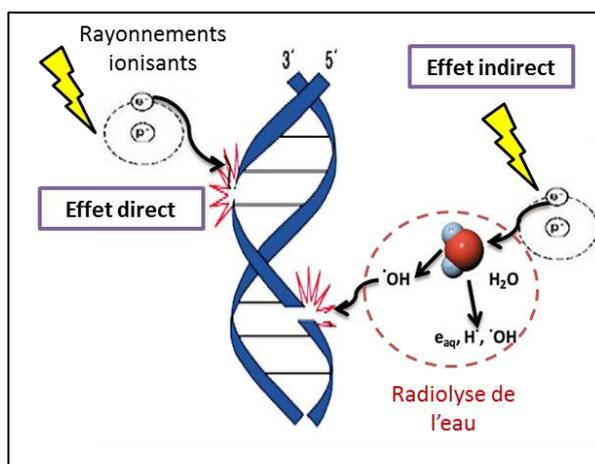


**Figure 1 :** Représentation schématique des différents niveaux de pénétration des rayonnements ionisants (<http://www.irsn.fr>)

## B. Les effets biologiques des rayonnements ionisants

### 1. Au niveau cellulaire

En conséquence des effets physiques précédemment évoqués, l'exposition de tissus biologiques à des rayonnements ionisants va déclencher toute une série d'évènements au sein de ceux-ci. Au niveau cellulaire une irradiation est à l'origine de multiples dommages, que ce soit via une action directe des rayonnements ionisants ou majoritairement par l'intermédiaire d'une importante production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*). En effet, un dépôt direct d'énergie sur les molécules d'ADN peut induire diverses altérations comme des cassures simple- ou double-brin, ou bien encore des pertes de base<sup>2</sup>. Concernant les effets indirects, sous l'action des radiations une radiolyse des molécules d'eau présentes dans les cellules est provoquée, libérant ainsi plusieurs composés fortement oxydants :  $O_2^-$ ,  $H^+$ ,  $HO^$ ,  $H_2O_2$  (figure 2). Ces ROS sont alors capables d'oxyder divers composants cellulaires, tels que les acides nucléiques, les protéines et les lipides<sup>3</sup>.

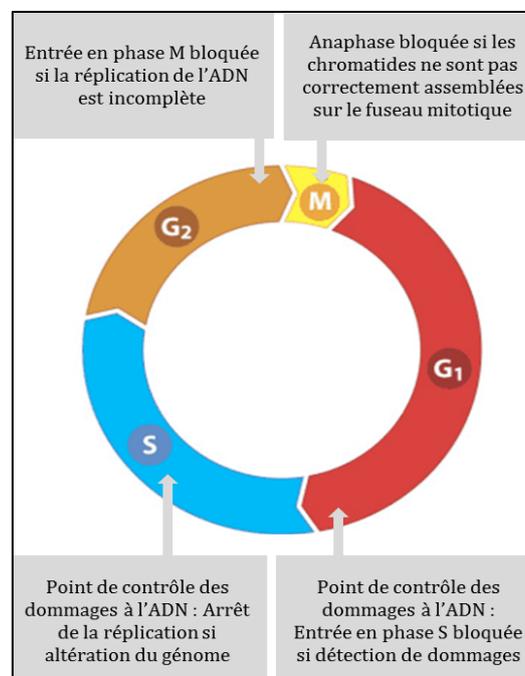


**Figure 2** : Effets directs et indirects des rayonnements ionisants sur l'ADN

De tels évènements altèrent fortement le fonctionnement normal des cellules. Toutefois, que ce soit via des effets directs ou indirects, l'impact des rayonnements ionisants sur les cellules dépend fortement de la phase dans laquelle celles-ci se trouvent<sup>4</sup>. En effet, des cellules quiescentes ou en phase S sont plus radio-résistantes que des cellules en phase M, dont la radiosensibilité est maximale. Les radiations ont donc un effet particulièrement délétère sur les cellules possédant une forte activité mitotique, telles que les cellules cancéreuses. C'est sur ce constat qu'a été bâti le principe d'utilisation de la radiothérapie comme pilier thérapeutique anti-cancer. Il est de plus connu que l'accumulation de faibles doses en remplacement d'une dose unique plus forte, augmente la capacité des rayonnements

à contrôler la croissance tumorale tout en laissant la possibilité aux cellules saines qui se divisent théoriquement plus lentement de réparer leurs dommages. Ceci correspond au principe de fractionnement de dose.

L'exposition de cellules saines à des radiations est malgré tout néfaste, quelle que soit la dose reçue. Cependant, les cellules disposent de plusieurs mécanismes permettant de pallier à cette situation : l'interruption du cycle cellulaire, la mise en place des mécanismes de réparation de l'ADN ainsi que la mort programmée. Pour permettre le bon déroulement de la division cellulaire et éviter également la transmission de données génétiques altérées, divers points de contrôles peuvent être activés au cours du cycle. Ceux-ci sont au nombre de trois et sont répartis ainsi : fin de phase G<sub>1</sub>, phase S et transition G<sub>2</sub>/M (figure 3).



**Figure 3 : Répartition des points de contrôle au cours du cycle cellulaire**

Lorsque des situations aberrantes sont détectées, le cycle est alors interrompu pour permettre le rétablissement normal de la situation. Concernant les lésions à l'ADN, des altérations ou des pertes de bases peuvent être provoquées mais également des cassures simple- ou double-brin ainsi que des pontages intra- ou inter-brins et des liaisons ADN-protéines. Concernant la réparation de ces altérations, les oxydations ou pertes de bases nucléotidiques peuvent être réparées par excision puis resynthèse à partir du brin complémentaire. Les cassures simple-brin peuvent également être comblées par complémentarité de bases, ce qui n'est pas le cas lorsque les deux brins complémentaires sont

lésés. La situation est alors plus complexe et nécessite l'utilisation du mécanisme de recombinaison homologue qui permet d'échanger une portion de brin avec le chromosome homologue afin que celui-ci serve de matrice. La lésion peut alors être résolue comme une cassure simple-brin. Toutefois un tel procédé n'est pas simple à résoudre et peut être à l'origine de pertes d'informations. Un autre mécanisme de réparation, moins fidèle, existe également : la NHEJ (*Non-Homologous End-Joining*). Celui-ci permet pour sa part de reconstituer la continuité des brins d'ADN sans toutefois permettre le remplacement des informations manquantes. Ce mécanisme est donc souvent associé à des mutations dont la plupart du temps des délétions. De par la complexité de leur résolution, les cassures double-brin sont donc les altérations les plus dommageables pour la viabilité cellulaire après exposition à des rayonnements ionisants<sup>5</sup>. Malgré l'existence de ces systèmes de réparation, les altérations de l'ADN ne peuvent pourtant pas toujours être corrigées. La cellule enclenche alors un processus de mort programmée, l'apoptose. D'autre part, lorsque les réparations n'ont pas correctement été effectuées, qu'il y a une anomalie chromosomique ou un défaut de formation du fuseau mitotique, la division cellulaire risque alors d'échouer et de conduire à l'induction du phénomène de catastrophe mitotique<sup>6</sup>.

La quantité et la nature des lésions créées au niveau des acides nucléiques lors d'une irradiation a donc un fort impact sur la viabilité cellulaire. Mais ce ne sont pas pour autant les seuls éléments cellulaires pouvant être endommagés. En effet, au niveau membranaire par exemple, les ROS sont capables de provoquer des changements structurels et conformationnels des protéines et des lipides (peroxydation lipidique)<sup>3</sup>. Ces modifications peuvent ainsi conduire à l'arrêt, ou au contraire l'activation anormale, de voies de signalisation via la modification d'activité de récepteurs membranaires ou bien de radeaux lipidiques riches en céramides<sup>7</sup>.

## **2. Au niveau tissulaire**

Via l'accumulation de dommages au niveau cellulaire, l'irradiation peut dans certains cas avoir de graves répercussions sur la fonctionnalité de l'organe atteint. En effet, bien que les plans de traitement soient prévus de façon à épargner au maximum les tissus sains, plusieurs types cellulaires non-tumoraux peuvent malgré tout être inclus dans le volume cible et, via leur altération, être à l'origine du développement de pathologies radio-induites précoces et/ou tardives. L'atteinte du compartiment proliférant (cellules souches et progéniteurs) d'un organe est connue de longue date pour être à l'origine d'effets aigus

sévères comme le syndrome hématopoïétique ou le syndrome gastro-intestinal. Ce sont d'ailleurs ces observations qui sont à l'origine de la popularité du dogme de la « cellule cible ». Brièvement, celui-ci stipule que :

- La réponse tissulaire aux rayonnements reflète la mort cellulaire au sein d'une population souche « cible »

- Des niveaux de dommages tissulaires équivalents, issus de différents types de rayonnements ou de différents protocoles de fractionnement, correspondent à des niveaux identiques de mort cellulaire

- Les cellules cibles survivantes sont capables de proliférer et de régénérer le tissu<sup>8</sup>.

Outre la létalité cellulaire qu'ils peuvent engendrer, les rayonnements ionisants sont de plus capables d'activer de nombreuses cellules présentes dans la zone irradiée. Le rôle de ces cellules qui ne meurent pas mais s'activent est déterminant dans le devenir tissulaire et l'apparition des lésions. Ainsi, contrairement à ce que le concept de cellule cible a longtemps suggéré, les découvertes faites ces dernières années tendent à montrer que l'apparition de lésions radiques serait la résultante d'un *continuum* d'évènements initié notamment par la mort massive et précoce de cellules ainsi que par l'activation de nombreux types cellulaires, et en particulier de l'endothélium vasculaire<sup>9</sup> (figure 4). Un tel contexte favoriserait alors le recrutement de cellules immunitaires circulantes, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ainsi que le déclenchement de l'angiogenèse et de la fibrogenèse nécessaires au processus de cicatrisation. Toutefois, la non-résolution de cet état inflammatoire et son maintien dans le temps seraient à l'origine du développement de pathologies chroniques comme la fibrose tissulaire. Au sein du laboratoire, de précédentes études ont d'ailleurs démontré l'importance du compartiment vasculaire dans l'apparition des fibroses intestinale et colorectale radio-induites<sup>10,11</sup>.



**Figure 4 :** Cinétique des évènements cellulaires et moléculaires majeurs impliqués dans la réponse tissulaire radio-induite

## 2. Irradiation et réponse inflammatoire

En condition physiologique l'inflammation est la réponse la plus fréquente des tissus face à une agression. Celle-ci sert alors à éliminer les pathogènes et à permettre la réparation des tissus lésés. Dans le cas d'une irradiation externe, les rayonnements ionisants induisent la production de radicaux libres oxygénés à l'origine d'une dysfonction des cellules endothéliales. Suite à ce stimulus, l'endothélium vasculaire présente d'une part un phénotype pro-thrombotique, pro-coagulant et anti-fibrinolytique, et sécrète d'autre part (avec les cellules stromales) diverses cytokines, chimiokines et facteurs de croissance<sup>12-14</sup>. La surexpression de molécules d'adhésion de type CAM (*Cell Adhesion Molecule*), ainsi que de protéines appartenant à la famille des sélectines, est de plus induite à la surface des cellules endothéliales<sup>15</sup>. Avec la mise en place de ces différents phénomènes, des conditions favorables au recrutement des cellules immunitaires sont alors réunies. Celui-ci est tout d'abord initié par le recrutement au niveau de la lésion, de granulocytes neutrophiles (GN)

attirés via la sécrétion de diverses chimiokines telles que CXCL8 (*CXC-chemokine Ligand 8*) par les macrophages résidents<sup>16</sup>. La synthèse et la diffusion de cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et IL-1) par les GN activés est alors à l'origine de la transmigration des monocytes depuis le sang vers le tissu. Ces derniers sont ensuite capables de se différencier en cellules dendritiques et macrophages, populations cellulaires essentielles à la régénération tissulaire. En effet, leur capacité de phagocytose permet le nettoyage de la lésion via la reconnaissance des débris cellulaires (*Damage-Associated Molecular Pattern*, DAMPs) issus des cellules apoptotiques<sup>17</sup>. Concernant les macrophages, ceux-ci peuvent être classés en deux types selon leur rôle dans l'inflammation et la façon dont ils sont activés. Les macrophages de type 1 (M1) sont ainsi reconnus comme pro-inflammatoires tandis que ceux de type 2 (M2) possèdent un phénotype anti-inflammatoire et antioxydant<sup>18</sup>.

La différenciation des macrophages en type M1 ou M2 est intrinsèquement liée aux cytokines, facteurs de croissance et micro-organismes auxquels ils sont exposés. Les molécules pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IFN- $\gamma$ ) et les LPS (lipopolysaccharides) tendent ainsi à générer des macrophages activés de type 1, médiateurs d'une inflammation aiguë. A l'inverse, les cytokines IL-4, IL-13, IL-10, TGF- $\beta$  et les complexes immuns promeuvent l'émergence des macrophages de type 2. Ces derniers participent pour leur part au remodelage tissulaire nécessaire à la réparation des lésions mais également au développement de son pendant pathologique : la fibrose tissulaire. L'apparition de complications après radiothérapie pourrait donc dépendre des modifications du profil cytokinique et de l'équilibre entre ces deux populations au cours de l'inflammation<sup>19</sup>. Plusieurs mécanismes sont d'ailleurs étudiés au sein de la littérature pour expliquer les changements d'orientation du phénotype des macrophages. Certains évoquent ainsi un recrutement séquentiel de monocytes qui seraient alors exposés à un environnement inflammatoire variable entre les phases précoce et tardive de la réaction inflammatoire. D'autres évoquent pour leur part la capacité des macrophages à passer de l'un à l'autre des phénotypes selon les stimuli extérieurs<sup>20</sup>. Une étude basée sur une irradiation thoracique à 20 Gy de souris C3H/HeN et C57BL/6 a pour sa part démontré l'existence d'une réponse cytokinique divisée en deux phases. Alors que la réponse inflammatoire semble identique au cours des deux premiers mois entre les deux lignées, une variabilité du profil cytokinique associée à un devenir pathologique différent ont été observés en phase tardive<sup>21</sup>. En effet, alors que les souris C3H/HeN développent une pneumonite, les souris C57BL/6 développent pour leur part une fibrose pulmonaire. De telles observations semblent soutenir l'hypothèse

d'un rôle clé joué par l'évolution du profil cytokinique dans l'orientation phénotypique des macrophages au cours du temps, et *in fine*, dans le développement de pathologies radio-induites.

Tout comme l'immunité innée, la réponse adaptative joue également un rôle important dans la réaction de l'organisme face aux dommages tissulaires induits par les rayonnements ionisants. Pour preuve il a notamment été démontré qu'il existe une étroite collaboration entre les macrophages et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> <sup>22</sup>. Ainsi, les lymphocytes Th1 sont induits à partir des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs (Th0) par l'intermédiaire de l'IL-12. Ceux-ci sont capables de sécréter de l'IFN- $\gamma$ , du GM-CSF ainsi que du TNF- $\alpha$ . Ils interviennent dans la réponse pro-inflammatoire en association avec les macrophages de type 1. La différenciation des Th0 en Th2 est pour sa part provoquée par une stimulation via l'IL-4. Les lymphocytes Th2 coopèrent avec les macrophages de type 2 et les lymphocytes B dans la réponse anti-inflammatoire. Ils sécrètent pour leur part les interleukines 4, 5, 6, 13 et 25.

Parmi les autres populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, on trouve également les Th17 (induits par l'IL-17) et les lymphocytes T régulateurs (Tregs). Ces derniers existent sous deux formes : naturelle (nTreg) ou induite (iTreg) par le TGF- $\beta$  et l'IL-2. Les iTreg sécrètent l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , et collaborent avec les macrophages M2 et les lymphocytes Th2. Cette collaboration s'oppose diamétralement à l'action pro-inflammatoire des cellules M1 et Th1 <sup>23</sup>.

A la vue de l'ensemble de ces données, on peut donc clairement souligner le rôle fondamental de l'équilibre entre ces différentes populations dans la résolution de l'inflammation. Une dérégulation de ce système chez certains patients traités par radiothérapie pourrait ainsi être à l'origine de la mise en place d'une inflammation chronique et à terme, du développement de pathologies tardives telle la fibrose tissulaire. Deux concepts globaux sont d'ailleurs décrits dans la littérature concernant le développement de la fibrose radique : 1) une non-résolution de l'inflammation aiguë et une évolution progressive vers une inflammation chronique puis une fibrose tissulaire ; 2) une inflammation précoce indépendante, souvent résolutive, suivie d'une fibrose « primaire », liée à l'activation des tissus de soutien et aux dommages vasculaires. Nous décrirons plus en détails dans le chapitre III l'initiation et le développement des pneumopathies radiques.

### **3. Organisation tissulaire et impact des rayonnements ionisants**

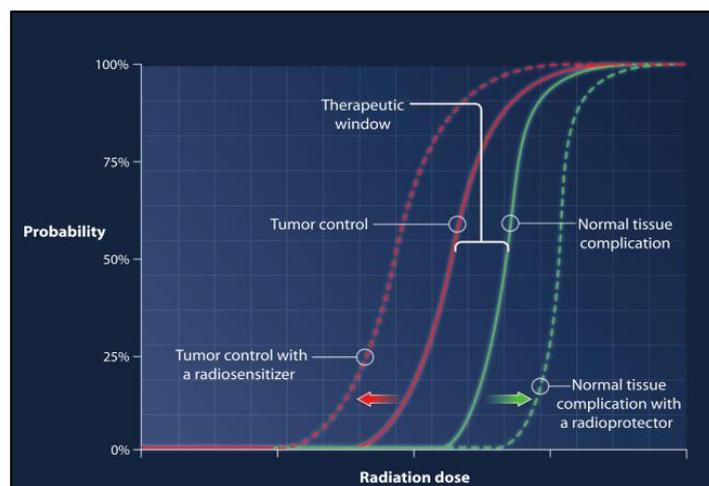
Pour déterminer le réel impact des lésions tissulaires radio-induites sur la fonctionnalité de l'organe atteint et la qualité de vie des patients, il faut prendre en compte les caractéristiques intrinsèques de celui-ci. En effet, selon leur organisation macroscopique, les organes peuvent être classés en deux catégories : ceux fonctionnant « en série », et ceux fonctionnant « en parallèle ». On parle d'organisation en série lorsque la fonction de l'organe dépend de toutes ses sous-unités fonctionnelles. Ainsi, si une d'entre elle est altérée au point de ne plus être fonctionnelle, c'est l'organe dans sa globalité qui est hors d'usage (ex : la moelle épinière, l'œsophage, etc.). Par rapport aux thématiques de recherche du laboratoire on peut également penser à l'intestin grêle et au côlon. En cas de fibrose tissulaire radio-induite importante, la lésion peut se développer au point d'obstruer partiellement ou totalement la lumière intestinale. On parle alors d'occlusion, phénomène grave et mortel s'il n'est pas pris en charge très rapidement. A l'opposé, les organes organisés en parallèle disposent quant-à-eux de sous-unités plus ou moins indépendantes les unes des autres (ex : poumon et myocarde). Dans le cas des poumons, la sévérité d'une fibrose varie en fonction du volume pulmonaire lésé, les sacs alvéolaires étant indépendants les uns des autres. Toutefois, ce constat n'est plus vraiment valable lorsque la zone atteinte correspond aux bronches de gros calibres. Les conséquences des lésions peuvent alors correspondre à celles observées sur un organe en série.

L'effet des radiations sur un tissu dépend de plus des caractéristiques des différents types cellulaires qui le composent. On distingue ainsi à nouveau deux catégories : les organes hiérarchisés (ou compartimentés) et ceux dits « flexibles » (non-hiérarchisés). Les tissus hiérarchisés sont ceux qui, comme la peau ou l'intestin, possèdent une séparation nette entre les compartiments proliférants (cellules souches et progéniteurs) et fonctionnels (cellules matures). Les compartiments progéniteurs sont très radiosensibles et l'irradiation entraîne une vague de mort cellulaire. L'expression des dommages tissulaires est généralement rapide et dépend de la durée de vie des cellules matures. La reconstruction tissulaire sera fortement dépendante du nombre de cellules souches survivantes, on se rapproche pour ces tissus du concept de cellule cible. Cette distinction cellules souches/cellules matures n'est pas présente dans les tissus flexibles comme le rein ou le poumon, bien que certaines populations de cellules différenciées gardent une capacité d'auto-renouvellement (ex : Pneumocytes de type 2). Ces tissus flexibles sont constitués uniquement de cellules fonctionnelles, le renouvellement est lent et se fait en cas de lésion. L'expression des dommages sera plus lente

et fonction de la durée de vie des cellules fonctionnelles, avec une forte implication du tissu conjonctif et des vaisseaux.

#### 4. Prévisions de traitements en radiothérapie et organes à risques

Comme énoncé précédemment, la décision d'utilisation de la radiothérapie comme arme anti-cancer fait suite au constat d'une différence de radiosensibilité entre cellules saines et tumorales. C'est ainsi que le concept de « fenêtre thérapeutique » a pu émerger<sup>24</sup>. L'objectif du radiothérapeute sera de travailler à une dose cumulée générant le meilleur contrôle tumoral tout en restant à une probabilité acceptable de générer des lésions aux tissus sains.



**Figure 5 : Concept de la fenêtre thérapeutique**  
(Liauw, Connell et Weichselbaum, 2013)

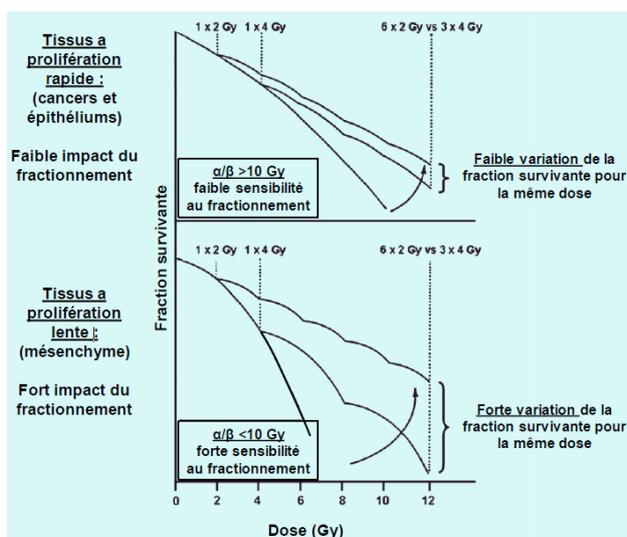
La dose de rayonnements délivrée aux patients lors de séances de radiothérapie est exprimée en Gray ; un gray correspondant à une énergie d'un joule absorbée par un kilo de matière. Les différences de vitesse de prolifération entre tissus sains et tumoraux sont le principe de base de l'utilisation d'un protocole fractionné en radiothérapie. Le modèle linéaire-quadratique (LQ, *Linear-Quadratic Model*) est un outil mathématique développé dès les années 1980 pour évaluer l'effet du fractionnement sur les tissus sains en radiothérapie. Celui-ci est modélisé à partir des courbes de survie de différents types cellulaires qui seraient le reflet de la réponse tissulaire aux rayonnements<sup>25</sup> (figure 6)

On peut ainsi définir ce modèle selon l'équation suivante :

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

S : Fraction survivante ; D : Dose (Gy) ; Coefficient  $\alpha$  : Reflète la probabilité d'une lésion directement létale ; Coefficient  $\beta$  : Reflète la probabilité d'une lésion sub-létale (indirectement létale) ; n : Nombre de fraction ; D : Dose par fraction.

Le rapport  $\alpha/\beta$  correspond à la probabilité relative d'induction de lésions directement létale et sublétales. Sa valeur est également issue du recul et de l'expérience clinique rapportant les fréquences de dommages aux tissus sains lors de changements de protocoles de fractionnement. . A l'aide de cet outil, il apparaît que les tissus à réponse rapide responsables des effets précoces (épithéliums et cellules cancéreuses) sont peu sensibles à la dose par fraction (valeur du rapport  $\alpha/\beta$  élevée, > à 10 Gy). Ceci est à l'opposé des tissus à réponse lente responsables des effets tardifs (muscles, os, etc.) qui possèdent un rapport  $\alpha/\beta$  compris entre 1 et 3 Gy. Une irradiation fractionnée avec une faible dose par fraction aura donc moins d'effets délétères sur ces tissus. C'est pourquoi le fractionnement de dose, aujourd'hui standardisé à 2 Gy par jour, est un facteur protecteur vis-à-vis de l'apparition d'effets secondaires tardifs chez les patients<sup>26</sup>. Concernant les poumons, organe qui nous a intéressés au cours de cette thèse, le rapport  $\alpha/\beta$  est ainsi égal à 3.



**Figure 6 : Effets du fractionnement sur les tissus en fonction de leur vitesse de prolifération**  
(Shrieve, D. C. & Loeffler, J. Human Radiation Injury, Wolters Kluwer, 2010)

Il est cependant à noter que ce modèle mathématique n'est pas pour autant une formule magique et que certaines limites ont été évoquées quant à sa validité. En effet, sa validité a notamment été remise en cause pour les doses inférieures à 1 Gy. En dessous de ce seuil un phénomène d'hyper-radiosensibilité a été observé par Joiner et al. Ce phénomène semblant s'expliquer par une non (ou faible) activation des mécanismes de réparation des lésions à l'ADN en dessous d'une certaine quantité de dommages<sup>27</sup>. Dans le cas des irradiations très fortes doses, la courbe de survie peut être considérée comme une droite « verticale » et sans épaulement, ce qui est contraire aux conditions prévu dans le modèle linéaire-quadratique. Ainsi, la moindre variation de dose induirait des chutes drastiques de la survie (exprimée en échelle logarithmique). C'est pourquoi il est prudent de ne pas utiliser ce modèle pour des doses par fraction supérieures à 7-10 Gy<sup>28,29</sup>. D'autre part concernant l'hypofractionnement, en plus de la dose plus élevée par fraction, le facteur temps est également un facteur limitant. En effet, le concept du modèle linéaire-quadratique n'est valable que pour des schémas d'étalements similaires. Jack Fowler recommande ainsi de ne pas raccourcir la durée totale de l'irradiation en dessous de cinq semaines, et avec pas moins de cinq fractions au total<sup>30</sup>.

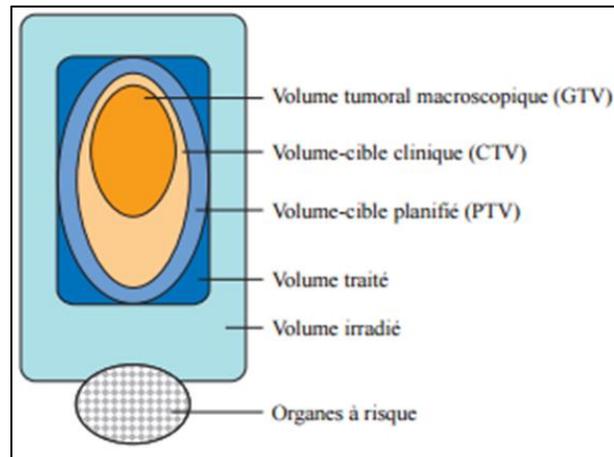
Découlant de ce modèle linéaire-quadratique, la Dose Efficace Biologique (BED, *Biologically Effective Dose*) correspond pour sa part à la dose biologique effectivement délivrée aux tissus<sup>31,32</sup>. Elle représente la dose réelle biologique délivrée par une combinaison particulière d'une dose par fraction et d'une dose totale à un tissu donné, lui-même caractérisé par un rapport  $\alpha/\beta$  spécifique. Le calcul de la BED prend ainsi en compte le nombre de fractions, la dose par fraction ainsi que le rapport  $\alpha/\beta$  caractéristique du tissu en question :

$$BED = nd (1 + d / (\alpha/\beta))$$

n = Nombre de fractions ; d = Dose par fraction

Outre ces diverses considérations mathématiques, lors de la planification d'un traitement en radiothérapie, plusieurs volumes doivent être déterminés pour définir la zone à irradier. Le volume tumoral macroscopique (GTV, *Gross Tumor Volume*) tout d'abord, correspond à la zone tumorale observable par imagerie scanner ou IRM. Le volume-cible clinique (CTV, *Clinical Target Volume*) ensuite, inclut le GTV ainsi que les extensions tumorales infracliniques non détectables par l'imagerie mais connue de par l'évolution classique de la pathologie. Le volume-cible planifié (PTV, *Planned Target Volume*) prend lui de plus en compte l'incertitude de positionnement ainsi que les potentiels mouvements des

organes et du patient. Le volume traité est celui qui reçoit effectivement la dose de traitement et il doit ainsi correspondre au plus près au PTV. Enfin, la zone irradiée correspond à la zone à traiter plus les tissus à proximité recevant une dose partielle (figure 7). On peut ainsi déterminer les surfaces exposées à par exemple 80%, 50% ou 25% de la dose totale.



**Figure 7 : Les différents volumes-cibles en radiothérapie**  
(www.edimark.fr)

En plus d'être nécessaire pour traiter au mieux le volume tumoral, la détermination de ces volumes est également indispensable pour protéger les organes à risques (OAR), c'est à dire les tissus sains situés à proximité de la tumeur. Ceux-ci peuvent être de radiosensibilité variable mais leur tolérance à l'irradiation constitue la principale limite dans la détermination de la dose délivrable à la tumeur. C'est pourquoi il est fondamental de connaître quels sont les tissus sains présents à proximité directe de la zone à traiter et quelles sont leurs tolérances respectives face aux rayonnements ionisants. Dans l'ensemble, les OARs peuvent être regroupés en trois catégories : ceux très radiosensibles (œil, ovaire, testicule), ceux moyennement radiosensibles (intestin grêle, cœur, poumon) et enfin ceux étant peu radiosensibles (os, muscle, gros vaisseaux) (tableau 1). Par ailleurs, certains organes assurent des fonctions vitales et doivent donc impérativement rester fonctionnels après irradiation (tronc cérébral, moelle, poumon, cœur), alors que d'autres assurent des fonctions non vitales mais doivent être préservés afin de maintenir la qualité de vie après le traitement (glandes salivaires, intestin, œil, os). Pour chaque protocole de radiothérapie il faut donc identifier quels sont les organes potentiellement exposés aux rayonnements, quelles doses maximales ils peuvent supporter et pour quel volume de tissu concerné, ceci afin de restreindre au maximum les risques d'effets secondaires. D'autre part, pour savoir quel impact réel les

rayons peuvent avoir sur un organe, il convient également de prendre en compte son organisation macroscopique, et donc son fonctionnement « en série » ou « en parallèle ».

	<b>Organes/tissus</b>	<b>Conséquences</b>
<b>Organes très radiosensibles/ lésions sévères pour des doses faibles</b>	<b>Œil/Cristallin</b>	Cataracte, survenue tardive 3 à 6 ans
	<b>Ovaire</b>	Stérilité et castration temporaire ou définitive
	<b>Testicule</b>	Stérilité temporaire ou définitive selon la dose
	<b>Rein</b>	Néphrite radique, fibrose
	<b>Foie</b>	Hépatite radique, fibrose
<b>Organes radiosensibles</b>	<b>Rectum</b>	Rectite radique, fibrose
	<b>Intestin grêle</b>	Grêle radique, perforation, fibrose
	<b>Côlon</b>	Sténose ou parfois perforation
	<b>Cœur</b>	Péricardite constrictive
	<b>Poumons</b>	Insuffisance respiratoire, fibrose
	<b>Moelle épinière</b>	Myélite radique
	<b>Peau</b>	Radiodermite
<b>Organes peu radiosensibles</b>	<b>Os</b>	Fragilité osseuse, fracture, ostéoradionécrose
	<b>Muscle</b>	Sclérose et rétraction musculaire
	<b>Gros vaisseaux</b>	Sténose responsable d'accidents ischémiques
	<b>Tissu conjonctifs</b>	Fibrose radique

**Tableau 1 : Principaux organes à risque en radiothérapie. D'après le Guide des Procédures en Radiothérapie Externe 2007, Cancérologie pour le Praticien 1986**

Afin d'avoir une efficacité maximale du traitement sur les cellules cancéreuses tout en ayant un impact minimal sur les tissus sains adjacents, il y a donc plusieurs paramètres à définir lors de la définition d'un protocole de radiothérapie : la dose totale, la dose par fraction et le volume total à irradier. Ces paramètres dépendent de la nature du cancer, des OARs à proximité ainsi que de l'utilisation ou non d'autres thérapies. Ce dernier point est d'ailleurs un facteur d'augmentation du risque de développer des effets secondaires. En effet, il est connu que l'utilisation concomitante de la chimiothérapie et de la radiothérapie augmente par exemple la toxicité tardive après chirurgie conservatrice du cancer du sein<sup>33</sup>. Ajoutés à cela,

d'autres facteurs individuels rentrent également en jeu : la radiosensibilité individuelle et les facteurs de comorbidité. Concernant le premier cas, l'existence de facteurs de prédisposition génétique semble se vérifier avec notamment les cas d'hypersensibilité aux rayonnements ionisants chez des patients souffrant d'Ataxie Telangiectasie. Cette pathologie héréditaire est causée par la présence de mutations dans certains gènes essentiels aux mécanismes de la réparation de l'ADN (comme le gène ATM, *Ataxia Telangiectasia Mutated*), ce qui explique qu'elle soit associée à des phénomènes d'hyper-radiosensibilité<sup>34,25</sup>. A propos des comorbidités, le diabète, l'hypertension, les maladies inflammatoires chroniques du tube digestif (maladie de Crohn ou Rectocolite Hémorragique) ou encore des maladies héréditaires du collagène sont ainsi des exemples de pathologies induisant un risque accru d'apparition de lésions radio-induites<sup>34</sup>. Enfin, l'âge peut également être un facteur aggravant. Chez les patients atteints de cancer pulmonaire, on observe une augmentation du risque de pneumopathies radio-induites sévères chez 34,4% chez des patients âgés de plus de 70 ans contre 18,2% pour des patients plus jeunes<sup>34</sup>. De manière plus générale, il est important de souligner que la présence de ces facteurs de prédisposition ne modifie pas fondamentalement la cytotoxicité des rayonnements mais interviendrait dans une ou plusieurs étapes du processus pathologique.

Concernant la dose à délivrer, celle-ci dépend de la nature du cancer et de l'association ou non de la radiothérapie à d'autres méthodes de traitement. Ainsi, dans le cas des cancers du poumon, les doses varient généralement de 50 à 70 Gy pour les cancers non à petites cellules et sont approximativement de 60 Gy pour ceux à petites cellules localisés au thorax. En fractionnement conventionnel, les doses sont délivrées en cinq séances hebdomadaires de 1,8 à 2 Gy par séance. Pour les cancers mammaires, la gamme de dose utilisée est comprise entre 45 et 54 Gy selon une fréquence de 4 à 5 séances par semaine avec des fractions allant de 2 à 2,5 Gy. Enfin, des doses de 30 à 40 Gy sont classiquement délivrées pour traiter les lymphomes du médiastin selon le même type de fractionnement que pour le poumon. Pour l'ensemble de ces irradiations thoraciques, le poumon est à chaque fois un OAR et les doses de 20 Gy et 30 Gy ne doivent respectivement pas être dépassées sur des volumes pulmonaires supérieurs à 35% et 20% ( $V_{20} \leq 35\%$  et  $V_{30} \leq 20\%$ ) (tableau 2). Dans le cas des cancers mammaires ces limites sont encore plus drastiques avec  $V_{20} \leq 15\%$  et  $V_{30} \leq 10\%$ <sup>35</sup>.

OAR	Tumeur	Dose/Volume conseillé
Larynx/pharynx	Tête et cou Tractus aérodigestif haut	MD 40 à 45 Gy Dose max < 63-70 Gy
Poumon	Poumon Médiastin Sein	V20 < 30-35% DMP < 20-23 Gy
Cœur	Lymphome Sein Poumon gauche	Cœur entier < 30 Gy

**Tableau 2 : Principaux organes à risque en radiothérapie thoracique**

(Guide des Procédures en Radiothérapie Externe 2007, Cancérologie pour le Praticien 1986.)

L'ensemble de ces données est cependant valable pour le cas d'une irradiation avec un traitement normofractionné. En effet, en cas d'hypofractionnement pour une irradiation en conditions stéréotaxiques, les contraintes sont différentes. En cas d'un traitement en une séance unique, la dose doit être strictement inférieure à 7.4 Gy pour un volume pulmonaire concerné de 1000 mL ( $D_{1000 \text{ mL}}$ ) ou 7 Gy pour 1500 mL ( $D_{1500 \text{ mL}}$ ). Pour des traitements nécessitant trois ou cinq séances, les  $D_{1000 \text{ mL}}$  doivent respectivement être inférieures à 12.4 Gy et 13.5 Gy, et les  $D_{1500 \text{ mL}}$  inférieures à 11.6 Gy et 12.5 Gy. Enfin, le V20 ne doit en aucun cas dépasser les 10%<sup>36</sup>.

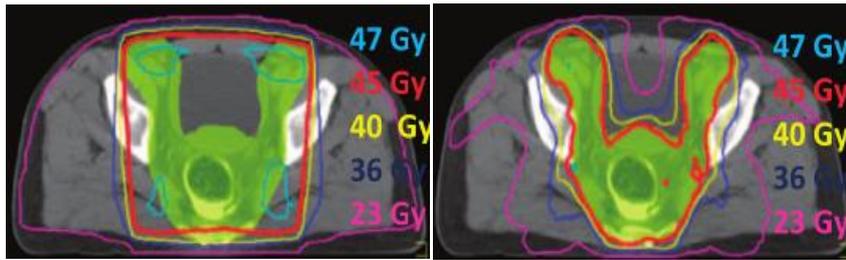
Enfin, la sévérité des toxicités peut être classée selon leurs conséquences plus ou moins sévères, selon le même principe pour tous les organes. C'est ce que l'on appelle le CTCAE (*Common Terminology Criteria for Adverse Events* ; <http://ctep.cancer.gov>). Il existe ensuite des observations spécifiques à chaque OAR.

- Grade 1 (légère) : n'affecte pas l'activité quotidienne habituelle du patient. Signes ou symptômes ne nécessitant le plus souvent aucun traitement.
- Grade 2 (modérée) : perturbe l'activité quotidienne habituelle du patient. Nécessite le plus souvent un traitement médical ambulatoire sans interruption du traitement par irradiation.
- Grade 3 (sévère) : empêche l'activité quotidienne habituelle du patient. Nécessite un traitement avec hospitalisation et/ou un arrêt du traitement supérieur ou égal à 4 jours.
- Grade 4 (très sévère) : menace le pronostic vital. Impose des mesures de réanimation.
- Grade 5 (décès) : complication mortelle.

## 5. Les différentes techniques en radiothérapie

### A. Les radiothérapies champ large en trois dimensions

A la vue de l'ensemble de tous ces paramètres, de grandes précautions sont donc nécessaires lors de l'usage de la radiothérapie. Heureusement, au cours des dernières années d'importantes avancées en terme de balistique ont permis de diminuer considérablement le volume de tissus sains irradiés lors du traitement en permettant de cibler précisément la tumeur, d'assurer un meilleur contrôle tumoral et d'améliorer la survie des patients ainsi que leurs conditions de vie. La technique de radiothérapie utilisée en routine actuellement est la 3D-CRT (*Three-Dimensional Conformal Radiation Therapy*). Celle-ci permet grâce à de l'imagerie scanner (et éventuellement d'autres techniques d'imagerie, comme l'IRM) et de la modélisation 3D, d'adapter le plus possible le volume irradié au volume tumoral. En plus de permettre une modélisation en trois dimensions de la tumeur, les logiciels offrent la possibilité de modéliser les rayons et la distribution de la dose dans l'espace, ce qui permet de limiter grandement l'irradiation des tissus sains. De la même façon, la radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (IMRT, *Intensity Modulated Radiation Therapy*) permet quant à elle de faire varier l'intensité des faisceaux au cours d'une même séance pour s'adapter à la forme de la tumeur. Ceci est possible grâce à l'ajout aux 4 mâchoires du collimateur conventionnel d'un collimateur multilames qui permet de moduler la fluence (l'intensité du faisceau) sur la morphologie tumorale. Ceci permet par exemple d'adapter le faisceau aux concavités présentes à la surface de la masse tumorale. Grâce à leur précision balistique, ces deux méthodes d'irradiation ont permis de diminuer le volume de tissus sains irradiés et ainsi d'améliorer la qualité de vie des patients traités par radiothérapie<sup>24,37</sup> (figure 8). Cependant, elles possèdent un certain nombre de limites. Dans le cas des irradiations thoraciques notamment, les mouvements dus à la respiration sont un réel problème. Pour pallier à cela, la radiothérapie asservie à la respiration a été développée. Ainsi, grâce à la méthode de *gating* les mouvements du thorax sont pris en compte de façon à enclencher le faisceau uniquement lorsque la tumeur est dans son axe. L'émission des rayonnements n'est donc pas continue, évitant ainsi une irradiation inutile et dommageable des tissus environnants. De la même façon, le *tracking* permet pour sa part au faisceau de suivre les mouvements de la masse tumorale dans l'espace, restant ainsi focalisé sur la cible ([www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr)).



**Figure 8 :** Comparaison des isodoses entre des irradiations 3D-CRT (à gauche) et IMRT (à droite) pour une dose totale de 45 Gy distribuée en fraction de 1,8 Gy (cancer de l’anus)  
(Liauw, Connell et Weichselbaum, 2013)

## **B. La radiothérapie en conditions stéréotaxiques**

Dans certains cas il est cependant nécessaire de traiter de très faibles volumes, en particulier pour les tumeurs cérébrales. Une haute précision est alors requise pour minimiser autant que possible l’impact sur les conditions de vie du patient. La radiothérapie stéréotaxique (SBRT, *Stereotactic Body Radiation Therapy*) permet de répondre à cette problématique. Grâce à l’utilisation de microfaisceaux convergents, de systèmes d’imagerie et de contention, il est possible de distribuer avec extrême précision une forte dose en une seule fois (radiochirurgie), ou en un faible nombre de fractions. La précision balistique permet l’utilisation de fortes doses par fraction (de 6 à 20 Gy, on parle de doses ablatives) avec un fort gradient de dose ce qui permet d’augmenter l’index thérapeutique entre la tumeur et les tissus sains. Un tel besoin est en particulier indispensable pour le traitement de tumeurs inopérables, des tumeurs cérébrales profondes ou bien des métastases au cerveau. Cette technique est utilisable pour les tumeurs de petite taille (en général < 3.5 cm de diamètre) et aux contours bien délimités. Le système Gamma Knife, développé à la fin des années 1960 par le neurochirurgien suédois Lars Leksell, fut le premier à permettre de réaliser de telles prouesses. Délivrant 201 microfaisceaux générés par des sources de Cobalt 60, le Gamma Knife est destiné au traitement de désordres cérébraux, de malformations artério-veineuses et de tumeurs intracrâniennes<sup>38,39</sup>. D’autres technologies ont par la suite vu le jour grâce à l’évolution des techniques d’imagerie et de balistique. Des accélérateurs de particules sont désormais capables de délivrer des traitements en conditions stéréotaxiques grâce à l’implémentation des machines avec des collimateurs micromultilames. De nouvelles machines dédiées à ce type de traitement continuent cependant de voir le jour. Ainsi, le CyberKnife est associé à un bras robotisé qui lui permet d’irradier selon tous les angles possibles de façon à concentrer les faisceaux sur la cible en épargnant les tissus alentours.

Bien que de façon globale l'ensemble de ces techniques soient essentiellement utilisées pour des tumeurs cérébrales, l'amélioration des techniques d'imagerie et de contention permettent désormais à d'autres organes tels que la colonne vertébrale ou les poumons d'en bénéficier également ([www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr) ; [www.cancer.ca](http://www.cancer.ca)).

Au cours des dernières années, l'utilisation de la radiothérapie stéréotaxique s'est nettement développée. On note en effet une augmentation de 10% entre 2010 et 2013 du nombre de centres la pratiquant. Au total ce sont d'ailleurs plus de 7000 patients qui ont pu bénéficier d'une telle technologie en 2013 (tableau 3). Bien que l'utilisation intracrânienne reste majoritaire, un tiers d'entre eux ont cependant été irradiés pour des tumeurs concernant d'autres organes (tableau 4), dont notamment une forte proportion de cancers bronchopulmonaires (tableau 5)<sup>40</sup>. Il est à noter que chaque année en France, 30 000 nouveaux cas de cancers pulmonaires sont diagnostiqués, dont 85% sont des cancers non à petites cellules (NSCLC, *Non-Small Cell Lung Cancer*). Dans 25% des cas, le diagnostic est précoce (stades 1 et 2), et la prise en charge thérapeutique consiste en une résection lobaire ou infralobaire par thoracotomie ou chirurgie mini-invasive. Cette technique est associée à un bon contrôle tumoral et une faible morbidité. Néanmoins, environ 40% des patients sont à risque chirurgical et considérés comme inopérables et depuis 10 ans, la radiothérapie stéréotaxique est proposée à ces patients<sup>41-43</sup>. Les fractionnements classiques en radiothérapie stéréotaxique pulmonaire sont de 4 x 15 Gy, 4 x 12 Gy ou encore 3 x 20 Gy sur 2 semaines de traitement (figure 9). L'excellent contrôle local obtenu avec la SBRT encourage de plus en plus l'utilisation de cette technique de radiothérapie, avec encore assez peu de recul sur sa toxicité<sup>44,45</sup>. Globalement, la toxicité majeure associée à la SBRT est la pneumonite radique (RP, *Radiation Pneumonitis*) que l'on retrouve également après radiothérapie conventionnelle et qui peut évoluer vers une fibrose radique à plus long terme. Le taux de RP symptomatique est de 10% à 20% de RP de grade 3 ou plus à 2 ans après SBRT<sup>46</sup>. Vu son efficacité sur le contrôle tumoral, des questionnements sont en cours sur une possible utilisation de la SBRT en première intention chez les patients opérables. Mais également sur la possibilité d'utiliser des champs plus larges pour traiter des tumeurs plus grosses, ce qui va dans le futur aboutir à un nombre croissant de patients concernés.

	2010		2011		2012		2013	
	Nb Centres	%						
Stéréotaxie intracrânienne	22	16 %	23	17 %	25	18 %	31	23 %
Stéréotaxie extracrânienne	20	15 %	23	17 %	29	21 %	35	26 %
Radiothérapie asservie à la respiration (149 centres)	34	23 %	33	22 %	34	23 %	36	24 %
Protonthérapie (148 centres)	2	1 %	2	1 %	2	1 %	2	1 %

**Tableau 3 : Evolution du nombre de centre ayant pratiqué les techniques**

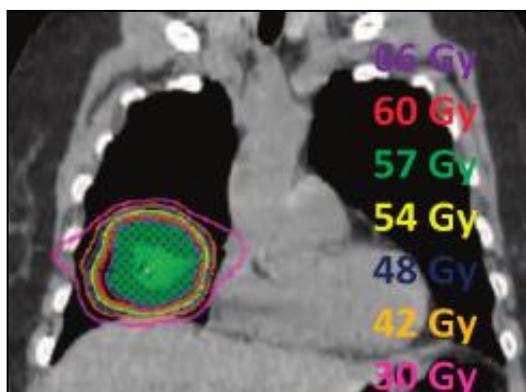
	Centres ayant pratiqué la technique dans l'année		Nombre total de patients
	Nombre	%	
Stéréotaxie intracrânienne	35	22 %	4 194
Stéréotaxie extracrânienne	38	23 %	2 888
Radiothérapie asservie à la respiration	38	23 %	980
Protonthérapie	2	1 %	745

**Tableau 4 : Techniques pratiquées dans les centres en 2013**

Localisations tumorales	Centres ayant pratiqué la technique dans l'année		Nombre total de patients
	Nombre	%	
Rachis	21	13 %	570
Bronchopulmonaire	36	22 %	1 336
Hépatique	23	14 %	391
Autres	23	15 %	1 771

**Tableau 5 : Localisation tumorales traitées par stéréotaxie extra-crânienne en 2013**

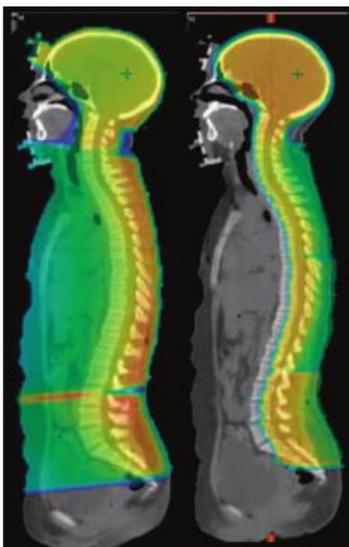
(Observatoire national de la radiothérapie – Situation fin 2013 et évolution depuis 2009-2015)



**Figure 9 : Exemple de répartition des doses pour une irradiation stéréotaxique de 60 Gy (12 Gy/fraction) dédiée au traitement d'un cancer pulmonaire**

(Liauw, Connell et Weichselbaum, 2013)

Malgré toutes ces innovations, certaines tumeurs peuvent cependant être difficiles à traiter à cause de phénomènes de radiorésistance. Une alternative était donc nécessaire pour éliminer de façon efficace les tumeurs inopérables présentant de telles caractéristiques. A la différence de la radiothérapie conventionnelle, l'hadronthérapie utilise les propriétés de particules chargées pour détruire les cellules tumorales<sup>47</sup>. Alors qu'à haute vitesse les ions interagissent peu avec la matière traversée, cette interaction est beaucoup plus forte à vitesse réduite. Les protocoles sont alors définis de façon à ce que les particules soient freinées juste avant la zone cible. Le maximum d'énergie est alors déposé sur une faible distance au cœur de la masse à traiter (figure 10). Cette propriété des ions est connue sous le nom de "Pic de Bragg".<sup>24</sup> La protonthérapie est ainsi utilisée en clinique, en particulier pour les tumeurs ophtalmiques chez l'adulte et différentes tumeurs pédiatriques. Elle concerne cependant peu de patients. En France, seuls les centres d'Orsay (Institut Curie) et de Nice (Centre Antoine Lacassagne) sont actuellement équipés de cette technologie mais d'autres seront également prochainement disponibles à Toulouse (Oncopôle) et à Caen (ARCHADE). Hormis les protons, les ions carbonés (carbonothérapie) peuvent également être utilisés. A l'heure actuelle en France, seul le site ARCHADE de Caen dispose d'un tel équipement. Celui-ci est toutefois uniquement à usage des activités de recherche ([www.france-hadron.fr](http://www.france-hadron.fr)).

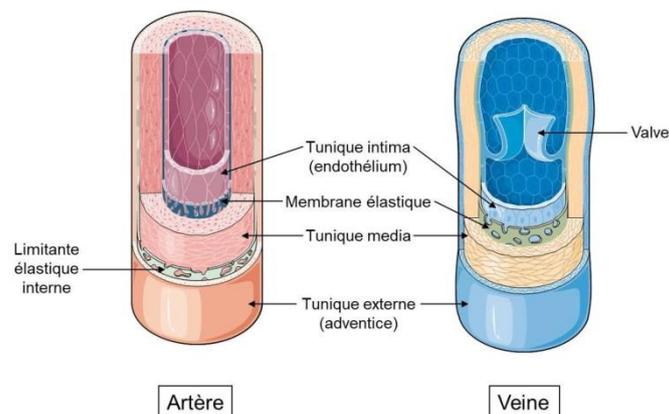


**Figure 10 :** Comparaison des volumes irradiés entre des radiothérapies crâniospinales photonique (à gauche) et protonique (à droite) pour une dose totale de 36 Gy délivrée en fractions de 1,8 Gy (Liauw, Connell et Weichselbaum, 2013)

## Chapitre II : Compartiment vasculaire et réponse aux rayonnements ionisants

### 1. Structure et composition du réseau vasculaire

Le système cardio-vasculaire a pour fonction d'alimenter les organes en oxygène et en nutriments via le sang, tout en permettant l'élimination des déchets du catabolisme cellulaire. Alors que le cœur assure une fonction de pompe qui permet la circulation pulsatile du sang, les vaisseaux jouent pour leur part un rôle de conduits. Parmi eux, les artères amènent le sang riche en oxygène du cœur vers les organes tandis que les veines permettent ensuite le retour du sang chargé en dioxyde de carbone vers le cœur. Tout au long du réseau, le diamètre des vaisseaux décroît et leur structure évolue en fonction de l'éloignement du cœur. Ainsi, les veines et artères sont composées de une à trois tuniques selon leur section (figure 11). La couche externe nommée adventice est formée par du tissu conjonctif (fibroblastes, collagène, fibres élastiques, etc). Cette tunique est uniquement présente dans les vaisseaux de gros calibre. La média est la couche intermédiaire des vaisseaux. Celle-ci est composée de cellules musculaires lisses (CML) et de constituants extracellulaires (élastine, collagène, etc.). On la retrouve dans l'ensemble des vaisseaux, exceptés les capillaires, mais sa composition est très variable en fonction de sa localisation dans la circulation. La capacité de contraction/relaxation des CML sous l'influence des fibres nerveuses présentes au sein de la média est à l'origine de la vasomotricité nécessaire à la régulation du flux sanguin. Enfin, la tunique interne, directement en contact avec le sang, est l'intima. Elle est composée d'une monocouche de cellules endothéliales, appelée endothélium, qui repose sur une lame basale. L'intima est la seule tunique conservée dans l'ensemble des vaisseaux sanguins dont les capillaires, section fine et perméable impliquée dans les échanges gazeux<sup>48</sup>.



**Figure 11 : Structure des artères et veines**

## **2. Rôles physiologiques de l'endothélium**

### **A. La perméabilité vasculaire**

Le rôle premier des vaisseaux sanguins est d'alimenter l'ensemble des tissus en O<sub>2</sub>, nutriments et hormones tout en permettant l'évacuation des produits du catabolisme cellulaire. L'endothélium, étant directement en contact avec le sang, il doit permettre de contenir le sang à l'intérieur des vaisseaux tout en laissant la possibilité à certaines molécules (et cellules) d'en sortir<sup>49</sup>. Il joue ainsi un rôle de filtre. Cette perméabilité vasculaire est notamment possible par l'intermédiaire des jonctions serrées (claudines et occludines) et adhérentes (VE-cadhérine). Bien que celles-ci permettent la continuité de l'endothélium, elles autorisent cependant le passage de certaines molécules. C'est la voie nommée paracellulaire. Une seconde voie, appelée transcellulaire, existe d'autre part pour le transport des macromolécules. Celle-ci met en jeu la formation de vésicules d'endocytose au niveau de la membrane luminale via la présence de cavéoles. Après transcytose, les macromolécules peuvent ainsi être exocytées au niveau de la membrane basale.

### **B. L'homéostasie vasculaire**

L'endothélium est connu pour posséder des propriétés anticoagulantes, anti-agrégantes et thromborésistantes médiées par divers mécanismes. L'inhibition de la coagulation met ainsi en jeu la synthèse de thrombomoduline, une protéine transmembranaire localisée au niveau de la membrane luminale de la plupart des cellules endothéliales. La thrombomoduline est capable de former un complexe avec la thrombine. En faisant cela, elle change le substrat de celle-ci et induit ainsi l'activation de la protéine C (anticoagulante), au lieu du clivage du plasminogène en plasmine (pro-fibrinolytique)<sup>50</sup>. L'inhibition de la voie de la coagulation intervient de plus via l'action des héparanes sulfates, protéoglycanes présents à la surface des cellules endothéliales, capables de lier l'antithrombine III. Enfin, on peut également citer le rôle du TFPI (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*), exprimé à la surface des cellules endothéliales et inhibiteur des facteurs de coagulation Xa et VIIa<sup>51</sup>.

### **C. Le tonus vasomoteur**

La contractilité des vaisseaux sanguins est permise par la présence de cellules musculaires lisses au sein de la média. Celles-ci sont cependant régulées par divers mécanismes dont l'action de composés vasoactifs sécrétés par les cellules endothéliales à proximité. Parmi eux on retrouve ainsi plusieurs facteurs vasodilatateurs comme la

prostacycline (PGI<sub>2</sub>, prostaglandine I<sub>2</sub>), l'*Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor* (EDHF) et le monoxyde d'azote (NO). Ce dernier, produit en particulier par la eNOS (*endothelial Nitric-Oxide Synthase*) à partir de la L-arginine, est d'ailleurs le principal agent vasorelaxant<sup>52</sup>. Il va ainsi diffuser depuis les cellules endothéliales jusqu'aux cellules musculaires lisses où il va activer la GMP cyclique. Ce phénomène va aboutir au transfert des ions calciques du cytosol vers le réticulum sarcoplasmique des cellules musculaires et par conséquent inhiber leur contraction. Dans le cas de la vasoconstriction, les principaux facteurs impliqués sont l'endothéline-1 (ET-1), les prostaglandines, le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) et l'angiotensine II<sup>53,54</sup>.

#### **D. L'angiogenèse**

L'angiogenèse consiste en la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'une vascularisation déjà existante. Ce phénomène est notamment activé en réponse à l'hypoxie. Divers facteurs dont le VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Factor type A*) sont ainsi sécrétés par les cellules endothéliales en souffrance et vont agir sur les vaisseaux à proximité. Les cellules endothéliales activées vont ensuite proliférer et migrer après dégradation de la lame basale et de la matrice extracellulaire environnante. La formation d'un nouveau vaisseau par bourgeonnement a ainsi lieu. Il est à noter que la voie de signalisation delta/NOTCH est particulièrement importante au cours de ce processus pour permettre une angiogenèse contrôlée et éviter les bourgeonnements excessifs. D'autres acteurs fondamentaux de la néovascularisation sont les angiopoïétines 1 et 2, le PDGF (*Platelet-derived growth factor*) ou bien encore le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*)<sup>55</sup>. La formation de nouveaux réseaux vasculaires peut également être médiée par le recrutement, la différenciation et la prolifération des progéniteurs endothéliaux. On parle alors de vasculogenèse.

#### **E. La réponse immunitaire**

En plus d'être responsables de la perméabilité vasculaire, les cellules endothéliales sont également impliquées dans le recrutement des leucocytes au niveau des tissus lésés. Bien qu'elles assurent un rôle de barrière entre le sang et les tissus, des mécanismes moléculaires existent cependant pour permettre aux cellules immunitaires de passer d'un compartiment à l'autre. Ainsi, la quiescence des leucocytes est principalement assurée par la restriction de l'expression de molécules d'adhésion de type P-sélectine à la surface des cellules endothéliales<sup>56</sup>. Ces molécules sont en effet normalement séquestrées au sein de vésicules de sécrétion intracytoplasmiques appelées corps de Weibel-Palades (WPB, *Weibel-Palade*

*Bodies*). A l'état basal, il existe également une faible transcription des gènes codant pour l'E-sélectine, VCAM-1 et ICAM-1.

L'activation de l'endothélium nécessaire au recrutement des leucocytes peut avoir lieu selon deux façons. L'activation de type I, mise en place dans les premières minutes après un stimulus, est médiée par des récepteurs couplés aux protéines G. Le récepteur à l'histamine permet notamment l'augmentation du taux intracytoplasmique d'ions  $Ca^{2+}$ . Cela favorise ainsi l'exocytose des WPB et la libération de P-sélectine à la surface des cellules endothéliales. L'expression de cette molécule d'adhésion permet la capture des neutrophiles tandis les CAM (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, VCAM-2 et PECAM-1) interviennent ensuite pour leur extravasation à travers la barrière endothéliale. L'activation de type II se met en place en réponse à des stimuli pro-inflammatoires plus intenses et persistants. Le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 sont les médiateurs prototypiques de cette réponse et vont initier l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1<sup>57</sup>. De manière globale, le recrutement des leucocytes et l'intensité de la réponse inflammatoire sont plus soutenus dans le cas d'une activation de type II.

### **3. Réponse de l'endothélium vasculaire face aux rayonnements ionisants**

#### **A. L'apoptose endothéliale radio-induite**

La mort des cellules endothéliales est un des événements importants ayant lieu après irradiation et conduisant à une sévère altération tissulaire. Le rôle précis joué par l'apoptose endothéliale radio-induite dans l'apparition des lésions est cependant encore très controversé. Paris et al., tout d'abord, ont mis en évidence en 2001 une implication majeure de ce processus dans l'induction du syndrome gastro-intestinal (SGI) radio-induit. Ils ont en effet démontré qu'après une irradiation corps entier à 15 Gy chez la souris, l'apoptose endothéliale induite par la voie des céramides précède la perte du compartiment souche épithélial. L'utilisation de souris déficientes pour la sphingomyélinase acide a pour sa part permis de confirmer cette observation. Alors que chez ces souris l'apoptose endothéliale radio-induite est limitée, une augmentation de la survie des cellules souches épithéliales et une protection vis-à-vis de l'apparition du SGI ont été mis en évidence<sup>58</sup>. Ceci est donc un argument fort démontrant que la perte de l'endothélium est l'évènement initiateur de la mort des cellules clonogéniques épithéliales.

Certains auteurs contestent cependant ce concept sur le principe que l'apoptose des cellules épithéliales peut être observée à des doses insuffisamment élevées pour induire de la mort endothéliale. De plus, une étude d'irradiation par Boron thérapie réalisée par Schuller et al. permet de conforter cette contradiction. Alors que leur technique permet une irradiation spécifique et à forte dose de l'endothélium, aucun impact sur la survie des cellules souches intestinales n'a toutefois pu être observé<sup>59</sup>. Ainsi, bien qu'il reste difficile de savoir si la mort radio-induite des cellules endothéliales est le processus initiateur des dommages tissulaires, la participation de l'apoptose endothéliale dans les effets délétères après irradiation reste indiscutable. Nous reparlerons de cela dans le chapitre suivant en nous intéressant aux effets des rayonnements ionisants sur l'endothélium pulmonaire.

### **B. L'activation de l'endothélium après irradiation**

L'activation de l'endothélium correspond à une augmentation d'expression des protéines participant à l'adhésion des cellules circulantes. Ainsi, diverses études ont notamment mis en évidence les rôles fondamentaux de PECAM-1, ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine et P-sélectine. Celles-ci ont en effet été retrouvées surexprimées par les cellules endothéliales irradiées lors d'études *in vitro*<sup>60-63</sup>. PECAM-1 en particulier a été démontrée par Gaugler et al. comme participant à l'adhésion et l'agrégation plaquettaire *in vitro* sur des cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HMVEC-L, *Human Lung Microvascular Endothelial Cells*) irradiées<sup>62</sup>. L'utilisation d'un anticorps anti-PECAM-1 permet d'inhiber l'adhésion des plaquettes sur ces cellules.

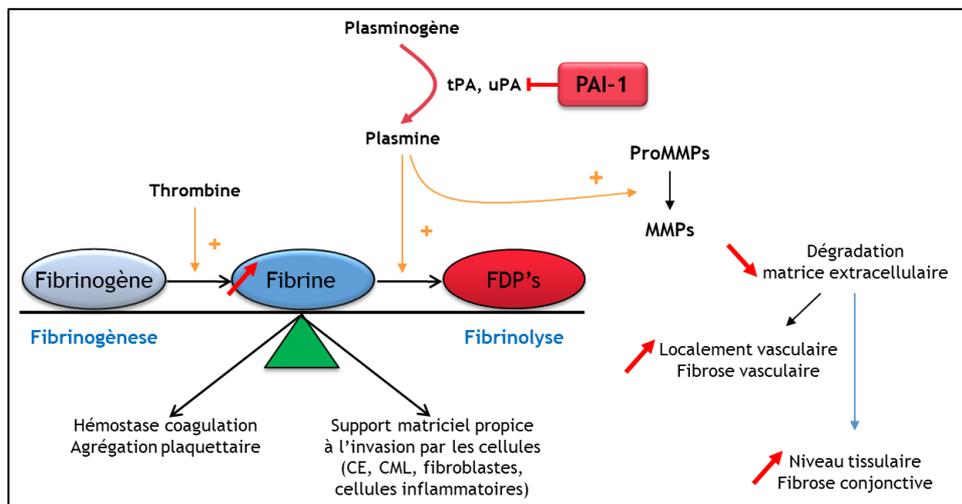
*In vivo*, quelques études se sont portées sur la modulation de certaines de ces protéines d'adhésion au niveau de l'endothélium pulmonaire irradié. Ainsi, Hallahan et al. ont mis en évidence une expression précoce d'ICAM-1 après une irradiation thoracique de 17,75 Gy. L'utilisation de souris invalidées pour cette protéine a pour sa part démontré que cette déficience est corrélée à une adhésion moins importante de cellules inflammatoires<sup>64</sup>. Ainsi, ICAM-1 participe au développement des lésions radiques pulmonaires. Les expressions de PECAM-1 et de VCAM-1 sont pour leurs parts augmentées jusqu'à 20 semaines après une irradiation à 8 Gy<sup>65</sup>.

L'ensemble de ces données démontrent l'importance des cellules endothéliales irradiées dans le recrutement des cellules immunitaires et l'inflammation via la surexpression de molécules d'adhésion. Ainsi, ICAM-1 et VCAM-1 en particulier semblent être des cibles intéressantes à prendre en compte dans la prévention des lésions radiques pulmonaires.

#### 4. Les acteurs vasculaires des dommages radio-induits aux tissus sains

##### A. Le Plasminogen Activator Inhibitor-type 1 (PAI-1)

PAI-1 est un inhibiteur des activateurs du plasminogène principalement produit par l'endothélium et faisant partie de la famille des inhibiteurs de protéases à sérine (SERPINE). Il est ainsi capable de bloquer les effets de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA, *tissue Plasminogen Activator*) et de l'urokinase (uPA). Il limite par conséquent la dégradation de la fibrine (fibrinolyse) ainsi que l'activation des MMP dépendantes de la plasmine, ce qui favorise les dépôts de matrice extracellulaire. PAI-1 est donc impliqué dans l'hémostase, la coagulation et l'agrégation plaquettaire<sup>66,67</sup> (figure 12).



**Figure 12 :** Conséquences de l'activation de PAI-1 sur l'équilibre fibrinogène/fibrinolyse et rôle dans la fibrose tissulaire.

PAI-1 est un des acteurs moléculaires d'intérêt étudiés post-irradiation au sein de notre laboratoire. La thèse d'Emilie Rannou en particulier a porté sur la caractérisation du rôle du *pool* endothélial de PAI-1 dans le développement de l'entérite radiée. Des souris C57BL/6 ont ainsi été irradiées à une dose de 19 Gy au niveau d'une anse intestinale. Ces travaux ont permis de mettre en évidence un effet protecteur d'une invalidation endothélium-spécifique de PAI-1 (PAI-1 KOendo) vis-à-vis de l'apparition des lésions intestinales radio-induites. Les souris PAI-1 KOendo développent des lésions de la muqueuse moins sévères (meilleur index pour les dommages cryptiques) trois jours post-irradiation que les contrôles (PAI-1<sup>flx/flx</sup>). Des signes de régénération de la muqueuse et une inflammation réduite de la tunique musculaire ont de plus été observés à J7. Cet effet radioprotecteur est d'autant plus intéressant qu'il est

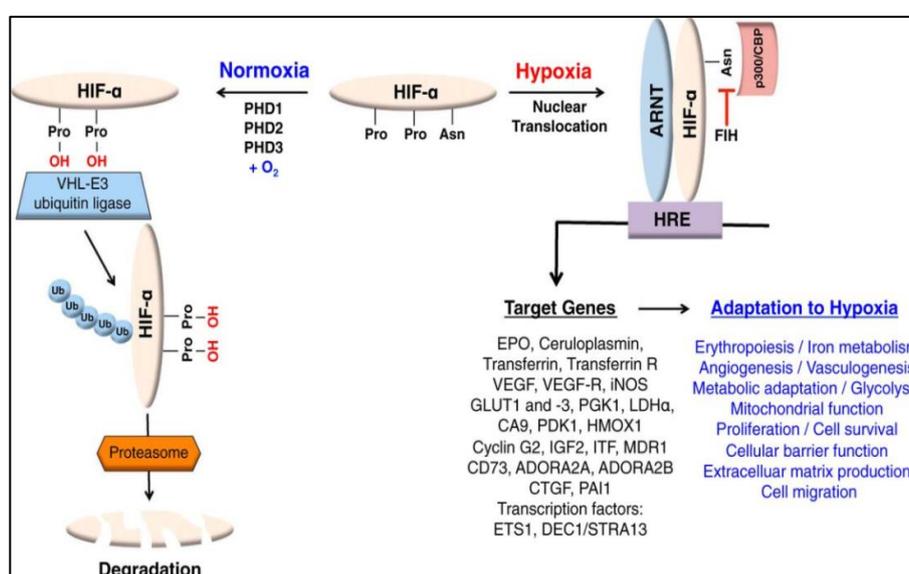
associé à une réduction de la fibrose tissulaire à J42 et une augmentation de la survie post-irradiation de ces animaux. Ce bénéfice peut-être expliqué via une apoptose radio-induite moins sévère au niveau des cellules épithéliales des cryptes intestinales<sup>11</sup>. Ces travaux du laboratoire sont aussi une preuve supplémentaire du rôle de l'endothélium vasculaire dans le développement des lésions radiques aux tissus sains.

Au niveau pulmonaire, Senoo et al. ont démontré l'implication de PAI-1 dans le développement de la fibrose pulmonaire induite par de la Bléomycine. En effet, l'instillation intranasale d'un siRNA spécifique de PAI-1 leur a permis de diminuer les dépôts de collagène au sein des tissus pulmonaires et d'augmenter la survie de leurs animaux<sup>68</sup>. Concernant les lésions pulmonaires radio-induites, Chung et al. ont pour leur part injecté une forme tronquée de PAI-1, rPAI-1<sub>23</sub>. Ils ont ainsi pu observer que contrairement aux animaux ayant reçu le véhicule, ceux traités au rPAI-1<sub>23</sub> ne présentent pas d'accumulation sous-pleurale de collagène 19 semaines après irradiation du thorax (5 x 6 Gy). Cela est d'ailleurs conforté via l'observation d'un marquage significativement plus faible d'hydroxyproline au niveau du poumon. En termes de survie, les individus contrôles meurent rapidement dès la 16<sup>ème</sup> semaine. Aucune mortalité n'a au contraire été observée après traitement au rPAI-1<sub>23</sub>. L'injection de cette forme tronquée induit d'autre part une accumulation de fibrine moins importante et une augmentation de la quantité des produits de dégradation de celle-ci. Ceci peut notamment s'expliquer par l'augmentation d'expression de MMP-3 chez ces animaux. PAI-1 étant connu pour être impliqué dans la sénescence, les auteurs se sont intéressés à l'induction de ce phénotype au niveau des pneumocytes de type II. Alors que ce phénomène est connu pour être dose et temps dépendant<sup>69</sup>, une réduction marquée du nombre de pneumocytes de type II sénescents a été mise en évidence via l'injection de rPAI-1<sub>23</sub>. L'inhibition directe de la sénescence radio-induite par cette molécule a été confirmée *in vitro* sur des cultures primaires de pneumocytes. Cette capacité du rPAI-1<sub>23</sub> à inhiber la sénescence pourrait d'ailleurs être expliquée par la réduction d'expression d'IGFBP-3, du TGFβ, d'IL-1β et d'IL-6. Enfin, bien qu'aucune différence n'a été observée dans le cas des neutrophiles et des lymphocytes T, un nombre significativement moins élevé de macrophages a été retrouvé au sein des tissus pulmonaires des animaux ayant reçu le rPAI-1<sub>23</sub><sup>70</sup>.

A la vue de l'ensemble de ces éléments il semblerait ainsi que PAI-1 puisse jouer un rôle important dans le développement des lésions radiques pulmonaires. Liu et al. ont d'ailleurs mis en évidence chez l'homme que certains variants génétiques de PAI-1 sont associés à un risque accru de développer des pathologies pulmonaires radio-induites sévères<sup>71</sup>.

## B. L'Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 $\alpha$ )

L'*Hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1) est un facteur de transcription composé de deux sous unités. Alors que HIF-1 $\beta$  est exprimé constitutivement, l'expression de HIF-1 $\alpha$  est pour sa part finement régulée par la disponibilité en dioxygène dans les tissus. En normoxie HIF-1 $\alpha$  est tout d'abord hydroxylé par les prolyl hydroxylases (PHDs), avant d'être complexé à l'oncosuppresseur VHL (Von Hippel-Lindau) puis d'être ubiquitinylé et adressé au protéasome où il est dégradé. En conditions hypoxiques les PHDs sont inhibées, HIF-1 $\alpha$  est transloqué dans le noyau et active la transcription de ses gènes cibles via sa liaison aux éléments de réponse à l'hypoxie (HRE, *Hypoxia-Response Element*)<sup>72</sup> (figure 13).



**Figure 13 : Rôles de HIF-1 $\alpha$**

(Pinelopi P. Kapitsinou, Volker H. Haase)

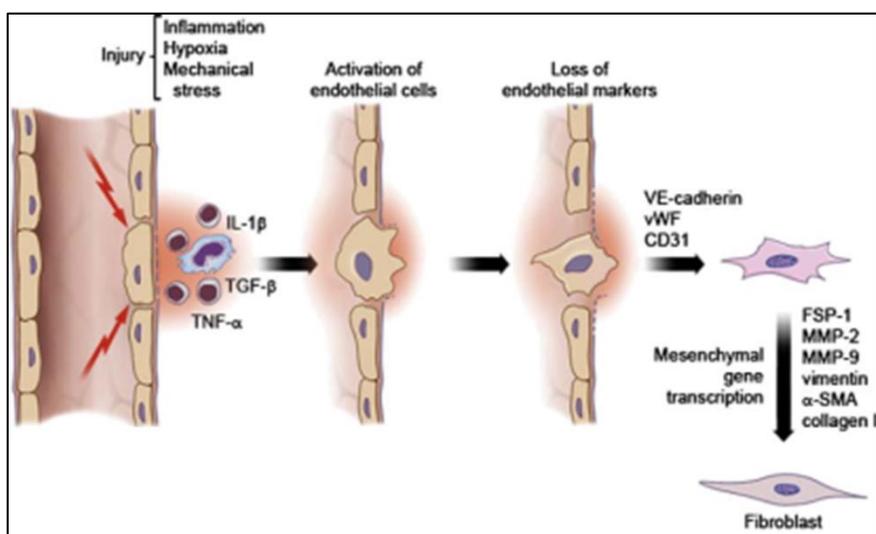
Bien que physiologiquement important, le rôle de HIF-1 $\alpha$  dans le développement de pathologies chroniques, notamment pulmonaires, n'est plus à démontrer. Dans un modèle préclinique de fibrose pulmonaire induite par la Bléomycine chez la souris, Ueno et al. ont ainsi mis en évidence que, induite par le TGF- $\beta$ , la sécrétion de PAI-1 par les macrophages alvéolaires est médiée par HIF-1 $\alpha$ <sup>73</sup>. HIF-1 $\alpha$  a de plus été démontré comme intervenant dans l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT, *Epithelial–Mesenchymal Transition*), processus connu pour participer au développement de la fibrose pulmonaire idiopathique (IPF, *Idiopathic Pulmonary Fibrosis*)<sup>74</sup>. Guo et al. ont ainsi suggéré un rôle délétère joué par l'hypoxie dans le développement de la fibrose pulmonaire induite par la Bléomycine via la promotion de l'EMT par la voie HIF-1 $\alpha$ –ZEB1 (*Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*)<sup>75</sup>. Yamazaki et al. ont de leur côté étudié le potentiel thérapeutique

d'un agent immunosuppresseur, la Cyclosporine A (CsA), pour le traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique. Ils ont ainsi démontré que la CsA est capable d'inhiber l'activation des fibroblastes en myofibroblastes ainsi que l'EMT induites *in vitro* par le TGF- $\beta$ 1, cet effet étant médié par la stimulation de la dégradation de HIF-1 $\alpha$ . L'effet inhibiteur de HIF-1 $\alpha$  par la CsA a de plus montré la capacité intéressante de provoquer la dédifférenciation de myofibroblastes dérivés de patients atteints d'IPF. Ce potentiel anti-fibrosant de la CsA a enfin été étudié *in vivo* sur un modèle de fibrose induite par la Bléomycine chez des souris C57BL/6. Les auteurs ont ainsi observé une amélioration notable vis-à-vis du développement de la fibrose pulmonaire par l'administration intratrachéale de CsA ou d'un inhibiteur de HIF-1 $\alpha$ <sup>76</sup>.

Contrairement aux cas de l'IPF et des modèles de fibrose pulmonaire induite par la Bléomycine, le rôle joué par HIF-1 $\alpha$  dans le développement des pneumopathies radiques est actuellement assez peu documenté. Rabbani et al. ont malgré tout observé une importante expression de HIF-1 $\alpha$  au niveau des zones lésées et des cellules inflammatoires dans les poumons de rats Fisher 344 après une irradiation hémithoracique de 40 Gy en fractionné (5 x 8 Gy). Les analyses immunohistologiques ont de plus révélé la présence concomitante à cette hypoxie d'un état inflammatoire et de stress oxydatif. Point intéressant, les auteurs avaient démontré lors d'une précédente étude un effet radioprotecteur induit par l'AEOL 10150 (antioxydant). Cet effet impliquait non-seulement une diminution du stress oxydatif mais également de l'expression de HIF-1 $\alpha$  et de ses cibles<sup>77</sup>. Ces données suggèrent ainsi un rôle délétère potentiel joué par HIF-1 $\alpha$  et initié par le stress oxydatif dans la mise en place des lésions radiques pulmonaires<sup>78</sup>. Enfin, le MnTE-2-PyP5+ (mimétique des superoxydes dismutases) a montré un potentiel intéressant vis-à-vis du traitement des lésions radiques pulmonaires. En effet, Gauter-Fleckenstein et al. ont observé après injection de cette molécule une réduction des lésions induites par une irradiation hémithoracique (28 Gy) de rats Fisher 344, que le MnTE-2-PyP5+ soit injecté dans les douze premières heures après l'irradiation ou au bout de huit semaines, lorsque les lésions sont établies. Cet effet radioprotecteur est associé à une diminution d'expression du TGF- $\beta$ , du VEGF-A et de HIF-1 $\alpha$ , et probablement lié à la suppression du stress oxydatif<sup>79</sup>. A la vue de l'ensemble de ces travaux, il semblerait que HIF-1 $\alpha$  puisse jouer un rôle important dans le développement des pneumopathies radiques. Une publication récente de Choi et al. est ainsi dédiée à l'investigation d'une inhibition de HIF-1 $\alpha$  vis-à-vis du développement des lésions radiques pulmonaires après irradiation en conditions stéréotaxiques<sup>80</sup>. Nous reviendrons plus précisément sur cela dans le Chapitre III.4.C.

### C. La transition endothélio-mésenchymateuse

La transition endothélio-mésenchymateuse (endoMT) est un processus au cours duquel les cellules endothéliales perdent progressivement l'expression de marqueurs endothéliaux et acquièrent l'expression de marqueurs mésenchymateux. Elles s'orientent ainsi vers un phénotype semblable aux fibroblastes/myofibroblastes ou aux cellules musculaires lisses (figure 14). En plus de ces changements, les cellules réalisant l'endoMT perdent leurs jonctions cellule-cellule et développent des capacités migratoires et invasives. A l'état physiologique, ce phénomène intervient dans la formation des valves cardiaques durant l'embryogenèse. Il est cependant ensuite uniquement retrouvé en conditions pathologiques, que ce soit par exemple dans le cas de l'hypertension pulmonaire chronique<sup>81</sup> ou bien de la fibrose cardiaque<sup>82</sup>.



**Figure 14 :** Transition endothélio-mésenchymateuse  
(Zeisberg *et al.* 2007a)

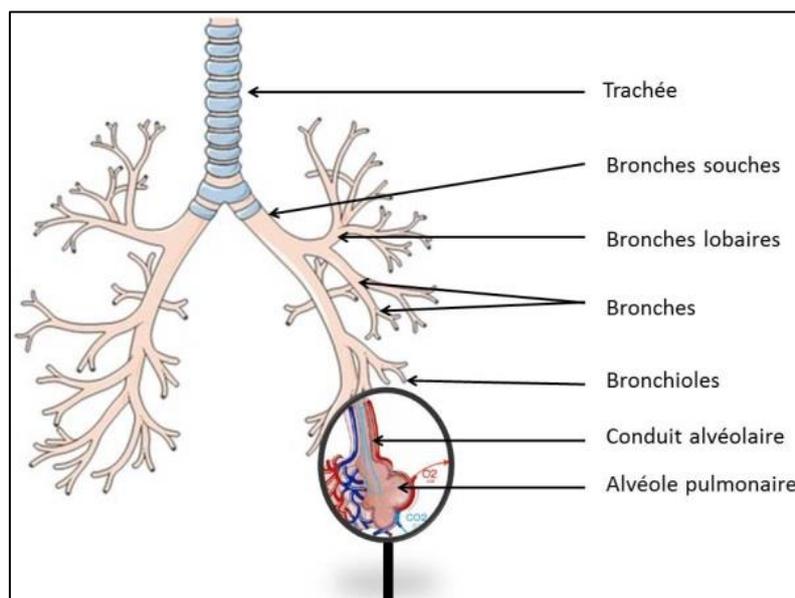
Dans un contexte radio-induit, il a été démontré au sein du laboratoire que l'endoMT participe au développement de la rectite radique. En effet la thèse d'Elodie Mintet a tout d'abord permis de mettre en évidence ce processus au sein de vaisseaux de la muqueuse et de la sous-muqueuse prélevés chez des patients souffrant de rectite radique (45 Gy, 1,8 ou 2 Gy/fraction ; résection chirurgicale 6 à 8 semaines post-radiothérapie). Au contraire, aucune co-localisation de l' $\alpha$ -SMA ( *$\alpha$ -smooth muscle actin*) et du facteur de von Willebrand (vWF, *von Willebrand Factor*) n'a pu être observée dans les tissus issus de rectums sains. Des souris Tie2-GFP, exprimant la *Green Fluorescent Protein* (GFP) sous contrôle du promoteur endothélial Tie2 (récepteur de l'angiopoïétine), ont par la suite été utilisées pour étudier l'endoMT *in vivo*. Des cellules en cours de transition endothélio-mésenchymateuse ont ainsi

été observées après une irradiation colorectale à 27 Gy, avec un pic de fréquence à 14 jours. Aucun co-marquage n'ayant au contraire été détecté chez les animaux non-irradiés. Cette étude met de plus en évidence une corrélation entre l'induction de ce phénomène et la voie canonique TGFβ/Smad. Ces résultats suggèrent par conséquent une implication du TGFβ et des Smad 2/3 dans l'induction de l'endoMT<sup>10</sup>. Dans un second temps, cette thèse a permis d'identifier un gène clé, Hey2 (*Hairy/Enhancer-of-Split Related with YRPW Motif Protein 2*), impliqué dans la réalisation de cette transition. Mintet et al. ont ainsi tout d'abord démontré la surexpression de ce gène chez des HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) réalisant l'endoMT *in vitro* après une irradiation de 10 Gy. L'importance de ce gène dans l'induction de ce processus a été confirmée par l'utilisation d'un plasmide permettant sa surexpression au sein d'HUVECs non irradiées. Celles-ci ont ainsi présenté une augmentation d'expression de SM22-α (Transgéline) et TGFβ2 d'une part, et une diminution de Tie1 et vWF d'autre part. De façon intéressante, la surexpression de Hey2 a également été retrouvée dans des prélèvements de patients souffrant de rectite radique. Enfin, l'inactivation spécifique de ce gène dans l'endothélium de souris a permis de réduire la fréquence de l'endoMT ainsi que la sévérité de la rectite radique induite *in vivo* par une irradiation colorectale de 22 Gy (article sous presse, voir Résultats – Article 3). Ces travaux mettent en lumière le rôle important que la transition endothélio-mésenchymateuse pourrait jouer dans le développement des fibroses radiques. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à ce phénomène comme marqueur des lésions radio-induites aux tissus sains au cours de cette thèse. Les connaissances actuelles sur les liens entre endoMT et pathologies pulmonaires radio-induites seront abordées au Chapitre III.4.C.

## Chapitre III : Physiologie, radiobiologie et radiopathologie pulmonaire

### 1. Appareil respiratoire et anatomie pulmonaire

Chez l'Homme, comme chez les rongeurs, les poumons sont les organes de la respiration. Nous en possédons deux, un gauche et un droit, respectivement composés de deux (supérieur et inférieur) et trois lobes (supérieur, moyen et inférieur). L'appareil respiratoire dans son ensemble est constitué d'une multitude de conduits de calibres variables permettant le transit de l'air depuis les fosses nasales jusqu'aux alvéoles, lieu des échanges gazeux avec le sang, et inversement. Ainsi, avant d'atteindre les poumons l'air doit tout d'abord passer par les voies aérophores extra-pulmonaires : les fosses nasales, le nasopharynx, le larynx, la trachée et la première partie des bronches souches. Les voies aérophores intra-pulmonaires commencent au niveau du hile pulmonaire, zone correspondant au point d'entrée des bronches souches à l'intérieur des poumons. Parmi elles on retrouve tout d'abord la seconde partie des bronches souches, puis les bronches lobaires, segmentaires, sus-lobulaires ainsi que les bronchioles intra-lobulaire et terminales (figure 15). Outre leur fonction de conduction des gaz, l'ensemble de ces voies aériennes a également pour rôle de réchauffer, humidifier et épurer l'air afin de faciliter les échanges d'oxygène et de dioxyde de carbone avec le sang<sup>83</sup>. D'un point de vue histologique, la composition des différentes tuniques entourant les voies aériennes évolue en fonction de leur position dans l'arbre trachéo-bronchique.



**Figure 15 :** L'arbre trachéo-bronchique

La trachée est composée de trois tissus circonférentiels<sup>84,85</sup> :

- Une muqueuse respiratoire formée par un épithélium cylindrique pseudo stratifié composé de quatre types cellulaires :
  - Cellules ciliées, abondantes et responsables de la clairance mucociliaire (action combinée du mucus et des cils pour éliminer les pathogènes)
  - Cellules caliciformes sécrétrices du mucus
  - Cellules basales : Petites cellules ayant un rôle de renouvellement cellulaire
  - Cellules neuroendocrines capables de détecter les variations en O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> et de sécréter des amines (ex : sérotonine)

La muqueuse est associée à un chorion riche en glandes mixtes (sécrétion endocrine et exocrine) majoritairement localisées dans la partie postérieure de la trachée et riche en nodules lymphoïdes.

- Une tunique cartilagineuse disposée en « fer à cheval » dont les extrémités sont reliées par le muscle trachéal.
- L'adventice, tissu conjonctivo-adipeux riche en vaisseaux et en nerfs.

Les bronches possèdent pour leur part cinq tuniques<sup>85</sup> :

- Une muqueuse correspondant à un épithélium respiratoire pseudo-stratifié cilié. Le chorion ne contient pas de glandes mais est riche en fibres élastiques.
- Une musculature composée de fibres musculaires lisses disposées en spirale qui forment le muscle de Reissessen.
- Une sous-muqueuse contenant des glandes mixtes séro-muqueuses impliquées dans les flux d'ions Cl<sup>-</sup>. Il est à noter que ceux-ci jouent un rôle particulièrement important dans la qualité du mucus sécrété. Des anomalies dans le transport des ions Cl<sup>-</sup> sont en effet la cause d'une hydratation insuffisante du mucus, comme dans le cas de la mucoviscidose.
- Une charpente cartilagineuse (plaques de cartilage reliées par un tissu conjonctivo-élastique).
- La péri-bronche, similaire à une adventice et contenant vaisseaux sanguins, lymphatiques et plexus nerveux.

Au fur et à mesure des divisions bronchiques le diamètre des différentes sections diminue, la lumière devient de plus en plus festonnée, l'épithélium est plus bas, il y a de moins en moins de cellules caliciformes, le chorion s'amincit et la charpente cartilagineuse se fragmente.

Les bronchioles possèdent quant à elles seulement trois tuniques :

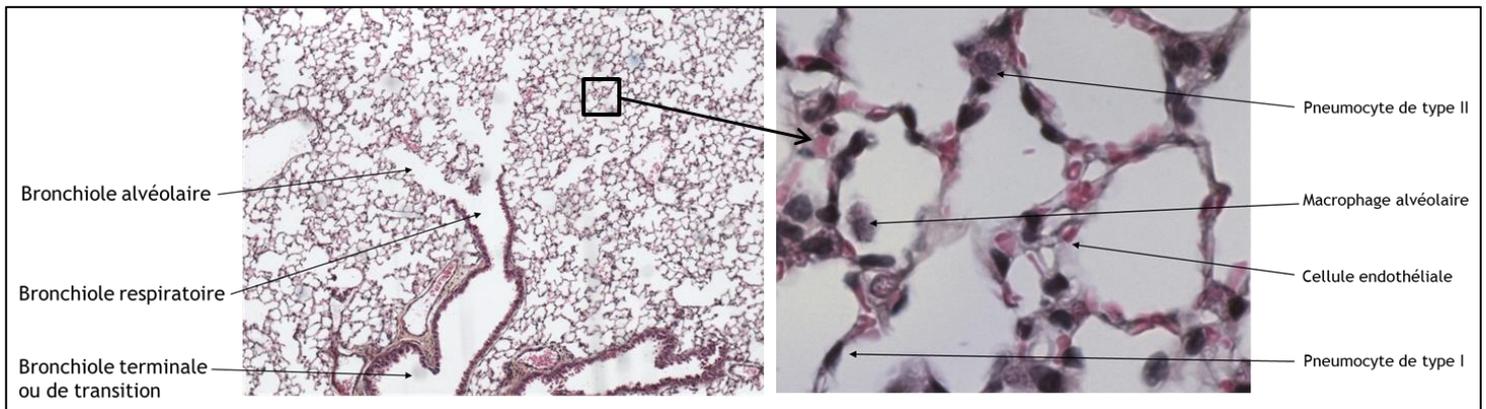
- Un épithélium très plissé dépourvu de cellules caliciformes et avec des cellules ciliées moins hautes et moins nombreuses. On note cependant de cellules endocrines et de cellules de Clara impliquées dans la sécrétion de composés tensio-actifs.
- La couche musculaire correspond à un muscle de Reissessen circulaire.
- La sous-muqueuse est très mince et ne possède pas de fonction sécrétoire de mucus.

Le parenchyme respiratoire correspond à la composante fonctionnelle des poumons. Il assure les échanges gazeux qui ont lieu dans les alvéoles (figure 16). Mais avant d'arriver jusque-là l'air doit encore passer par les bronchioles respiratoires (fortement similaires aux terminales mais dont la paroi est interrompue par des alvéoles) et les canaux alvéolaires qui sont formés par les orifices des alvéoles et les bourrelets alvéolaires. Ces derniers définissent un épithélium cubique constitué de cellules de Clara et de nombreuses fibres musculaires lisses circulaires (sphincters permettant la fermeture des alvéoles en aval). Les alvéoles, regroupées en sacs, sont des cavités polygonales séparées les unes des autres par une fine cloison (septa) constituée des épithéliums alvéolaires et de capillaires sanguins. Le passage de l'air entre les différents sacs alvéolaires est possible via les pores de Kohn. Cette organisation en une multitude de sous-unités indépendantes correspond à la définition d'un organe structuré en parallèle comme énoncé dans le chapitre I. L'épithélium des alvéoles est continu et composé de deux types cellulaires :

- Les pneumocytes de type I sont des cellules aplaties possédant un noyau ovalaire allongé et un cytoplasme très fin (voile cytoplasmique) permettant le passage des gaz dissous<sup>86</sup>. Bien qu'ils ne représentent que 40% des cellules des alvéoles, ils couvrent cependant 90% de leur surface.
- Les pneumocytes de type II sont de forme pyramidale avec un noyau central et arrondi. Ils représentent 60% des cellules mais seulement 10% de la surface

alvéolaire. Ils sont responsables de la sécrétion continue du surfactant à l'intérieur de la lumière de l'alvéole<sup>87</sup>. Le surfactant est un composé tensioactif complexe (constitué de lipides, phospholipides et protéines) indispensable à la respiration. Celui-ci permet en effet d'éviter un collapsus alvéolaire lors de l'expiration. Un déficit en surfactant est la cause de la maladie des membranes hyalines du nouveau-né prématuré, et participe aussi au syndrome de détresse respiratoire aiguë chez l'adulte.

La barrière alvéolo-capillaire (<1 µm d'épaisseur) est donc composée du cytoplasme des pneumocytes de type I, de l'endothélium capillaire, d'une lame basale commune à ces deux types cellulaires et de surfactant. Cette proximité entre l'air et le sang permet la diffusion passive de l'oxygène depuis la lumière des alvéoles vers les capillaires, et inversement pour le dioxyde de carbone. Des macrophages résidents sont présents au sein de la lumière alvéolaire pour nettoyer celle-ci des particules et bactéries qui pourraient s'y trouver et perturber la respiration<sup>88</sup>.



**Figure 16 : Anatomie du parenchyme pulmonaire**

## **2. Physiologie pulmonaire**

Le rôle des poumons est d'approvisionner les tissus en oxygène via le sang tout en permettant l'élimination du dioxyde de carbone. Pour cela, la respiration est répartie en cinq étapes : la ventilation pulmonaire, les échanges gazeux alvéolo-capillaires, le transport de l'oxygène et du dioxyde de carbone via le sang, les échanges gazeux hémato-cellulaires et la respiration cellulaire. Nous nous focaliserons ici sur les deux premiers mécanismes, impliquant les poumons.

## **A. La ventilation pulmonaire**

La ventilation pulmonaire correspond à la quantité d'air arrivant jusqu'aux alvéoles. Celle-ci dépend fortement de la résistance à l'écoulement des gaz des voies aériennes de conduction (en amont des bronchioles respiratoires). Pour calculer la résistance de l'arbre trachéo-bronchique on utilise l'équation :

$$R = (P_1 - P_2) / V'$$

$P_1$  : Pression au niveau de la bouche ;  $P_2$  : Pression au niveau des alvéoles ;  $V'$  : Débit gazeux

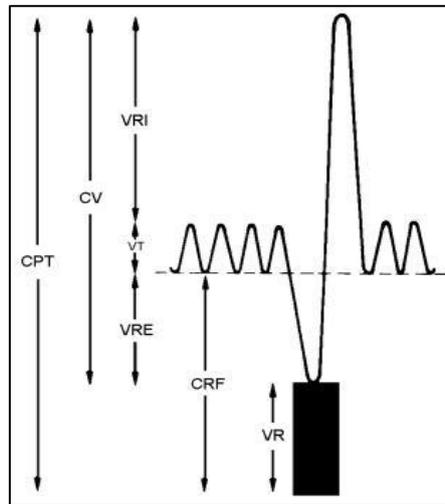
La résistance des bronches est de plus proportionnelle à leur longueur et inversement proportionnelle à leur rayon à la puissance quatre. La moindre réduction du calibre de la lumière bronchique (par une inflammation de la muqueuse par exemple) a donc des répercussions importantes sur la résistance à l'écoulement des gaz dans les bronches. De tels phénomènes surviennent ainsi notamment pour des pathologies comme l'asthme ou la broncho-pneumopathie chronique obstructive. Les alvéoles pouvant être considérées comme des petites sphères, la pression à l'intérieur de celles-ci peut être calculée à l'aide de la loi de Laplace :

$$P = 4T/r$$

$P$  : Pression dans l'alvéole ;  $T$  : Tension de surfaces sur les parois ;  $r$  = Rayon de l'alvéole

Lorsqu'on s'intéresse à la fonction pulmonaire, plusieurs paramètres sont à prendre en compte. Le volume courant ( $V_T$ ) correspond au volume d'air entrant et sortant des poumons à chaque cycle de ventilation. Cependant la totalité de ce volume ne parvient pas jusqu'aux alvéoles et une partie reste dans les voies de conduction. On parle alors de volume mort ( $V_D$ ) et celui-ci est environ égal à 150mL chez l'adulte. Au contraire le volume alvéolaire ( $V_A$ ) correspond à la quantité d'air parvenant aux alvéoles perfusées. Ainsi,  $V_T = V_D + V_A$ . Le débit ventilatoire ( $V'$ ), évoqué précédemment, définit le débit de gaz entrant ( $V'_I$ ) et sortant ( $V'_E$ ) des poumons. Il peut être mesuré au nez ou à la bouche et on admet que  $V'_I = V'_E$ . Lors d'une inspiration forcée, un volume d'air supérieur au  $V_T$  peut être inspiré. On appelle ce supplément le volume de réserve inspiratoire ( $V_{RI}$ ). De même lors d'une expiration forcée, un volume d'air supplémentaire peut être expiré par rapport à une expiration normale. On parle de volume de réserve expiratoire ( $V_{RE}$ ). A la fin d'une expiration forcée, un certain volume impossible à expulser reste dans les poumons, c'est le volume résiduel ( $V_R$ ).

A l'aide de ces différents volumes on peut ensuite déterminer différentes capacités. Ainsi, la capacité inspiratoire (CI) =  $V_T + V_{RI}$  ; la capacité vitale (CV) =  $V_T + V_{RI} + V_{RE}$  ; la capacité résiduelle fonctionnelle (CRF) =  $V_{RE} + V_R$  et la capacité pulmonaire totale (CPT) =  $V_T + V_{RI} + V_{RE} + V_R$  (figure 17).



**Figure 17 : Capacités et volumes pulmonaires**

## **B. Les échanges gazeux alvéolo-capillaires**

Lorsqu'il arrive dans les poumons l'air est composé de 21% d' $O_2$ , 0.04% de  $CO_2$  et 78% de  $N_2$ . Comme évoqué précédemment, les alvéoles pulmonaires sont le lieu des échanges gazeux avec le sang de par la faible épaisseur de la barrière alvéolo-capillaire. A ce niveau, l'oxygène présent dans l'air peut diffuser de façon passive à travers la barrière pour rejoindre la vascularisation (on parle de perfusion) où il se dissout. Ce phénomène est possible grâce à une différence de pression partielle entre les deux compartiments. Les gaz diffusent toujours de la pression partielle la plus élevée vers la moins élevée. Ainsi, la pression partielle de l'oxygène ( $PO_2$ ) au niveau des alvéoles ( $PAO_2$ ) est de 105 mmHg. Dans le sang, le gaz étant dissout, on ne parle pas de pression mais de tension. Ainsi, le sang carbonaté (pauvre en oxygène) a une tension en  $O_2$  équivalente à 40 mmHg et le sang hématosé (riche en  $O_2$ ) à 100 mmHg. Concernant l'évacuation du  $CO_2$ , les tensions dans le sang carbonaté et hématosé sont respectivement de 46 et 40 mmHg. La  $PACO_2$  est pour sa part équivalente à 40 mmHg.

Hormis ces gradients de pression, d'autres facteurs sont également fondamentaux pour permettre la bonne diffusion des gaz. Ainsi, plus la surface est grande et plus l'épaisseur de la barrière est faible, plus les possibilités d'échanges sont importantes. Chez l'adulte, la surface du système respiratoire est d'environ 80 à 100  $m^2$  et, comme évoqué précédemment,

l'épaisseur de la barrière alvéolo-capillaire est inférieure à 1  $\mu\text{m}$ . Enfin, deux autres paramètres jouent de plus un rôle déterminant, le temps de contact (inférieur à 1 seconde) et la constante de diffusion propre à chaque gaz.

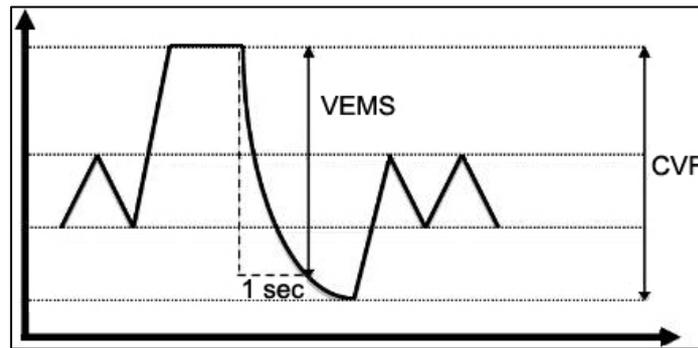
Une fois les échanges gazeux effectués, l'air est expiré et sa composition approximative en sortie est : 16%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$  et 79%  $\text{N}_2$ .

### **C. Explorations fonctionnelles respiratoires (EFR)**

Lorsqu'un patient est atteint d'une affection de l'appareil respiratoire, l'utilisation d'un ou plusieurs tests est souvent nécessaire pour déterminer quelle est la pathologie sous-jacente<sup>89</sup>. Ainsi, plusieurs tests sont disponibles à la fois chez l'Homme et la souris.

#### **1. Chez l'Homme**

Le test le plus généralement utilisé lorsqu'on veut s'intéresser aux capacités respiratoires est la spirométrie. Cette technique permet de déterminer les volumes d'air mobilisés par les mouvements respiratoires et les débits ventilatoires. Elle est particulièrement adaptée pour mettre en évidence les pathologies obstructives et restrictives (asthme, broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), etc.). Lors de cet examen le patient doit tout d'abord respirer normalement dans un embout relié à un capteur permettant d'enregistrer les volumes d'air mobilisés lors de la respiration ainsi que le débit maximum du souffle. Le médecin demande ensuite au patient de réaliser une inspiration maximale suivie d'une expiration complète et rapide. Cette manœuvre est répétée plusieurs fois. Les principales valeurs obtenues sont la Capacité Vitale Forcée (CVF) et le Volume Expiratoire Maximal par Seconde (VEMS) (figure 18). La CVF correspond au volume d'air expulsé avec force jusqu'au volume résiduel à partir de la capacité pulmonaire totale. Le VEMS représente pour sa part la quantité d'air expulsé durant la première seconde d'une expiration rapide et forcée, réalisée après une inspiration maximale. Le coefficient de Tiffeneau peut être calculé par le rapport de la VEMS sur la CVF. Ce test peut être réitéré après inhalation d'un bronchodilatateur pour tester l'efficacité d'un traitement potentiel. Si une amélioration des valeurs est observée, cela montre que les bronches du patient ont encore la capacité de se dilater et qu'il est donc bénéfique pour lui de se voir prescrit un tel traitement.

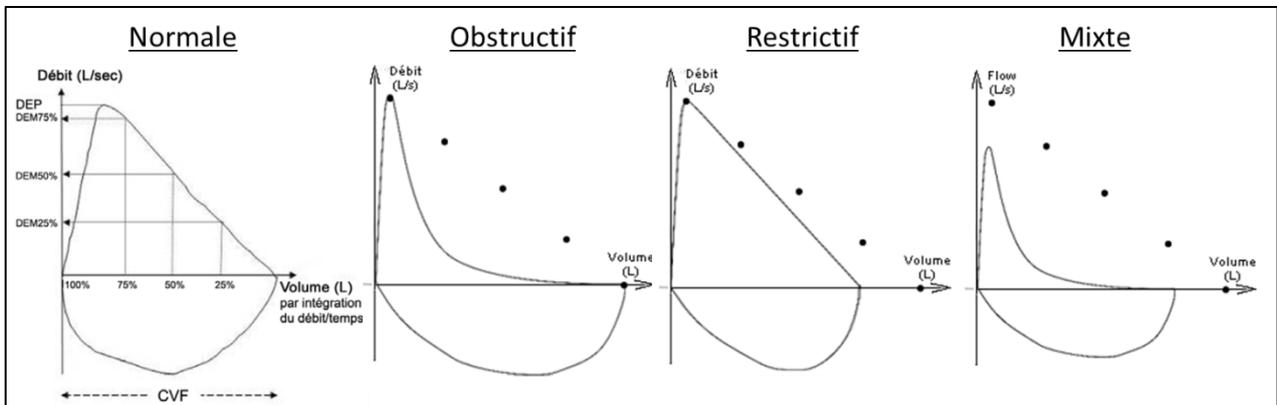


**Figure 18 :** VEMS et CVF

Pour aller plus loin, les spiromètres débitmétriques peuvent fournir une courbe (ou boucle) débit-volume. Les débits expiratoires figurent au-dessus de l'axe horizontal alors que les débits inspiratoires sont au-dessous. A chaque cycle respiratoire une boucle débit-volume peut être dessinée. En fonction de la présence de pathologies obstructive, restrictive ou mixte, les deux parties de cette courbe sont affectées différemment. Ainsi chez les patients souffrant d'un syndrome obstructif (asthme ou BPCO) les petites bronches sont partiellement obstruées. L'air des hautes voies respiratoires pouvant être expiré normalement, le DEP (débit expiratoire de pointe) n'est pas affecté. Par contre chez ces patients l'air a tendance à sortir moins vite des petites voies respiratoires. Le débit est diminué. Sur la courbe le VEMS et le DEM25-75 (DEM = débit expiratoire moyen à x% de la capacité vitale) sont donc plus faibles. Ces patients présentent cependant souvent une CVF normale. Chez les patients présentant un syndrome obstructif plus sévère, des bronches de plus grand diamètre peuvent aussi être touchées. Dans ce cas la CVF est également affectée. Dans les deux cas le coefficient de Tiffeneau est inférieur à 70%. Cette diminution est d'ailleurs le principal élément permettant de diagnostiquer une pathologie obstructive. Dans le cas d'un syndrome restrictif, la courbe débit-volume a une forme normale mais avec un VEMS et une CVF diminués. Le coefficient de Tiffeneau peut ici être normal ou élevé (une valeur supérieure à 1,1 suggère une fibrose pulmonaire). Enfin, dans le cas d'un syndrome mixte l'allure de la courbe présente les caractéristiques des deux précédents syndromes évoqués. L'ensemble de ces paramètres sont donc diminués (figure 19).

La pléthysmographie est un examen se déroulant dans un caisson hermétique. Le principal avantage de cette technique est de pouvoir mesurer les volumes non-mobilisables. Ceci est permis par l'association de la spirométrie avec un capteur capable de détecter les variations de pression au sein cette enceinte. Le volume d'air et la pression dans la cabine sont ainsi connus. La pression exercée par le souffle du patient au niveau de l'embout buccal est

mesurée et le volume pulmonaire du patient est ensuite calculé via la loi de Boyle-Mariotte. Cet examen permet de déterminer la capacité pulmonaire totale (CPT), le volume résiduel (VR) ainsi que d'étudier les résistances bronchiques.



**Figure 19 :** Courbes débit-volume et syndromes pulmonaire  
(<https://www.spirometrie.info/cvf.html>)

Il est d'autre part possible de mesurer les échanges gazeux au repos. Une technique consiste notamment à étudier le transfert alvéolo-capillaire du monoxyde de carbone (CO). Après inhalation d'une quantité connue de CO, une apnée de dix secondes doit être réalisée avant l'expiration. En retranchant la quantité de CO expirée après l'apnée de la quantité inhalée, on peut ainsi calculer la quantité ayant diffusé. Le transfert du CO explore le système respiratoire dans sa globalité (ventilation, diffusion, circulation, hémoglobine). Il dépend donc du volume alvéolaire (VA) disponible pour sa diffusion. Ceci conduit à utiliser également le rapport DLCO/VA ou KCO (coefficient de transfert du CO), DLCO étant le facteur de transfert de ce gaz. Pour la pratique on considère comme pathologique toute valeur de DLCO < 70% de la valeur théorique. En pathologie respiratoire, une altération du KCO oriente le diagnostic vers trois grandes pathologies :

- Maladies infiltratives pulmonaires diffuses (par atteinte de la membrane alvéolo-capillaire)
- Emphysème (distension des alvéoles via la destruction de leurs parois)
- Maladies vasculaires pulmonaires (embolie pulmonaire ou hypertension pulmonaire)

L'étude des gaz du sang artériel est également possible. Dans ce cas les médecins mesurent tout d'abord les pressions partielles en O<sub>2</sub> (PaO<sub>2</sub>) et CO<sub>2</sub> (PaCO<sub>2</sub>) ainsi que le pH.

La concentration en bicarbonates ( $\text{HCO}_3^-$ ) est ensuite calculée. Enfin, la saturation artérielle en oxygène ( $\text{SaO}_2$ ) est :

- Soit calculée à partir de la  $\text{PaO}_2$  sans tenir compte des caractéristiques de l'hémoglobine du patient (qui peut avoir une affinité anormale pour l' $\text{O}_2$ , ex : méthémoglobinémie)
- Soit mesurée directement, de même que la concentration en carboxyhémoglobine ( $\text{HbCO}$ ), en hémoglobine totale et en méthémoglobine ( $\text{MetHb}$ )

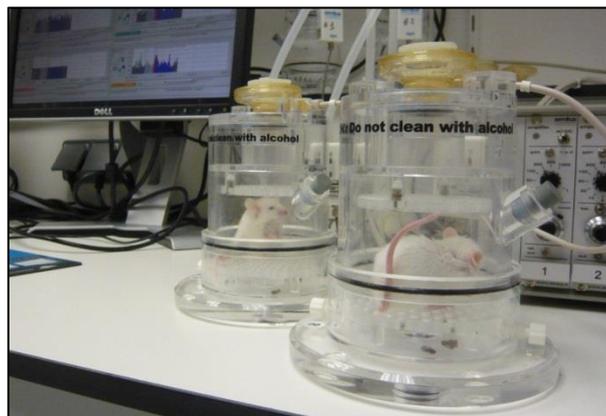
Cet examen est recommandé en cas de difficultés respiratoires (essoufflement, hypo ou hyperventilation, asthme) ou dans l'objectif de surveiller le bon fonctionnement d'un traitement prescrit pour une maladie pulmonaire. Dans un contexte différent il permet d'autre part de mesurer le niveau acido-basique de patients souffrant d'une insuffisance cardiaque ou rénale, de troubles du sommeil, d'une infection ou après une overdose de drogue.

Lorsqu'un patient souffre d'essoufflement et que le médecin veut en déterminer l'origine, il peut prescrire au patient la réalisation d'un test à l'effort. L'une des méthodes est de le réaliser à l'aide d'une bicyclette ergométrique. Après un échauffement de quelques minutes, la charge est progressivement augmentée jusqu'à atteindre la capacité maximale du patient. La vitesse est pour sa part maintenue constante. Via cet examen, en plus de paramètres biologiques et cardio-respiratoires, les médecins peuvent avoir accès à la consommation d' $\text{O}_2$ , la production de  $\text{CO}_2$  ainsi qu'aux volumes respiratoires. Une autre méthode est le test de marche. Celui-ci est prescrit lorsque les patients souffrent d'essoufflement à la locomotion. Il consiste à faire marcher le patient à un rythme soutenu pendant six minutes avec surveillance de la fréquence cardiaque et de la  $\text{SpO}_2$  (saturation en oxygène du sang artériel). La distance parcourue par le patient dans le temps imparti est relevée ainsi qu'une note sur dix représentant son niveau d'essoufflement (échelle de Borg). La fréquence cardiaque et la  $\text{SpO}_2$  sont mesurées à l'aide d'un oxymètre de pouls (au doigt ou au lobe de l'oreille).

## 2. Chez la souris

Bien que certains tests dédiés à l'étude de la fonction respiratoire chez l'humain puissent être adaptés aux modèles murins, il y a toutefois des différences non-négligeables à prendre en compte.

Comme pour l'Homme, la pléthysmographie corps entier est une technique classiquement utilisée pour l'étude des fonctions respiratoires chez la souris (figure 20). Celle-ci est placée, vigile et non-restreinte, dans une chambre capable de détecter les variations de pression induites par la respiration spontanée de l'animal. Il est ainsi possible d'avoir accès à des paramètres généraux comme la fréquence respiratoire, le volume courant (estimation) et le volume d'air inhalé ou exhalé par minute. D'autres paramètres plus spécifiques peuvent également être étudiés comme : la durée de la phase d'inspiration ou d'expiration, une estimation des flux inspiratoires et expiratoires maximaux ainsi que le Penh (« *enhanced Pause parameter* »). Le principal avantage de cette technique est qu'elle peut être utilisée à plusieurs reprises sur les mêmes animaux pour suivre leur capacité respiratoire au cours du temps. Toutefois, la pléthysmographie sur animal vigile ne permet pas une étude directe des volumes pulmonaires. Ceux-ci étant déterminés via le suivi des variations de pression à l'intérieur de la chamber, des paramètres extérieurs comme la température ou l'humidité peuvent induire un biais. Ainsi, comme expliqué par Bates et Irvin, l'utilisation d'une technique non-restrictive se fait en contrepartie d'une moins bonne précision des mesures<sup>90</sup>.



**Figure 20 :** Enceinte de pléthysmographie corps entier chez la souris  
(<http://www.therassay.com>)

Pour pallier à cette limite, des tests impliquant une mesure directement au niveau du museau existent. Une pléthysmographie forcée permet ainsi d'obtenir des conditions proches de ce qui se fait en spirométrie chez l'humain. Ce test est cependant plus invasif puisqu'il nécessite que l'animal soit anesthésié et trachéotomisé. La respiration peut être laissée spontanée ou imposée par ventilation. On peut ainsi acquérir des données sur divers paramètres comme la capacité pulmonaire totale, le volume courant, le volume résiduel ou bien encore la capacité inspiratoire et le volume de réserve expiratoire. Un autre système utilisable chez la souris est l'utilisation de techniques d'oscillations forcées (FOT, *Forced Oscillations Technique*)<sup>91</sup>. Pour ce faire, l'animal doit également être placé sous ventilation. Des oscillations de pression sont alors appliquées à l'entrée des voies respiratoires et diverses mesures peuvent être obtenues selon le test effectué. Par exemple, dans une manœuvre d'oscillation forcée à fréquence unique, la réponse du sujet à une forme d'onde sinusoïdale est étudiée. On obtient ainsi des informations sur la résistance, la compliance (capacité à modifier son volume en réponse à une variation de pression) et l'élastance des poumons (capacité à résister à cette augmentation du volume).

Comme chez l'être humain, des mesures à l'effort sont également réalisables chez le rongeur. L'une des possibilités est de soumettre l'animal à un test d'activité forcée sur tapis roulant (figure 21). Après deux séances d'habituation à l'exercice, celui-ci est soumis à un protocole de course avec augmentation progressive de la vitesse (généralement +1cm/s par minute après une phase d'échauffement). L'exercice est interrompu lorsque l'animal atteint sa vitesse maximale et qu'il ne peut plus suivre la vitesse imposée par le tapis. L'association de ce dispositif avec des systèmes de mesure des taux d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> permet le suivi en temps réel du métabolisme de l'animal. C'est la mesure de la vitesse maximale qui a été utilisée au cours de ce projet de thèse.



**Figure 21 :** Tapis de course pour rongeurs

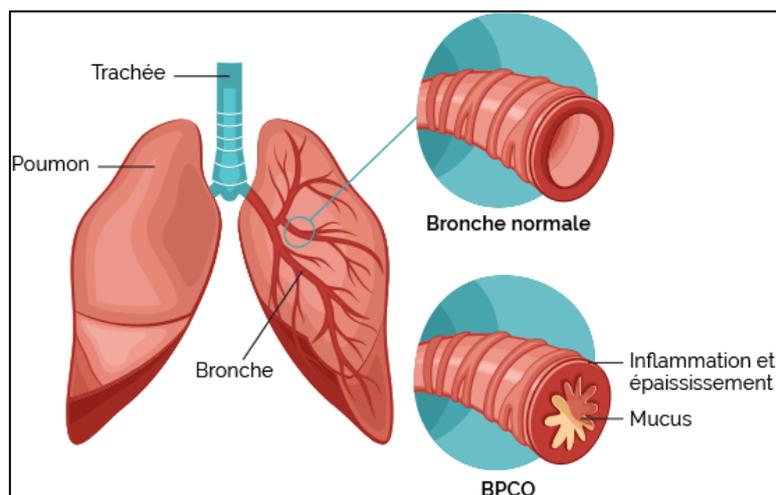
### 3. Pathologies pulmonaires

L'appareil respiratoire peut-être la cible de diverses affections, que ce soit au niveau trachéo-bronchique ou alvéolaire.

#### A. Au niveau trachéo-bronchique

La muqueuse trachéo-bronchique est exposée à de nombreux types d'agents nocifs d'origine chimique, virale ou bactérienne. Une exposition prolongée ou répétée à ces toxiques induit la mort des cellules de l'épithélium respiratoire et leur remplacement par un épithélium pavimenteux. On parle alors de métaplasie malpighienne.

Des agressions répétées de la muqueuse par la pollution, des allergies ou le tabac peuvent aboutir à l'installation d'une bronchite chronique. On retrouve alors un épaississement de la paroi bronchique, par augmentation en nombre et en activité des glandes séromuqueuses, et des couches musculaires. Cette pathologie est fréquemment associée à l'asthme et l'emphysème. Le premier combine une bronchoconstriction sévère et la production d'un mucus particulièrement visqueux tandis que le second correspond à une destruction des parois alvéolaires. Lorsque ces trois pathologies se développent chez un patient on parle alors de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO).



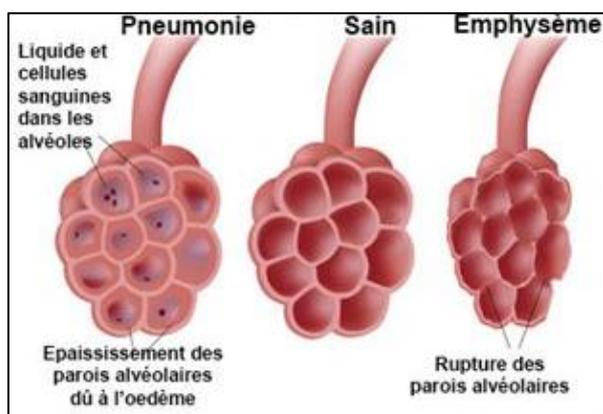
**Figure 22 : Illustration de la BPCO**

(<https://www.sante-sur-le-net.com>)

## **B. Au niveau alvéolaire**

Certaines pathologies peuvent induire une réduction de la quantité d'air dans les alvéoles, de la surface alvéolaire ou provoquer un épaissement des septa. Elles peuvent ainsi être à l'origine d'une oxygénation insuffisante du sang, d'une accumulation de CO<sub>2</sub> et d'un essoufflement. Ces affections peuvent classées selon trois types :

- La pneumonie lobaire est une infection bactérienne des alvéoles ayant une répercussion sur l'ensemble du lobe concerné. En réponse à la prolifération rapide du pathogène, l'organisme réagit en effet via une inflammation aiguë qui provoque l'apparition d'un exsudat liquide et cellulaire. Ce dernier empêche alors l'air de rentrer dans les alvéoles et réduit fortement l'oxygénation du sang.
- L'emphysème provoque une dilatation permanente des espaces aériques via la destruction des alvéoles, des canaux et des sacs alvéolaires. Cela réduit de façon importante la surface des échanges gazeux. Une perte du tissu de soutien élastique des bronchioles est également observée. Ce phénomène aboutit à leur collapsus et à la rétention de l'air.
- La fibrose interstitielle correspond à une augmentation du nombre et de l'activité des fibroblastes présents dans les septa alvéolaires. Il y a alors une accumulation de collagène et d'élastine entre la paroi des pneumocytes de type I et les capillaires sanguins, perturbant ainsi les échanges gazeux.



**Figure 23 :** Illustration de sacs alvéolaires affectés par une pneumonie ou un emphysème  
(<http://www.docteurcliv.com>)

### **C. Les cancers pulmonaires**

La grande majorité des tumeurs malignes primitives pulmonaires sont des carcinomes bronchiques. Leur développement est essentiellement dû à l'inhalation des substances carcinogènes contenues dans la fumée de cigarette mais d'autres facteurs sont aussi impliqués dans une moindre mesure. Parmi eux on retrouve notamment les radiations ionisantes, la pollution atmosphérique, l'amiante ainsi que d'autres minéraux comme le nickel ou le chrome. Une prédisposition génétique est enfin également possible. Les carcinomes broncho-pulmonaires peuvent classés en quatre catégories :

- Les carcinomes épidermoïdes différenciés sont la forme la plus courante des cancers primitifs pulmonaires. Ils débutent en général au niveau des bronches souches ou de leurs principales branches de division situées à proximité du hile. Leur développement est souvent lié à une métaplasie malpighienne préalable, due par exemple au tabac. Leur degré de différenciation est cependant fortement variable. Certains présentent des marques évidentes de kératinisation tandis que pour d'autres le type malpighien peut difficilement être mis en évidence.
- Les adénocarcinomes différenciés apparaissent généralement en périphérie pulmonaire, dans les petites bronches et bronchioles. Ils se développent en particulier à partir d'anciennes cicatrices fibreuses, dues par exemple à la tuberculose. Ils sont caractérisés par une organisation glandulaire acineuse, avec présence importante de mucus au sein des acini. Au sein de cette catégorie de tumeurs, les carcinomes bronchiolo-alvéolaires sont un sous-type rare. Ceux-ci se caractérisent par le fait qu'ils se développent le long des parois alvéolaires. L'épithélium est ainsi remplacé par des cellules cylindriques à gros noyau hyperchromatique.
- Les carcinomes à grandes cellules non différenciées sont constitués de grandes cellules épithéliales anaplasiques qui se regroupent en îlots ou en nappes. Aucun signe de kératinisation n'est observé, ni de ponts d'union intercellulaires ou de mucus intracytoplasmique. Cette catégorie comprend les carcinomes et adénocarcinomes ne présentant aucun signe de différenciation visible en microscopie optique.

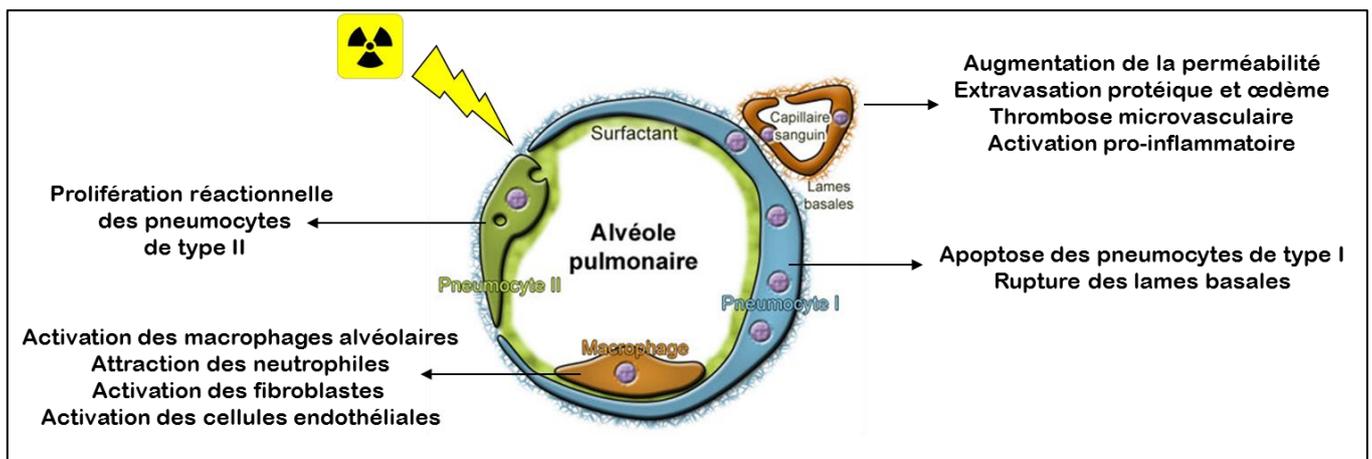
- Les carcinomes neuro-endocrines à petites cellules sont des tumeurs particulièrement agressives. Celles-ci ont en effet tendance à envahir rapidement et largement la paroi bronchique et le parenchyme l'entourant. Leur dissémination sanguine et lymphatique est de plus généralement précoce. Ces cellules tumorales possèdent d'autre part la capacité de sécréter des hormones peptidiques comme l'ADH (*Antidiuretic Hormone*) ou l'ACTH (*Adrenocorticotropic Hormone*). Ce phénomène est à l'origine de divers syndromes paranéoplasiques endocriniens. Les cancers à petites cellules représentent 20% à 25% de l'ensemble des cancers bronchiques et leur origine est en très grande majorité liée au tabac. Bien que ces tumeurs soient celles ayant la meilleure réponse à la chimiothérapie, elles sont cependant celles ayant le plus mauvais pronostic. Comme dit précédemment ces tumeurs sont en effet très agressives. Elles métastasent rapidement, principalement vers les os et la moelle osseuse, le foie, les glandes surrénales et le cerveau. Les rechutes précoces sont également très fréquentes. Par opposition, les trois autres types évoqués précédemment sont actuellement souvent regroupés sous l'appellation « cancers non-à petites cellules ».

D'un point de vue thérapeutique, la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie sont les principales armes pour lutter contre l'ensemble de ces différents cancers pulmonaires. La radiothérapie en particulier est utilisée lors du traitement de nombre d'entre eux. C'est pourquoi il est important de s'intéresser aux effets des rayonnements ionisants sur les tissus sains pulmonaires.

#### **4. Radiobiologie pulmonaire**

Au niveau pulmonaire, le complexe alvéolo-capillaire est particulièrement radiosensible à cause de la forte présence d'oxygène dans les poumons. Sous l'effet des rayonnements ionisants, il peut donc survenir une rupture de cette barrière via la destruction des cellules épithéliales (pneumocytes de types I essentiellement, ceux de type II étant plus radiorésistants) et des cellules endothéliales<sup>92</sup> (figure 24). Un tel mécanisme induit alors la sécrétion de facteurs de croissance, de protéases et de molécules pro-inflammatoires dans le milieu extracellulaire<sup>93</sup> ainsi que le recrutement de cellules immunitaires. Une première vague de sécrétion de cytokines est d'ailleurs observée chez la souris (12 Gy thorax entier) au cours des deux premières semaines sous l'effet des radiations, avant d'être suivie d'une seconde au

bout de 6 à 8 semaines<sup>94</sup>. La seconde phase est de plus associée à l'augmentation des taux de ROS et des dommages oxydatifs à l'ADN, à la baisse de la perfusion pulmonaire et à la formation de zones hypoxiques, et à l'augmentation du TGFβ1<sup>95</sup>. Ce même TGFβ1 stimulant l'afflux de fibroblastes et leur conversion en myofibroblastes pro-fibrosants, cette situation favorise par la suite l'apparition de l'hypoxie et donc la sécrétion de facteurs profibrogéniques et pro-angiogéniques. Dans un tel contexte il apparaît donc clairement que l'on se retrouve face à un cercle vicieux dont la résultante peut malheureusement être le développement de pathologies inflammatoires chroniques<sup>96</sup>.



**Figure 24 : Effets des radiations sur le compartiment alvéolo-capillaire**

### **A. Effets des radiations sur le compartiment épithélial**

Comme décrit dans le chapitre III-1, l'épithélium alvéolaire est constitué de deux types cellulaires : les pneumocytes I et II. Les premiers jouent un rôle de barrière tandis que les seconds interviennent dans la sécrétion du surfactant et servent de compartiment « souche » en réponse à une lésion. Dans le cadre d'une exposition à des rayonnements ionisants plusieurs phénomènes ont lieu.

L'apoptose des cellules épithéliales est connue pour jouer un rôle crucial dans le développement de la fibrose pulmonaire idiopathique<sup>97</sup>. Certaines équipes se sont donc intéressées à l'induction de ce mécanisme au sein de l'épithélium pulmonaire irradié. Zhang et al. ont ainsi observé une apoptose prédominante des pneumocytes de type I après une irradiation du thorax à 15 Gy chez la souris. Dans leur étude ils montrent que les pneumocytes de type II sont également affectés par ce phénomène mais dans une moindre mesure. Cela traduit la radiorésistance relative de ce type de cellules épithéliales. Les mécanismes

moléculaires à l'origine de l'induction de ce processus de mort cellulaire après irradiation ne sont pas encore clairement élucidés. Les auteurs évoquent dans ce cas une implication de la production d'espèces réactives de l'oxygène produites par la NADPH oxidase 4 (NOX4). Celles-ci seraient à l'origine d'une stimulation de la voie TGF $\beta$ 1 et ainsi de l'apoptose radio-induite<sup>98</sup>.

La sénescence est un autre mécanisme de mort cellulaire déterminant dans le développement de la fibrose radique pulmonaire. Citrin et al. ont en effet montré une induction importante de ce processus au sein de la population de pneumocytes de type II trente semaines après une irradiation thoracique pro-fibrosante à 17,5 Gy chez la souris. L'observation d'une diminution de cette population cellulaire dans le parenchyme pulmonaire à ce même temps suggère de plus que la sénescence contribue à cette déplétion. Celle-ci serait médiée via le stress oxydatif généré par les NOX. L'utilisation de DPI (Diphenyleneiodonium), un inhibiteur des NOX, permet en effet de bloquer l'apparition des cellules sénescents. Une des particularités des cellules sénescents est de pouvoir agir sur leur microenvironnement via un effet paracrine. Ainsi, la co-culture de pneumocytes préalablement exposés à une irradiation à 17,5 Gy avec leurs homologues non-irradiés est suffisante pour induire le déclenchement du phénotype sénescents chez ces derniers également. La mise en présence de fibroblastes NIH-3T3 avec du milieu conditionné issu de la culture de pneumocytes sénescents irradiés permet quant-à-elle d'induire leur prolifération et la production de collagène soluble. Cet effet n'est cependant pas présent lorsque l'activité NOX des pneumocytes de type II a été inhibée par du DPI<sup>69</sup>. Enfin, une publication récente de Pan et al. démontre qu'un composé, nommé ABT-263, est capable d'induire la mort des pneumocytes de type II sénescents via l'inhibition de Bcl-2/xl. Les auteurs démontrent de plus qu'une réversion de la fibrose pulmonaire radio-induite chez la souris est observable suite à ce phénomène<sup>99</sup>. Si ces observations sont confirmées dans le futur via d'autres études, cela pourrait être un premier pas important vers la détermination d'un traitement contre la fibrose radique pulmonaire.

Almeida et al. ont montré pour leur part une importante diminution de l'Aquaporine-5 (Aqp5, marqueur des pneumocytes de type I) dès un mois et jusqu'à cinq mois après une irradiation thorax entier fractionnée de 24 Gy chez la souris (6 Gy/fraction, 2 fractions/semaine pendant trois semaines). En parallèle de cela ils ont également observé une augmentation d'expression de la protéine C du surfactant (Prosurfactant protein C, pro-SFPC), spécifique des pneumocytes de type II. Ces résultats illustrent bien le fait qu'une

irradiation induit la mort des pneumocytes de type I et la prolifération conséquentielle de ceux de type II. Pour aller plus loin ils ont étudié les variations d'expression de la E-cadhérine et de la Vimentine, respectivement exprimées par les cellules épithéliales et mésenchymateuses. Leurs résultats mettent en évidence que dans les cinq mois suivant l'irradiation, il y a une perte d'expression du marqueur épithélial et une augmentation du marqueur mésenchymateux. Ces résultats suggèrent l'induction d'un phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse. Ceci a d'ailleurs été confirmé par une colocalisation de  $\alpha$ -SMA avec le pro-SFPC observée 14 semaines après une irradiation de 12 Gy en dose unique chez la souris<sup>92</sup>.

A la vue de l'ensemble de ces données, le compartiment épithélial du parenchyme pulmonaire et les pneumocytes de type II en particulier semblent ainsi déterminants dans le développement de la fibrose pulmonaire radio-induite.

## **B. Effets des radiations sur le compartiment mésenchymateux**

Le principal effet des rayonnements ionisants sur le compartiment mésenchymateux semble être dû aux mécanismes de communications cellulaires et à l'état inflammatoire généré par l'irradiation. Rubin et al. ont en effet démontré le rôle prépondérant de l'interaction à distance des macrophages, pneumocytes de type II et cellules endothéliales avec les fibroblastes. L'utilisation de milieux de culture conditionnés de macrophages irradiés leur a permis de mettre en évidence le rôle de certains facteurs inflammatoires sécrétés de façon paracrine par ces cellules. Le TGF $\alpha$  et le TGF $\beta$  en particulier ont été démontrés comme respectivement impliqués dans la prolifération des fibroblastes et leur sécrétion de collagène<sup>100</sup>. Le TGF $\beta$  est notamment connu pour favoriser l'activation des fibroblastes en myofibroblastes<sup>101</sup>, l'induction des transitions épithélio-mésenchymateuse<sup>102</sup> et endothélio-mésenchymateuse<sup>10</sup>. Nous reviendrons sur ces mécanismes dans la partie dédiée au rôle majeur joué par le TGF $\beta$  dans le développement des fibroses radiques. L'ensemble de ces mécanismes est ainsi à l'origine de la génération importante et chronique de myofibroblastes. Ces cellules se différencient des fibroblastes classiques par leur activité contractile due à la présence de fibres de stress ( $\alpha$ -SMA)<sup>103</sup>. Les myofibroblastes sont également plus actifs dans la production des collagènes I et III, majoritairement impliqués dans les processus fibreux. C'est pourquoi ces cellules font partie des acteurs majeurs impliqués dans le développement des lésions radio-induites chroniques.

### C. Effets des radiations sur le compartiment endothélial

Peu d'études se sont jusqu'à présent intéressées aux conséquences cellulaires d'une irradiation de l'endothélium pulmonaire. Quelques travaux *in vitro* permettent cependant d'avoir certains éléments de réponse. Ainsi, Panganiban et al. ont tout d'abord tenté de déterminer si une libération de lactate déshydrogénase (LDH) survenait après une irradiation de cellules endothéliales d'artère pulmonaire (PAEC, *Porcine Aorta Endothelial Cells*) à des doses de 2 à 50 Gy. Aucune libération significative n'ayant été détectée à 24h et 72h post-irradiation, ils ont pu conclure qu'aucune nécrose n'était induite chez les PAEC dans de telles conditions. Contrairement à cela, une induction de l'apoptose a pu être mise en évidence pour des doses supérieures ou égales à 10 Gy. Une augmentation significative des cassures à l'ADN a en effet pu être mise en évidence via le test des comètes à 24h et 48h post-irradiation. Le contexte apoptotique de ces cassures a pu être confirmé par l'étude de l'activité de la caspase-3. Alors que ces phénomènes concernent un nombre restreint de cellules, les auteurs ont cependant observé un arrêt de la prolifération pour plus de 99% des cellules exposées à 8 Gy. La réalisation d'un marquage à la  $\beta$ -galactosidase leur a ainsi permis de mettre en évidence l'induction d'un phénotype sénescence chez la majorité de ces cellules (85% des cellules marquées 120h après irradiation). Cette conclusion est validée par l'observation de divers paramètres : changements morphologiques caractéristiques (cellules de grande taille et aplaties), augmentation de l'expression de p21 et de Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*)<sup>104</sup>.

Bien que cette étude soit limitée à l'étude *in vitro* d'un seul type de cellules endothéliales pulmonaires, elle permet toutefois d'acquérir une meilleure connaissance des effets des rayonnements ionisants sur ce compartiment cellulaire. L'implication d'une dysfonction vasculaire dans le développement de pathologies pulmonaires radio-induites ayant été suggérée<sup>105</sup>, il paraît important de mieux cerner le devenir des cellules endothéliales irradiées. Pour illustrer plus encore cela, Marks et al. évoquent un paradigme au centre duquel les cellules endothéliales jouent un rôle clé. L'irradiation provoque la production de ROS à l'origine de lésions à l'ADN au sein des cellules endothéliales. Cette altération de l'endothélium provoque l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la formation d'œdème et l'accumulation de fibrine dans la matrice extracellulaire. Un état inflammatoire et l'apparition de zones hypoxiques sont la résultante d'une telle altération tissulaire. Ces deux phénomènes étant eux-mêmes à l'origine de nouvelles lésions tissulaires, notamment au

niveau de l'endothélium, c'est ainsi un cercle vicieux qui s'installe. Les cellules endothéliales sont ainsi au cœur de la mise en place d'une inflammation chronique<sup>106</sup>, d'où l'importance de mieux comprendre quels sont les mécanismes de mort et d'activation cellulaire ayant lieu dans l'endothélium irradié, et comment y pallier.

Ainsi, Fuks et al. ont mis en évidence une apoptose endothéliale radio-induite dans la microvascularisation pulmonaire de souris C3H/HeJ, 6h après irradiation du thorax, avec un effet maximal à 10h, ces cellules n'étant plus détectées au-delà de 24h car phagocytées par les macrophages alvéolaires. Ils ont de plus démontré qu'une injection intraveineuse de bFGF permet d'inhiber cette apoptose et ainsi d'induire un effet protecteur vis-à-vis du développement des lésions radiques pulmonaires<sup>107</sup>. Pour aller plus loin, Santana et al. ont ensuite étudié les acteurs moléculaires impliqués dans l'induction de ce mécanisme de mort cellulaire. Ils en ont ainsi conclu que celle-ci est ici majoritairement médiée par la sphingomyélinase acide (voie des céramides), et non-dépendante de p53. Ceci n'est cependant pas un mécanisme de réponse aux rayonnements ionisants commun à l'ensemble des organes. En effet, par exemple, l'apoptose endothéliale au niveau du thymus est pour sa part essentiellement médiée par la voie p53. La voie des céramides n'étant, dans ce cas, impliquée qu'à un moindre degré<sup>108</sup>.

Un autre phénomène pouvant survenir au sein des cellules endothéliales irradiées est l'induction de la transition endothélio-mésenchymateuse. Comme décrit dans le chapitre II, l'endoMT est un des mécanismes que nous étudions au sein du laboratoire. Au niveau pulmonaire, des travaux ont d'ores et déjà mis en évidence l'apparition de ce phénomène après une irradiation thoracique en conditions stéréotaxiques. Ainsi, Choi et al. ont étudié l'implication de ce phénomène dans le développement de la fibrose pulmonaire radio-induite. Pour cette étude des doses uniques de 90 Gy, 50 Gy et 20 Gy ont été utilisées, les deux premières étant délivrées via un collimateur de 3 mm de diamètre, et de 7 mm de diamètre pour la dernière. Ils ont démontré avec ces travaux une corrélation entre l'expression de HIF-1 $\alpha$  par les cellules endothéliales et la réalisation de la transition endothélium-mésenchyme. Leurs résultats suggèrent ainsi que l'hypoxie pourrait être l'une des causes induisant le déclenchement de ce changement phénotypique, et que celui-ci participe au développement de la fibrose radique pulmonaire. Les auteurs estiment donc que cibler l'hypoxie vasculaire radio-induite pourrait minimiser les lésions aux tissus sains via l'inhibition de l'endoMT<sup>80</sup>.

L'ensemble de ces données illustrent le fait que le compartiment endothélial est une cible de choix, mais encore mal connue, pour l'étude des lésions pulmonaires radio-induites.

## **5. Radiopathologie pulmonaire**

La radiothérapie est un outil indispensable de l'arsenal thérapeutique utilisé dans la lutte contre le cancer. Cependant, l'irradiation d'un patient n'est pas un acte anodin pour autant. En effet, les tissus sains situés à proximité de la tumeur sont également exposés aux rayonnements ionisants. Les patients peuvent alors développer des pathologies radio-induites plus ou moins sévères. Au niveau pulmonaire, celles-ci sont de deux types : les pneumonites aiguës et les fibroses.

### **A. La pneumonite aiguë radio-induite**

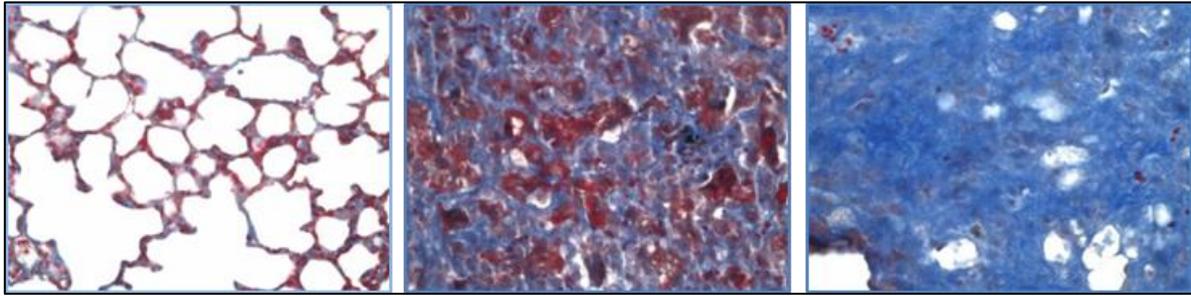
L'apparition d'une pneumonite aiguë concerne 50 à 80% des patients traités par radiothérapie. Celle-ci se développe dans les six à douze semaines après irradiation mais n'est pas systématiquement symptomatique. La pneumonite radique correspond à une inflammation des poumons, et en particulier des alvéoles. L'irradiation induit ainsi notamment l'apoptose des pneumocytes de type I et une augmentation de la perméabilité des capillaires sanguins. En conséquence de ces traumatismes, des œdèmes interstitiels et alvéolaires ainsi qu'un infiltrat intra-alvéolaire de cellules immunitaires peuvent alors se former. D'un point de vue clinique les patients peuvent alors présenter divers symptômes tels que de la toux, une dyspnée (difficulté respiratoire), de la fièvre, des gênes thoraciques et des douleurs pleurétiques.

### **B. La fibrose pulmonaire radio-induite**

La fibrose est une pathologie inflammatoire chronique correspondant à une cicatrisation anormale d'un tissu lésé. Lorsqu'un tissu est endommagé, l'atteinte des cellules résidentes (épithéliales et endothéliales notamment) induit la sécrétion de divers médiateurs de l'inflammation (facteurs vasoactifs, cytokines, chimiokines). Un processus de cicatrisation est alors initié. La formation d'un caillot de fibrine permet tout d'abord de stopper l'hémorragie due à une altération de l'endothélium vasculaire. C'est la coagulation. Ce dépôt de fibrine sert ainsi de matrice pour la migration cellulaire et l'adhésion plaquettaire. La dissolution de ce caillot laisse ensuite la place au tissu de granulation. Cette seconde phase est caractérisée par un recrutement massif de leucocytes. Les neutrophiles et macrophages peuvent alors nettoyer le tissu des débris cellulaires, cellules mortes et organismes exogènes. Ce microenvironnement pro-inflammatoire induit la différenciation des fibroblastes et

d'autres cellules résidentes en myofibroblastes, responsables de la sécrétion de la matrice extracellulaire. La formation de ce tissu de granulation est également caractérisée par la présence de nombreux capillaires sanguins nécessaires à l'apport de nutriments, d'hormones et de gaz respiratoires. La dernière étape de la cicatrisation concerne la migration et la maturation des cellules épithéliales et endothéliales. La matrice extracellulaire provisoire est dégradée par les métalloprotéinases matricielles (MMP : Matrix MetalloProteinases) une fois le remplacement des cellules lésées terminé. L'équilibre d'action entre les MMP et leurs inhibiteurs, les « *tissue inhibitors of metalloproteinases* » (TIMP) permet le contrôle de l'évolution de la matrice extracellulaire pendant le processus de réparation. Pour terminer, les myofibroblastes meurent par le phénomène d'apoptose déclenché par l'établissement d'une boucle d'activation négative<sup>109</sup>.

Cependant, dans certains cas ces processus ne se déroulent pas comme ils le devraient. La fibrose est ainsi définie par une accumulation de composants de la matrice extracellulaire agglomérés avec un exsudat non-résorbé (figure 25). Après irradiation, de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et facteurs de croissance sont produits par les leucocytes recrutés. Des facteurs pro-fibrosants tels que le TGF- $\beta$ 1 sont sécrétés en grande quantité par les cellules inflammatoires et participent au recrutement et à la différenciation de nouveaux myofibroblastes. Ceux-ci sont à l'origine d'une production massive de matrice extracellulaire, phénomène participant à la mort cellulaire ainsi qu'à l'installation d'une inflammation chronique. La présence importante de cellules immunitaires dans le tissu provoque des dommages répétés aux cellules résidentes par la production de radicaux libres oxygénés supplémentaires, la mise en place de réactions auto-immunes et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Les cellules immunitaires sont de plus les principales sources de métalloprotéinases. La modification du profil inflammatoire induit par conséquent un déséquilibre de la balance entre MMP et TIMP. Ce phénomène empêche alors la dégradation de la matrice extracellulaire excédentaire. Les contraintes mécaniques (rigidification du tissu) et les signaux pro-inflammatoires perpétuent le recrutement et la différenciation des myofibroblastes et des cellules immunitaires. C'est ainsi un cercle vicieux qui se met en place. La boucle d'activation chronique des myofibroblastes ainsi créée provoque un envahissement progressif du tissu par le processus fibrotique.



**Figure 25 :** Poumon sain (à gauche) et fibrosé à deux (au centre) et vingt semaines (à droite) après une irradiation stéréotaxique à 90 Gy. Marquage des collagènes au Trichrome de Masson (en bleu)

### **C. Données cliniques et thérapies des pneumopathies radiques**

L'incidence exacte des pathologies pulmonaires radio-induites n'est pas connue avec précision de par la variété des localisations des tumeurs primaires et de la façon dont ces pathologies sont répertoriées. Celles-ci peuvent en effet être uniquement décrites d'un point de vue radiographique ou bien être associées à des symptômes cliniques. Une des méthodes de classement des pathologies radiques pulmonaires est celui mis en place par le RTOG/EORTC (*Radiation Therapy Oncology Group/European Organization for Research and Treatment of Cancer*), qui distingue les pneumopathies radiques en 5 grades aigus et 5 grades tardifs.

RTOG/EORTC (lung **acute** radiation morbidity)

- Grade 1 : Symptômes légers, toux sèche ou dyspnée à l'effort.
- Grade 2 : Toux persistante nécessitant des narcotiques, agents antitussifs/dyspnée lors d'efforts minimes, pas de dyspnée au repos.
- Grade 3 : Toux sévère ne répondant pas aux narcotiques/antitussifs ou dyspnée au repos/évidence clinique ou radiologique de pneumonite aiguë/oxygène intermittent ou stéroïdes nécessaires.
- Grade 4 : Insuffisance respiratoire sévère/oxygène continu/assistance respiratoire
- Grade 5 : Décès directement lié à la pneumopathie radique

RTOG/EORTC (lung **late** radiation morbidity)

- Grade 1: asymptomatique ou symptômes légers (toux sèche) ; légères empreintes radiographiques
- Grade 2 : fibrose symptomatique modérée ou pneumonite (toux sévère) ; fièvre légère ; empreintes radiographiques en patches

- Grade 3 : fibrose symptomatique sévère ou pneumonite ; modifications radiographiques denses.
- Grade 4 : insuffisance respiratoire sévère/oxygène continu/assistance respiratoire.
- Grade 5 : Décès directement lié à la pneumopathie radique.

Une étude récente menée sur des patients traités par IMRT pour des lymphomes hodgkiniens ou non-hodgkiniens a démontré que 14% d'entre eux ont développé des pneumopathies radiques aiguës de grades 1 à 3<sup>110</sup>.

Les rapports dose-volume sont probablement les principaux paramètres à prendre en compte pour déterminer le risque de développer des pathologies radiques pulmonaires. En effet, l'impact d'une forte dose sur un faible volume pulmonaire est connu pour être moins délétère que celui d'une dose plus faible sur un volume plus important<sup>111</sup>. Graham et al. ont ainsi mis en évidence l'importance du V20 (volume de poumon recevant une dose de 20 Gy) dans le développement de ces pathologies<sup>112</sup>. Lors d'une étude réalisée chez des patients traités par radiothérapie en fractionnement conventionnel, ils ont observé un risque de développer une pneumopathie de grade 2 ou supérieur selon les rapports dose-volume suivants :

- V20 < 22% : 0% de risque à 24 mois
- 22% < V20 < 31% : 7% de risque à 24 mois
- 32% < V20 < 40% : 13% de risque à 24 mois
- V20 > 40% : 36% de risque à 24 mois

Se réduire à l'évaluation de ce paramètre est cependant réducteur. D'autres travaux comme ceux d'Allen et al. ont pour leur part souligné l'importance du V5. En effet, six de leurs treize patients traités par IMRT sont décédés d'une pneumopathie de grade 5 alors qu'ils présentaient un V20 acceptable. En comparaison entre les patients ayant survécu et ceux ayant succombé, des V5 de 90% et 98% ont respectivement été calculés. Leurs résultats ont de plus mis en évidence que la dose pulmonaire moyenne (*Mean Lung Dose*, MLD) doit également être prise en compte. Une MLD > 9.5 Gy étant corrélée à une augmentation significative du risque de développer une pneumopathie radique. Ainsi, considérer le V5 et la MLD en addition au V20 semble être indispensable<sup>113</sup>.

Concernant le cas des irradiations réalisées en conditions stéréotaxiques, celles-ci semblent induire une moins forte toxicité. En effet, Barriger et al. ont retrouvé seulement des

pneumopathies de grade 2 pour 7% de leurs patients, et de grades supérieurs chez 2.4%<sup>114</sup>. Cependant les connaissances sont moins étendues pour ce type d'irradiation et peu de recommandations sont définies pour les différents rapports dose-volume. La radiothérapie en conditions stéréotaxiques réduit fortement les volumes recevant des doses très fortes mais une attention particulière doit être apportée aux volumes recevant de l'ordre de 5 à 10 Gy. Ainsi, globalement, le V20 doit être inférieur à 10%, mais à adapter en fonction de la qualité du poumon, et les protocoles doivent aussi minimiser les volumes recevant 10 et 5 Gy.

Comme évoqué au Chapitre I.4, certains facteurs interindividuels et la présence de comorbidités (diabète, hypertension, etc.) peuvent favoriser le risque de pneumopathie radique<sup>34</sup>. De façon surprenante, le tabagisme sur la période de traitement semble être pour sa part corrélé à un effet protecteur vis-à-vis du développement des pathologies radiques pulmonaires<sup>115</sup>. Bien que ce phénomène ne soit pas encore clairement compris, certaines hypothèses ont cependant été avancées. Il serait ainsi possible que l'exposition au tabac inhibe la réaction inflammatoire induite par l'irradiation<sup>116</sup>. Une autre piste serait une possible augmentation d'expression dans les poumons d'un puissant antioxydant, le glutathione, due à la fumée de cigarette<sup>117</sup>.

Il est à noter qu'une précaution particulière doit être portée sur les possibles effets néfastes d'une thérapie concomitante. Ainsi, la Bléomycine, l'Actinomycine D et la Gemcitabine sont connues pour potentialiser l'effet délétère des rayonnements ionisants. Dans le cas de la Gemcitabine, un délai de quatre semaines entre l'irradiation et la chimiothérapie a ainsi été intégré aux données légales du produit.

D'un point de vue thérapeutique, de fortes doses de corticostéroïdes sont efficaces dans 80% des cas des pneumopathies radiques aiguës. Des antipyrétiques et une oxygénothérapie peuvent être utilisés en plus pour soulager les symptômes. Les antibiotiques sont essentiellement administrés en cas de surinfection bactérienne. Le traitement de la fibrose pulmonaire radio-induite est pour sa part beaucoup plus limité. En effet, à l'heure actuelle, seules des thérapies symptomatiques sont à la disposition des médecins. Ainsi, des anti-inflammatoires, des bronchodilatateurs, des vasodilatateurs ou bien des chélatants des radicaux libres peuvent être délivrés. D'un point de vue préventif, l'administration d'ACE-I (*Angiotensin Converting Enzyme-Inhibitor*) durant la radiothérapie a démontré un effet protecteur chez des patients traités par radiothérapie conventionnelle ou en conditions stéréotaxiques. Le mécanisme à l'origine de cet effet est cependant encore mal compris mais

pourrait être lié à une atténuation des lésions induites au niveau de l'endothélium ou la suppression de médiateurs pro-inflammatoires<sup>118</sup>. La découverte de nouvelles possibilités préventives et/ou thérapeutiques contre les fibroses radiques, et les pneumopathies radio-induites en général, est donc un enjeu majeur de la recherche en radiobiologie et radiopathologie.

#### **D. Les principaux acteurs de la fibrose pulmonaire radio-induite**

##### **1. Le TGFβ1**

Le TGFβ1 est l'isoforme de la famille éponyme le plus représenté dans le plasma humain, les autres membres (TGFβ2 et TGFβ3) ne correspondant qu'à 5% de la quantité du TGFβ plasmatique. Le TGFβ1 est une cytokine ubiquitaire impliquée dans de multiples fonctions telles que la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaires ou bien encore l'induction de l'apoptose. Il module de plus les fonctions immunitaires. Il possède des capacités immunosuppressives mais est également impliqué dans la production de cytokines par les macrophages. Le TGFβ1 est d'autre part connu pour être particulièrement impliqué dans le développement des lésions radio-induites. En effet, Fine et al. ont démontré qu'il favorise la production des fibres de collagènes I et III par les fibroblastes ainsi que la prolifération de ces derniers en augmentant l'effet prolifératif de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*)<sup>119</sup>. Comme vu avec l'endoMT, il est également impliqué dans la transdifférenciation d'autres populations cellulaires (endothéliales et épithéliales en particulier) en myofibroblastes. La sécrétion de TGFβ1 étant augmentée dans les tissus sains après irradiation<sup>12</sup>, la combinaison de ces éléments met clairement en évidence l'aspect délétère de cette situation. Enfin, nous avons observé une augmentation de l'immunoréactivité au TGFβ1 de 2 à 23 semaines après irradiation dans les poumons exposés à 17 Gy (papier 1, figure 3).

Les fibroblastes pulmonaires sont un des types cellulaires exprimant le plus le TGFβ1. Des laboratoires ont alors décidé d'inhiber l'expression de cette cytokine *in vivo* via l'utilisation d'ARN interférents pour tenter de réduire la sévérité des lésions pulmonaires radio-induites. Lu et al. ont ainsi transfecté des souris C57BL/6 avec un siRNA ciblant TGFβ1. Cette méthode leur a permis d'observer une diminution de la densité de surface des fibres de collagène interstitiel pulmonaire à 4 et 8 semaines après irradiation (12 Gy thorax entier) par rapport aux contrôles. Faiblement exprimé en conditions normales, le TGFβ est fortement augmenté au sein de l'épithélium alvéolaire et des macrophages interstitiels à ces temps-là chez les animaux non-transfectés. La boucle inflammatoire est ainsi mise en place,

puisque le TGFβ1 est connu pour stimuler la sécrétion de cytokines inflammatoires et fibrosantes par les macrophages<sup>120,121</sup>. Dans les temps plus tardifs, significativement moins de fibres de collagène ont été retrouvées au niveau de l'adventice vasculaire et des septa alvéolaires chez les souris transfectées. Ces travaux démontrent que l'inhibition du TGFβ1 semble avoir un effet protecteur vis-à-vis du développement des lésions pulmonaires radio-induites via une inhibition de l'inflammation<sup>122</sup>. Pour aller dans ce sens, certaines études ont montré qu'en plus de favoriser la synthèse de collagène, le TGFβ1 peut réduire la dégradation de la matrice extracellulaire en inhibant l'expression d'enzymes protéolytiques. Il favorise ainsi le développement de la fibrose pulmonaire de deux façons. En prenant en compte que l'expression du TGFβ1 est particulièrement augmentée dans les temps tardifs après irradiation, cela démontre son rôle majeur dans le développement de cette pathologie<sup>21</sup>.

A la vue de l'ensemble de ces données, il est tentant de vouloir déterminer le potentiel du TGFβ1 à servir d'indicateur du risque des patients à développer des lésions radio-induites. Certaines équipes ont ainsi tenté, sans succès, d'établir un lien entre la quantité de TGFβ1 circulant dans le plasma des patients et leur probabilité de développer des lésions après radiothérapie<sup>123</sup>. Cependant une approche multiparamétrique semble plus pertinente. La combinaison dans un même modèle des taux de TGFβ1 et d'IL-8 dans le sérum, associés à la dose moyenne reçue par le poumon, a en effet démontré une meilleure capacité prédictive que chacun de ces paramètres pris indépendamment<sup>124</sup>.

## **2. Le TNFα**

Le TNFα est une cytokine impliquée dans le remodelage tissulaire, la protection contre les infections ainsi que dans l'induction de la réponse inflammatoire<sup>125</sup>. Plus précisément, Le TNFα peut inhiber les protéines lipases, induire la sécrétion de diverses cytokines dont l'IL-6, activer les cellules endothéliales et stimuler la prolifération des fibroblastes<sup>126,127</sup>. Ainsi, il n'est pas surprenant que le TNFα soit connu pour être impliqué dans le développement de la fibrose pulmonaire, quelle que soit son origine. Son expression a notamment été détectée au niveau transcriptomique et au niveau protéique dans les poumons de patients souffrant de fibrose pulmonaire idiopathique ainsi que dans ceux de souris exposées à la Bléomycine. Les taux de TNFα sont également élevés chez les patients traités par radiothérapie pulmonaire. Dans le cas de la fibrose pulmonaire radio-induite, le TNFα est considéré comme l'un des acteurs majeurs. Ceci s'explique en particulier par le fait qu'il conduit à l'activation du TGFβ1<sup>128</sup>. Il joue ainsi un rôle important dans le recrutement et la prolifération des

fibroblastes et myofibroblastes, et donc dans le développement de la fibrose radique pulmonaire. Diverses études se sont par conséquent intéressées au potentiel thérapeutique d'une inhibition du TNF $\alpha$ . Huang et al. ont par exemple démontré que l'utilisation d'un oligonucléotide anti-sens spécifique du TNFR1 (*Tumor Necrosis Factor Receptor 1*) permet de réduire l'apoptose radio-induite au niveau du foie et de conférer ainsi un effet radioprotecteur à ces animaux<sup>129</sup>. Au niveau pulmonaire, l'invalidation de TNFR1 chez des souris C57BL/6 a permis de protéger ces animaux des effets pro-fibrosants d'une inhalation d'amiante<sup>130</sup>. Bien que non-spécifique du TNF $\alpha$ , l'Ulinastatin (*urinary trypsin inhibitor*) et la Methylprednisolone (corticoïde) ont d'autre part montré une corrélation entre diminution d'expression de celui-ci et effet protecteur vis-à-vis de la fibrose pulmonaire radio-induite<sup>131</sup>.

### **E. Modélisation de la fibrose pulmonaire radio-induite**

Différentes techniques d'irradiation sont utilisées dans la littérature pour l'étude des pathologies pulmonaires radio-induites chez le rongeur. La plus répandue consiste à exposer la totalité du thorax à une dose unique comprise entre 10 et 20 Gy, en utilisant généralement un accélérateur de particules ou une source de cobalt-60. Selon une étude de Travis et al. réalisée sur des souris CBA mâles, la dose minimale permettant l'induction de la fibrose pulmonaire est de 13 Gy<sup>132</sup>. Cette dose peut cependant varier en fonction de divers paramètres dont la lignée de souris utilisée. Bien qu'accessible et simple d'utilisation cette technique présente cependant deux inconvénients. Premièrement, la dose maximale pouvant être délivrée est limitée à cause du volume important de poumon exposé. Secondement, la présence du cœur dans le champ d'irradiation peut induire un biais selon les mesures réalisées. Bien que celui-ci soit connu pour être moins radiosensible que les poumons, des affections cardiovasculaires radio-induites ayant un impact sur la fonction pulmonaire ne sont pas à exclure.

Pour pallier à cela il est notamment possible de réaliser des irradiations hémithoraciques, où seul un des deux poumons est exposé. Ce type d'irradiation, peu fréquent, a notamment été utilisé par Vujaskovic et al. pour étudier les liens entre hypoxie et lésions pulmonaires radio-induites. Via l'utilisation de plaques de plomb protégeant la partie gauche du thorax et le reste du corps, une dose unique de 28 Gy a pu être délivrée sur le poumon droit de rats Fisher-344<sup>96</sup>. Les animaux ainsi irradiés ont ensuite été suivis pendant six mois.

Une autre possibilité pour limiter la taille du volume irradié est d'utiliser la protonthérapie. En effet, les protons possèdent une propriété physique particulièrement intéressante nommée « pic de Bragg ». Lors de l'utilisation de photons, l'énergie maximale déposée dans le tissu se trouve à l'entrée de celui-ci puis décroît progressivement. Quand les protons pénètrent dans le corps, l'énergie déposée augmente de façon lente et progressive au fur et à mesure qu'ils sont ralentis par les tissus, avant d'augmenter fortement juste avant leur arrêt. L'énergie maximale est ainsi délivrée sur une zone restreinte. Cette technique d'irradiation reste encore peu répandue en clinique en raison du faible nombre d'installations. En laboratoire, Ghobadi et al. l'ont notamment utilisée sur des rats Wistar. Grâce à cette caractéristique et l'utilisation de CT scans, des doses uniques de 28, 20/22, 17 et 13 Gy ont pu être délivrées sur respectivement 33%, 50%, 75% et 100% du volume pulmonaire<sup>133</sup>.

Enfin, une méthode actuellement en plein essor est la radiothérapie en conditions stéréotaxiques. Comme évoqué au Chapitre I.5.B, cette technique permet l'irradiation de très faibles volumes via l'utilisation de microfaisceaux couplés à un système d'imagerie. Le principal avantage de cette technique est ainsi de pouvoir irradier avec précision le volume cible en minimisant l'impact sur les OARs à proximité. La diminution du volume irradié permet de plus d'augmenter la dose délivrée. En laboratoire, ces caractéristiques permettent ainsi d'étudier la réponse d'un organe en fonction de la dose, du volume et de l'emplacement de l'isocentre. Dans notre cas, l'utilisation d'irradiations en conditions stéréotaxiques permet d'étudier l'impact d'une forte dose sur le parenchyme pulmonaire. Ceci est particulièrement intéressant quand on prend en compte que l'hypofractionnement (utilisation de très fortes doses par fraction, caractéristique de la radiothérapie en conditions stéréotaxiques) se démocratise en clinique. En plus de l'effet au sein du volume cible, cette méthode nous permet d'investiguer les conséquences d'une telle irradiation sur les poumons ipsilatéral et controlatéral. Enfin, minimiser la dose au cœur nous permet de limiter les biais lors de l'étude de la fonction respiratoire. D'un point de vue technique, l'irradiateur que nous utilisons est le SARRP (*Small Animal Radiation Research Platform*) d'Xstrahl. Celui-ci comporte un tube à rayons X, soumis à une tension de 220kV et une intensité de 13mA. Il permet d'émettre des photons d'énergie moyenne de 70keV (spectre de 0 à 220keV), à un débit de référence de 2.6 Gy/min (1.8 à 1.9Gy/min pour un collimateur de 3mm x 3mm). Une irradiation très focalisée avec des champs pouvant descendre jusqu'à 1mm x 1mm est permise par un système de micro-collimateurs. La possibilité de faire tourner le bras à 360° permet de réaliser des irradiations multifaisceaux ainsi que des arc-thérapies. Des irradiations non-coplanaires sont

de plus possibles grâce aux mouvements de la table. Enfin, un système d'imagerie embarquée rend possible un repositionnement par la réalisation de *Cone Beam Computed Tomography* (CBCT). Le système de planification de traitement (TPS, *Treatment Planning Systems*) utilisé lors des irradiations et du suivi des lésions est le logiciel MuriPlan. Il permet en particulier de réaliser des reconstructions tridimensionnelles à partir d'acquisitions CBCT ainsi qu'un calcul des histogrammes doses–volumes (HDV). Ce système utilise un algorithme de superposition-convolution ajusté sur les faibles énergies.

De plus en plus de laboratoires dans le monde sont équipés d'un appareil permettant l'irradiation des rongeurs en conditions stéréotaxiques (cinq appareils acquis très récemment en France, dont celui de l'IRSN). Disposer de tels outils est nécessaire à l'élaboration de projets de recherche en adéquation avec les nouvelles techniques de radiothérapie.

## Problématique et objectifs

---

Bien qu'indispensable au traitement de nombreux patients atteints de cancer, la radiothérapie peut toutefois elle-même être à l'origine du développement de pathologies plus ou moins invalidantes. Ceci est dû au fait que bien qu'ils soient utilisés pour traiter les cellules cancéreuses, les rayonnements ionisants induisent également des dommages aux cellules saines. L'irradiation peut ainsi causer la mort ou l'altération de l'ensemble des types cellulaires exposés, provoquant par conséquent par exemple le dysfonctionnement de vaisseaux sanguins ou la rupture de barrières épithéliales. Dans certains cas cette situation induit un entretien de l'inflammation radio-induite et provoque la mise en place d'une pathologie radique chronique.

Dans notre laboratoire nous pensons que les évènements vasculaires précoces sont déterminants dans le devenir tissulaire et la possible dérégulation du système de cicatrisation après irradiation. Plusieurs résultats obtenus sur des modèles précliniques d'irradiation de la sphère abdomino-pelvienne chez la souris vont d'ailleurs dans ce sens. Afin de mieux comprendre l'ensemble de ces phénomènes, il était devenu indispensable d'essayer de valider ces résultats sur un organe totalement différent, que ce soit en termes d'organisation, de fonctionnement ou de radiosensibilité. Le poumon étant composé de sous-unités indépendantes les unes des autres, ne possédant pas de compartiment souche clairement défini et étant particulièrement radiosensible, celui-ci s'est rapidement affirmé comme étant un choix judicieux.

L'objectif principal de cette thèse était donc ainsi d'investiguer dans cet organe, les rôles éventuels joués par les *pools* endothéliaux de PAI-1 et HIF-1 $\alpha$  dans le développement des lésions radiques. La seconde utilité de cette étude était de plus d'apporter au sein du laboratoire des connaissances sur la réponse des poumons face à l'irradiation et de caractériser les lésions induites, notamment dans le cadre d'une irradiation en conditions stéréotaxiques.

## Résultats

---

### **Article 1 : Conditional PAI-1 deletion in the endothelial compartment has no beneficial effect on radiation-induced whole-lung damage in mice.**

*Travaux acceptés pour publication en premier auteur dans « International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics », Juillet 2017*

#### **Objectifs :**

La pneumonite radique et la fibrose pulmonaire radio-induite sont des pathologies secondaires pouvant survenir chez les patients traités par radiothérapie pour des cancers pulmonaires, mammaires ou des lymphomes du médiastin. Les mécanismes à l'origine de ces pathologies incluent la rupture de la barrière alvéolo-capillaire et l'activation de l'endothélium. PAI-1 a été identifié comme une cible thérapeutique potentielle contre la fibrose pulmonaire par l'utilisation d'un inhibiteur pharmaceutique ou via une invalidation génique. Notre objectif avec cette étude était d'investiguer le rôle potentiel joué par le *pool* endothélial de PAI-1 dans le développement des lésions radiques pulmonaires dans un modèle d'irradiation thoracique en champ large.

#### **Principaux résultats :**

L'irradiation induit *in vitro* l'activation des HMVEC-L, la surexpression de PAI-1 ainsi que la réalisation de la transition endothélio-mésenchymateuse. L'invalidation génique de PAI-1 chez la souris n'a pas démontré de bénéfice vis-à-vis du développement des dommages pulmonaires suite à une irradiation de l'ensemble du thorax. Une tendance à aggraver les lésions a de plus été mise en évidence.

#### **Conclusion :**

Le *pool* endothélial de PAI-1 ne semble pas jouer de rôle déterminant dans le développement des pathologies radiques pulmonaires. L'intérêt thérapeutique d'une inhibition de PAI-1 vis-à-vis du développement des lésions pulmonaires radio-induites serait donc associé à un autre type cellulaire.

## **Conditional PAI-1 deletion in the endothelial compartment has no beneficial effect on radiation-induced whole-lung damage in mice.**

Jérémy Lavigne, Frédéric Soysouvanh, Valérie Buard, Georges Tarlet, Olivier Guipaud, Vincent Paget, Fabien Milliat and Agnès François\*.

Institute for Radiological protection and Nuclear Safety (IRSN), Department of Radiobiology and Epidemiology (SRBE), Radiobiology and Radiopathology Research Laboratory (L3R), 31 Avenue de la Division Leclerc, 92265 Fontenay-aux-Roses, France.

\*Corresponding author: E-mail address: [agnes.francois@irsn.fr](mailto:agnes.francois@irsn.fr). Tel: +33 1 58 35 80 45; Fax: +33 1 58 35 84 67.

### **Abstract**

**Purpose:** Radiation pneumonitis and radiation-induced lung fibrosis are common side effects of thoracic tumor treatment. Mechanisms of radiation-induced lung damage include breakdown of the alveolar-capillary barrier and endothelial activation. Plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) has been identified as an interesting therapeutic target against lung fibrosis by knockout of the PAI-1 gene or pharmaceutical inhibition of PAI-1. Our aim was to investigate whether the endothelial pool of PAI-1 plays a role in the development of radiation-induced lung damage, as previously demonstrated in the intestine.

**Methods:** Human lung microvascular endothelial cells (HMVEC-L) were exposed to 10 Gy irradiation so as to study their ability to acquire an “activated” phenotype. Mice in which the Cre-Lox strategy was used to produce PAI-1 deletion specifically in the endothelial compartment were exposed to 17 Gy whole-thorax irradiation and followed up for 2, 13 and 23 weeks post-irradiation.

**Results:** HMVEC-L had an activated phenotype after radiation exposure, overexpressed PAI-1 and underwent endothelial-to-mesenchymal transition. In mice, knockout of PAI-1 in the endothelium had no beneficial effect on radiation-induced lung damage and showed a tendency to worsen acute lesions.

**Conclusions:** As opposed to the intestine, the endothelial pool of PAI-1 does not play a determinant role in the development of radiation-induced lung damage. The therapeutic value of PAI-1 inhibition in lung radiation injury may be associated with other types of cells.

**Short title:** PAI-1 in radiation pneumonitis.

### **Conflict of Interest**

The authors declare no conflict of interest.

### **Acknowledgements**

We thank the GSEA (Groupe de Soutien à l'Expérimentation Animale) of the IRSN for their excellent technical assistance with the breeding of mice.

## Introduction

Thoracic irradiation is a key strategy in the treatment of lung tumors as well as other thoracic malignancies such as breast and mediastinal lymphoma [1]. Acute (< 6 months) and late (> 6 months) normal lung injuries are classically associated with thoracic radiation therapy, and both limit the total dose that should be delivered to the tumor to achieve adequate cancer control. Thoracic radiation therapy-associated lung damage is fairly common since it may concern up to 20% of treated patients, if we consider those who present unmistakable clinical consequences of lung damage, and even more (up to 90%) if we consider radiographic and pulmonary function test abnormalities [2]. Acute radiation pneumonitis (RP) is characterized by tissue edema, macrophage infiltration and fibrin deposition in the airspaces, thickening and leucocyte infiltration of the alveolar septa, followed by pathological tissue reorganization with collagen deposition defined as radiation pulmonary fibrosis (RPF). Acute radiation damage to the lung consists of apoptosis of type 1 pneumocytes counter-balanced by reactive proliferation of type 2 pneumocytes, and apoptosis of endothelial cells in the capillaries constituting the alveolar-capillary units [3]. Type 1 pneumocytes and microvascular endothelial cells have also been shown to undergo epithelial-to-mesenchymal (EMT) and endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT), respectively, and both are involved in a pathological tissue scarring process [4, 5].

Several preclinical studies have demonstrated convincing efficacy of different therapeutic strategies against RP and RPF, such as inhibition of the TGF- $\beta$  or combined TGF- $\beta$ /PDGF pathway [6, 7], administration of anti-inflammatory or antibiotic compounds [8-11] or targeting of the renin-angiotensin system [12]. Despite such encouraging results, clinical management of thoracic radiation therapy-

associated side effects remains insufficient. It is therefore of major importance to explore radiation-induced lung pathophysiology to try to highlight some new molecular factors in RP and RPF in order to open new therapeutic windows for the management of thoracic irradiation side effects. 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 tPA. Consequently, PAI-1 limits fibrin degradation and plasmin-dependent matrix metalloproteinase activation, and thus favors extracellular matrix deposition. PAI-1 has been associated with bleomycin-induced lung fibrosis [13], and truncated PAI-1 protein administration has a beneficial effect on radiation-induced lung fibrosis in mice [14]. Moreover, single-nucleotide polymorphisms in PAI-1 are predictive of severe radiation pneumonitis in lung cancer patients [15]. We previously demonstrated that PAI-1, and more precisely the endothelial pool of PAI-1, is involved in the initiation of radiation-induced damage to the gastrointestinal tract in mice [16-18]. Increased PAI-1 immunoreactivity has been observed in the endothelial compartment of different human normal tissues after radiation exposure [19], and PAI-1 is involved in radiation-induced endothelial cell death, a cornerstone of intestinal [17, 18, 20] but also pulmonary response to radiation exposure [3, 21]. Finally, PAI-1 plays a role in radiation-induced EndoMT, a process that can be considered as a witness of endothelial activation and also known to occur in radiation-induced damage to both the intestine and lung [5, 22]. Despite apparent common mechanisms governing gut and lung tissue radiation damage, it is well known that the normal tissue response to radiation exposure depends on multiple factors, including tissue organization [23]. "Hierarchical" tissues, like the intestine, present distinct functional and stem cell compartments; conversely, tissues called "flexible," such as the lung, have no stem

cell compartment. This organization impacts tissue response, especially in terms of cell death and repopulation. Given that the lung is not a hierarchical tissue, unlike the intestine, but shares common mechanisms in response to radiation exposure, the objective of this study was to investigate whether the endothelial pool of PAI-1 represents an interesting molecular target in the irradiated lung and to help to open new therapeutic windows for the management of the consequences of thoracic irradiation.

## Materials and Methods

### *Animals and irradiation*

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 IRSN no. 81 (protocol P14-01, agreement number C92-032-01). VE-cadherin-Cre-recombinase transgenic mice [24] were crossbred with PAI-1-floxed mice (created in the lab, see Rannou *et al.*[18]). After several generations, homozygotes PAI-1 floxed/VE-Cadherin-Cre-recombinase<sup>-/-</sup> mice (PAI-1<sup>flx/flx</sup>) and PAI-1 floxed/VE-Cadherin-Cre-recombinase<sup>+/-</sup> mice (PAI-1KO<sup>endo</sup>), in which PAI-1 is inactivated specifically in the endothelium, were used for experiments. Genotyping of mice was performed as already described [18].

Animals were irradiated at a single dose of 17 Gy over the whole thoracic area using 4MV X-rays at 2.6 Gy/min (Elekta Synergy<sup>®</sup> Platform, Elekta S.A.S. France; see supplemental methods 1). The numbers of animals per group for each individual measurement are indicated in supplementary table 1.

### *Tissue harvesting, histology and immunohistology*

At different times after radiation exposure, tissues were removed, fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (5 µm) were stained with

hematoxylin-eosin-saffron and Masson's trichrome for histological examination.

*Radiation injury score (RIS):* The semiquantitative histopathology scoring system modified from the method of Ashcroft *et al.* [25-27] (supplementary table 2) consisted of six individual parameters (thickness of the alveolar septa, alveoli space, lung engagement, fibrin deposition, perivascular infiltrate, parenchyma/fibrosis) assessed as normal (score = 0) or abnormal, graded according to the severity (0 to 2 or 0 to 3). The thickness of alveolar septa (measured on 10 separate fields), the percentage of surface area concerned by radiation-induced damage and Masson's Trichrome staining quantification (on the whole tissue section) were measured using the Visiol@b<sup>TM</sup>2000 image analysis software (Biocom SA, Les Ulis, France).

*Immunofluorescence:* Sections were incubated with rabbit polyclonal antibodies to CD68 (Abcam, Paris, France) or rabbit polyclonal antibodies to fibrin(ogen) (Dako, Les Ulis, France). Samples were then incubated with Alexa fluor<sup>®</sup>-conjugated corresponding secondary antibodies (Life Technologies, Saint Aubin, France). Immunofluorescent double labeling for EndoMT and EMT: sections were incubated with goat polyclonal antibodies to alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -sma; Abcam) or goat polyclonal antibodies to smooth muscle 22-alpha (sm22- $\alpha$ ; Abcam) followed by corresponding secondary Alexa Fluor<sup>®</sup>-conjugated antibodies (Life Technologies), and incubated with sheep polyclonal antibodies to von Willebrand factor (vWF)/FITC-conjugated antibody (Dako) or rabbit polyclonal to pro-surfactant protein C (pro-SFPC; Abcam) followed by corresponding secondary Alexa Fluor<sup>®</sup>-conjugated antibody (Life Technologies). Sections were mounted in Vectashield mounting medium with DAPI (Eurobio/Abcys, Courtaboeuf, France). Confocal analyses (EndoMT and EMT

observations) were performed on a Zeiss LSM 780 confocal imaging system (Zeiss France, Marly Le Roi, France). EndoMT is a very rare phenomenon, and analyses were performed on the entire lung tissue section for each mouse in a blinded manner. If endoMT was observed, the mouse was registered as “EndoMT +” (presence of endoMT); if not, the mouse was registered as “endoMT -” (absence of endoMT).

*Myeloperoxidase (MPO) and TGF- $\beta$  immunostaining:* Sections were incubated with rabbit polyclonal antibodies to MPO or TGF- $\beta$  (Abcam), followed by polymer HRP anti-rabbit IgG (GBI Labs, Washington, USA) and stained using the Histogreen Substrate Kit for peroxidase (Eurobio, Les Ulis, France). Sections were counter-stained by nuclear fast red (Sigma-Aldrich, Lyon, France). MPO+ and CD68+ cells were counted in 5 separated fields for each tissue section with a x40 magnification.

*Cell culture and irradiation:* Human lung microvascular endothelial cells were from Lonza (Verviers, Belgium) and grown at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in EBM-2 MV medium supplemented by 12 mg/mL brain bovine extract without heparin (Lonza). 80-90% confluent cells were irradiated using the Elekta Synergy<sup>®</sup> Platform. Medium was changed before irradiation and every 7 days thereafter.

*Quantitative real-time PCR:* Total RNA was prepared with the mirVana miRNA isolation kit (Thermo Fisher Scientific, France). After quantification on a NanoDrop ND-1000 apparatus (NanoDrop Technologies, Rockland, DE), reverse transcription was performed with 500 ng RNA using a reverse transcription kit from Applied Biosystems (Courtaboeuf, France). Quantitative PCR was carried out on a 7900HT Fast-Real Time PCR system (Applied Biosystems) using pre-developed TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression assays (Applied Biosystems, see supplementary

table 3 for genes list and assays references), with beta-actin as housekeeping gene. Genes were chosen as known to be implicated in endoMT process, TGF $\beta$  pathway (inducer of endoMT), inflammation (known radiation-induced cytokines in endothelial cells), or to be mesenchymal or endothelial markers to follow the endoMT process. Relative mRNA was quantified using the  $\Delta\Delta$ CT method. DataAssist<sup>TM</sup> software (Life Technologies) was used to perform hierarchical clustering with global normalization and Pearson’s correlation.

#### *Statistical analyses*

Data are given as means  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using Student’s t-test or the Mann-Whitney rank sum test when appropriate, with a level of significance of  $p < 0.05$ . Dot plot graphs and associated statistics were performed using GraphPad Prism 7 Software (San Diego, CA, USA)

## **Results**

### *Irradiated pulmonary vascular endothelial cells are activated and oriented toward a mesenchymal-like phenotype*

We first decided to characterize the response of HMVEC-L to radiation exposure to investigate whether they develop an “activated” phenotype, as demonstrated in other cell lines. In particular, we followed EndoMT as representative of cell activation and easy to follow *in vivo*. In control and irradiated HMVEC-L, 48 genes were measured post-exposure to 10 Gy. Hierarchical clustering revealed gene expression modifications sufficient to discriminate between the groups for the 2-, 3- and 7-day time points (Fig. 1A). Conversely, culture aging and overconfluence in control cells offered stress conditions strong enough to make their gene expression profile indistinguishable from irradiated cells at day 14. Detailed genes are given in supplementary table 3.

Detailed gene expression fold changes of irradiated cells at day 7 compared to control cells (day 7) show that radiation enhances the expression levels of mesenchymal markers and EndoMT/TGF- $\beta$  pathways such as Hey2 and TGF $\beta$ 2 (Fig. 1B). Conversely, inflammatory and endothelial marker expression remained at control levels (not shown). At this time point, endothelial markers were not modified, but EndoMT was confirmed by immunostaining at day 7 post-exposure (Fig. 1C). Irradiated cells became alpha-sma and smooth muscle 22-alpha positive, lost Ve-Cadherin organization and acquired filamentous vimentin structures. All these observations are in favor of radiation-induced cell activation and an endothelial-to-mesenchymal transition process. Given that aging control cells evolved through overconfluence and an “activated” phenotype, we decided to compare gene expression levels of irradiated cells at day 7 to a “young” control, i.e. using day 2 control cells. Irradiated cells showed enhanced expression of mesenchymal markers and EndoMT/TGF- $\beta$  pathways, but also several inflammation and endothelial markers, suggesting well-defined cell activation following radiation exposure (supplementary fig. 1).

#### *Endothelial-to-mesenchymal transition in vivo*

Development of radiation-induced lung damage is associated with increased TGF- $\beta$  immunostaining at all time points (Fig. 2A). TGF- $\beta$  is a known inducer of EndoMT. EndoMT was never observed in control tissues. Vessels of irradiated lungs showed yellow merging signals observed by confocal imaging in endothelial cells, signifying co-expression of both endothelial and mesenchymal markers 2 weeks post-exposure in both mouse strains (Fig. 2B). No statistical difference was observed concerning endoMT frequency between PAI<sup>flx/flx</sup> and PAI KO<sup>endo</sup> mice ( $p=0.1469$ ; Fig. 2C). No sign of EndoMT was

observed in irradiated tissues at the 13- and 23-week time points.

#### *Number of type II pneumocytes and epithelial-to-mesenchymal transition*

Pro-SFPC immunostaining revealed radiation-induced increased type II pneumocyte numbers, with no difference between strains (Fig. 3A). EMT was very sparse whatever the time point observed and thus impossible to quantify (fig. 3B and C).

#### *Pathological changes of irradiated lungs: impact of PAI-1 endothelial deletion*

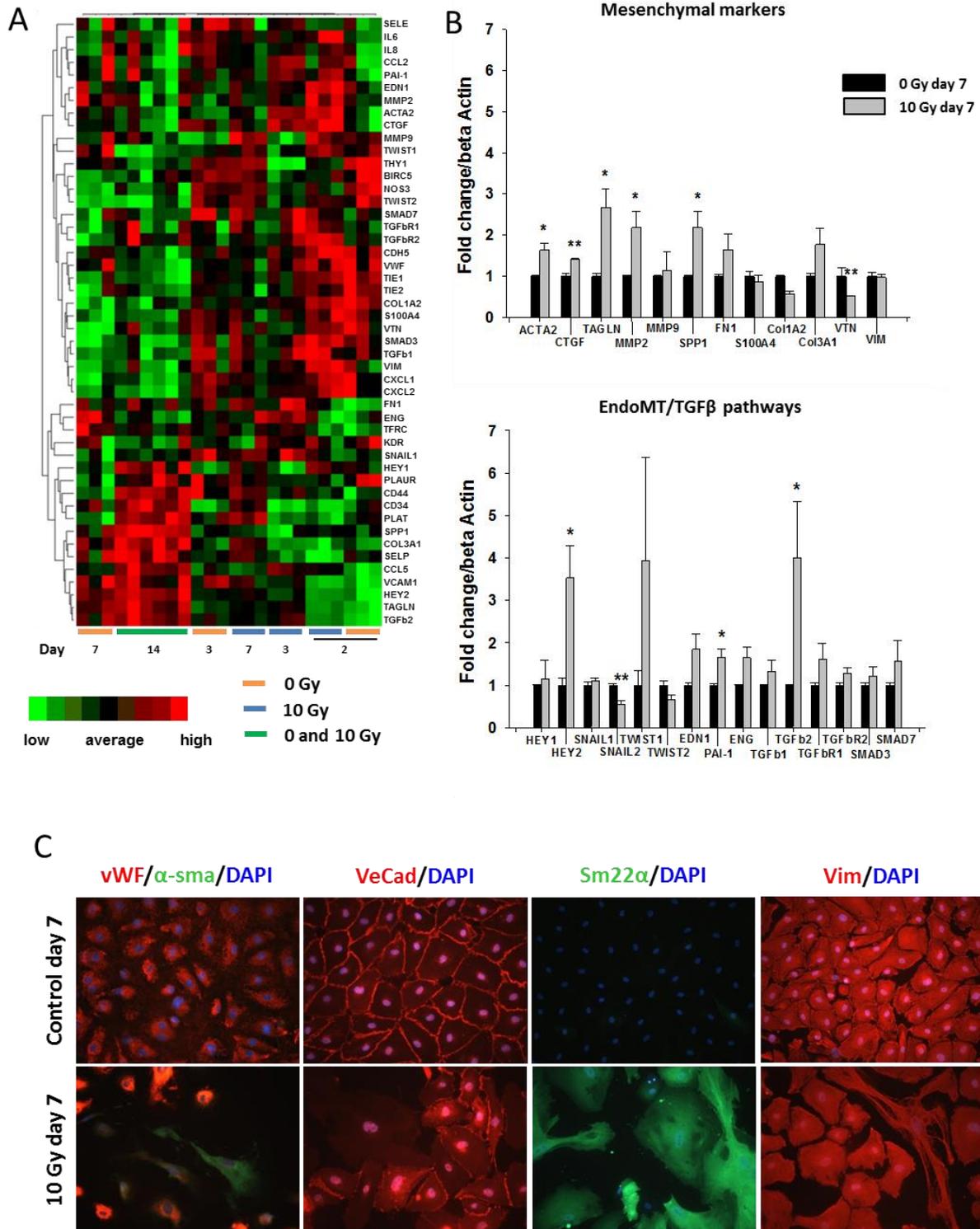
Figure 4A shows hemalun-eosin-saffron and fibrin(ogen)-stained normal lung, with well-organized alveolar-capillary units, thin alveolar septa and slight fibrin(ogen) immunoreactivity. Irradiated lungs showed diffuse immune cell infiltration in the lung parenchyma, alveolar disorganization with increased alveolar thickness and severe perivascular infiltrates observed at 23 weeks (arrow). Vascular leakage is illustrated by increased fibrin(ogen) immunoreactivity. Sections show progressive collagen accumulation as demonstrated by Masson’s trichrome staining. Radiation injury score (RIS) revealed a significantly increased severity of lung acute (2 weeks) damage in PAI KO<sup>endo</sup> compared to PAI<sup>flx/flx</sup> mice. No difference was observed for later time points (Fig. 4B). Alveolar thickening occurred at all time points, and was significantly higher in PAI KO<sup>endo</sup> mice at 13 weeks (Fig. 4C). The percentage of lung surface area concerned by radiation damage was significantly higher in PAI KO<sup>endo</sup> mice at 2 and 13 weeks (Fig. 4D). Representation of each RIS parameter (detailed in supplementary table 2) confirmed that lung involvement was significantly increased in PAI KO<sup>endo</sup> mice (supplementary Fig. 2). Quantification of Masson’s trichrome at 23 weeks (Fig. 4E) revealed no difference between PAI<sup>flx/flx</sup> and PAI KO<sup>endo</sup> mice, suggesting

comparable fibrosis severity in both mouse strains.

*Tissue macrophages and neutrophils invasion*

To characterize tissue cell infiltration in both mouse strains, we stained and counted macrophages and neutrophils, two types of immune cells frequently encountered in the irradiated lung. Mast cells were quasi absent, as already observed in C57Bl6 mouse strain following thoracic irradiation [28]. CD68 immunostaining revealed macrophage invasion of lung parenchyma in both mouse strains, from 2 to 23 weeks, without any significant difference between

PAI<sup>flx/flx</sup> and PAI KO<sup>endo</sup> mice (Fig. 5A). MPO immunostaining revealed that irradiated lungs of PAI KO<sup>endo</sup> mice showed neutrophil invasion at 2 weeks, whereas neutrophil number was not significantly different from controls in PAI<sup>flx/flx</sup> mice at this time point (Fig. 5B). Neutrophil invasion was observed in both mouse strains at 13 weeks and returned to control values 23 weeks post-exposure.



**Figure 1: HMVEC-L demonstrate altered expression of EndoMT pathway genes after radiation.**  
 A: Hierarchical clustering showing expression levels of 48 genes measured by RT-PCR (listing in supplemental table 3) related to the endothelial or mesenchymal phenotype, to EndoMT/TGF $\beta$  pathways or to inflammation in control and irradiated HMVEC-L 7 days post-exposure. B: Fold changes in gene expression levels of genes related to mesenchymal markers or endoMT/TGF $\beta$  pathways obtained in control and irradiated cells at day 7. Data are representative of 2 experiments performed in triplicate. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . C: Immunostaining of endothelial and mesenchymal markers demonstrating EndoMT in irradiated HMVEC-L 7 days post-exposure. Original magnification  $\times 400$ .

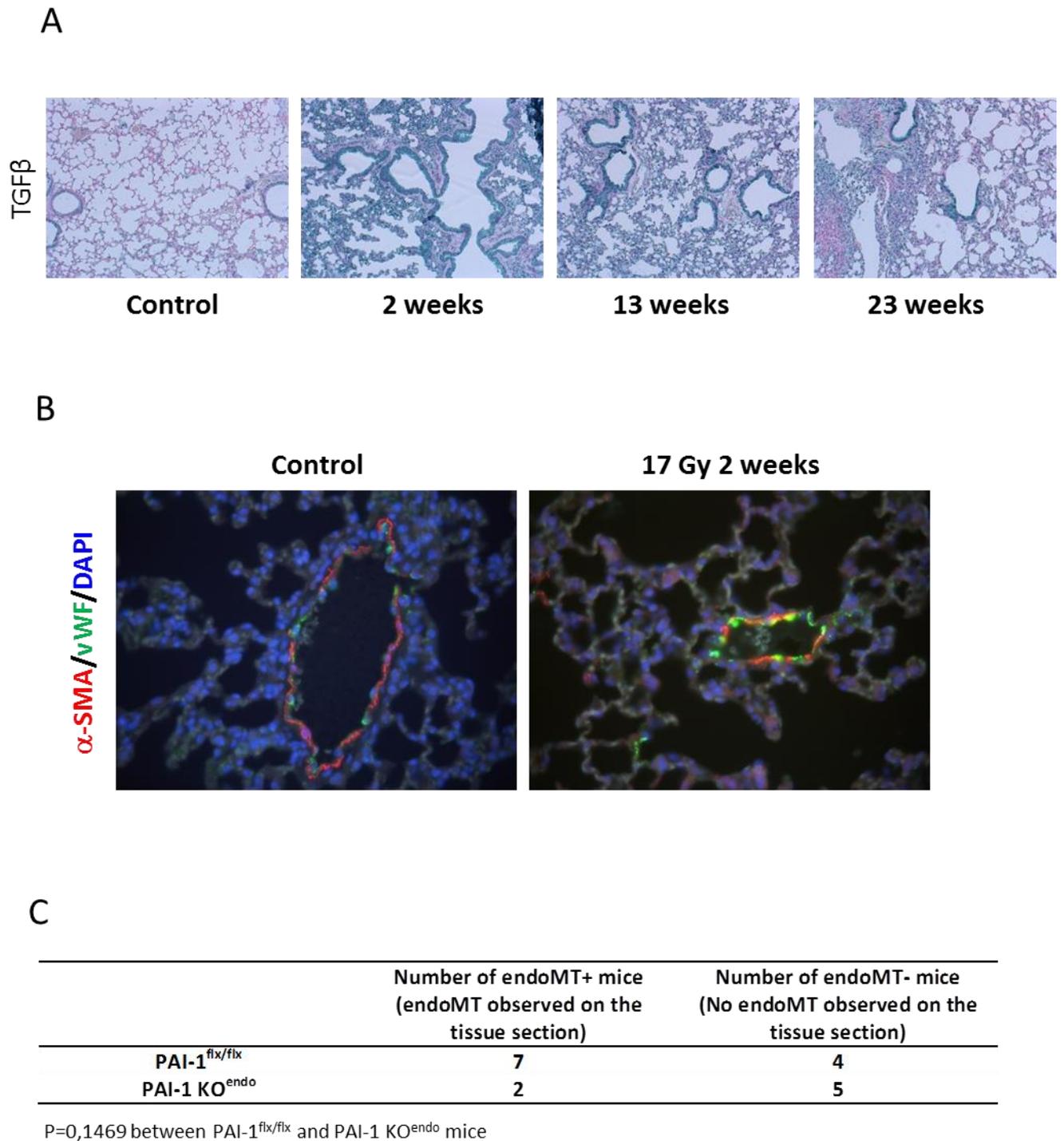
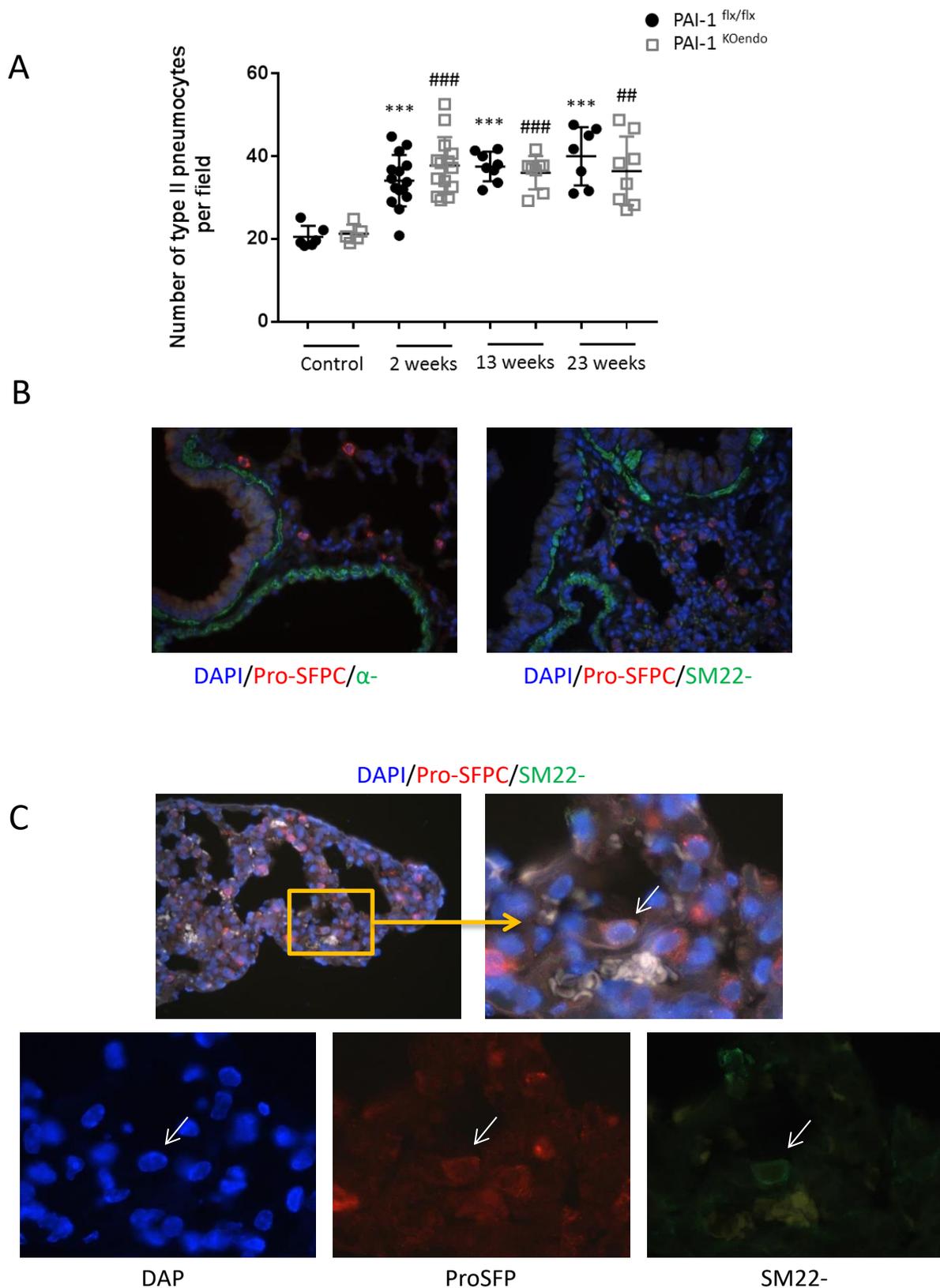
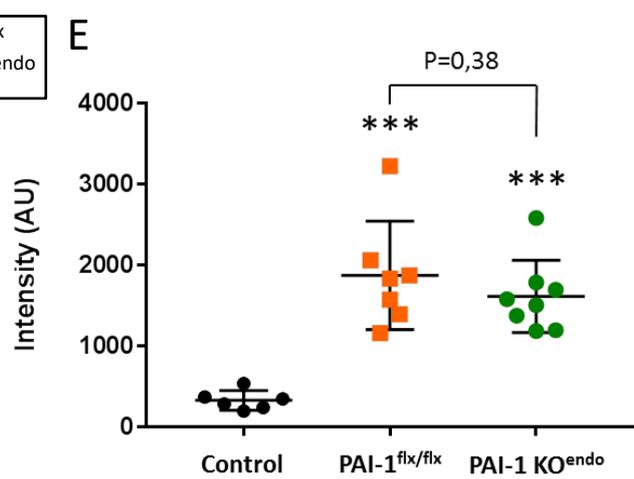
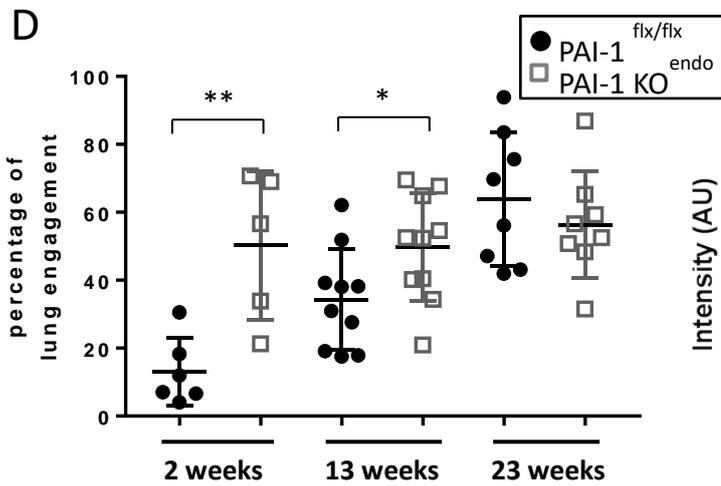
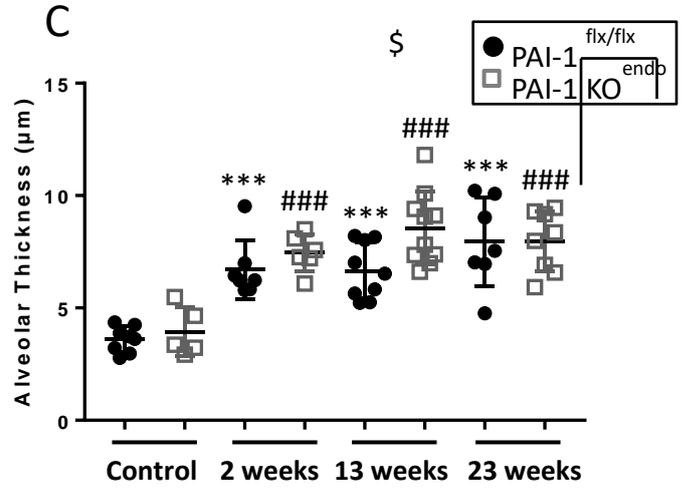
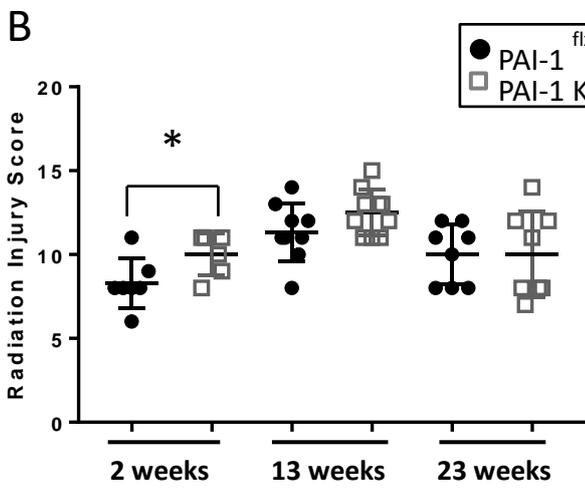
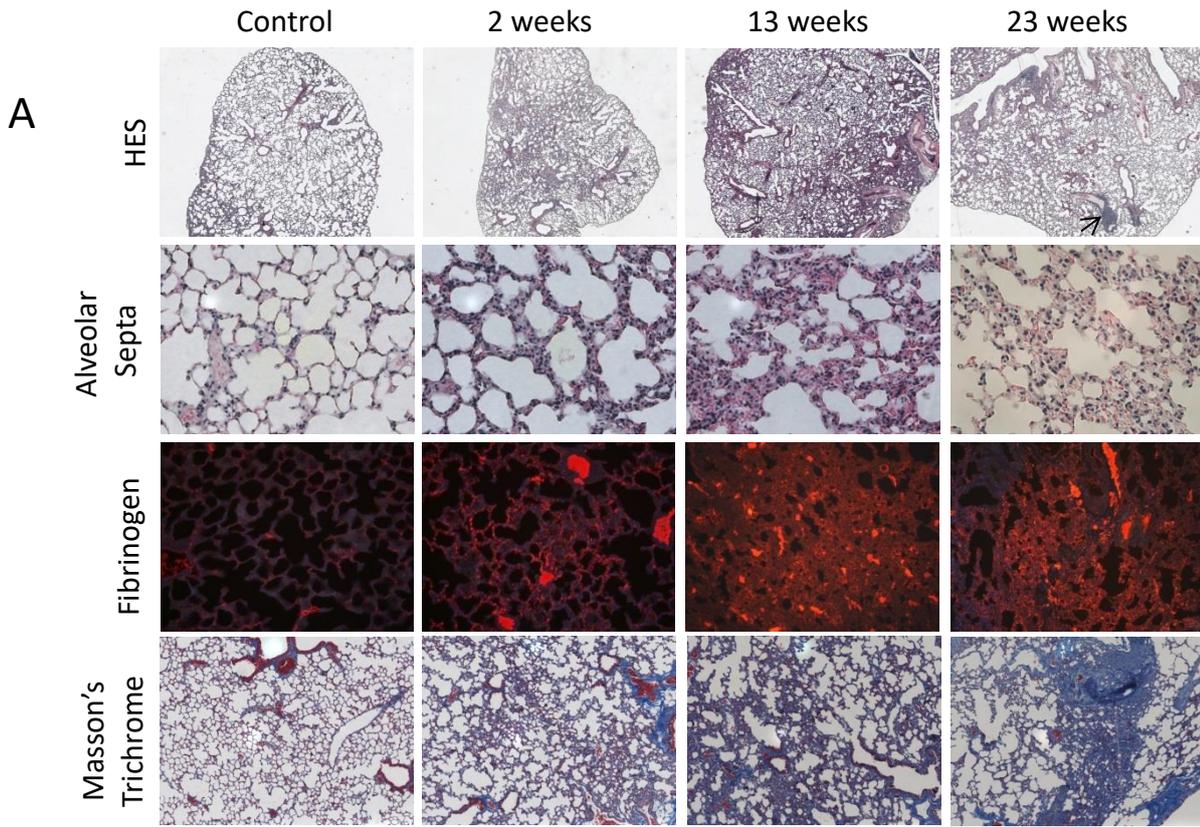


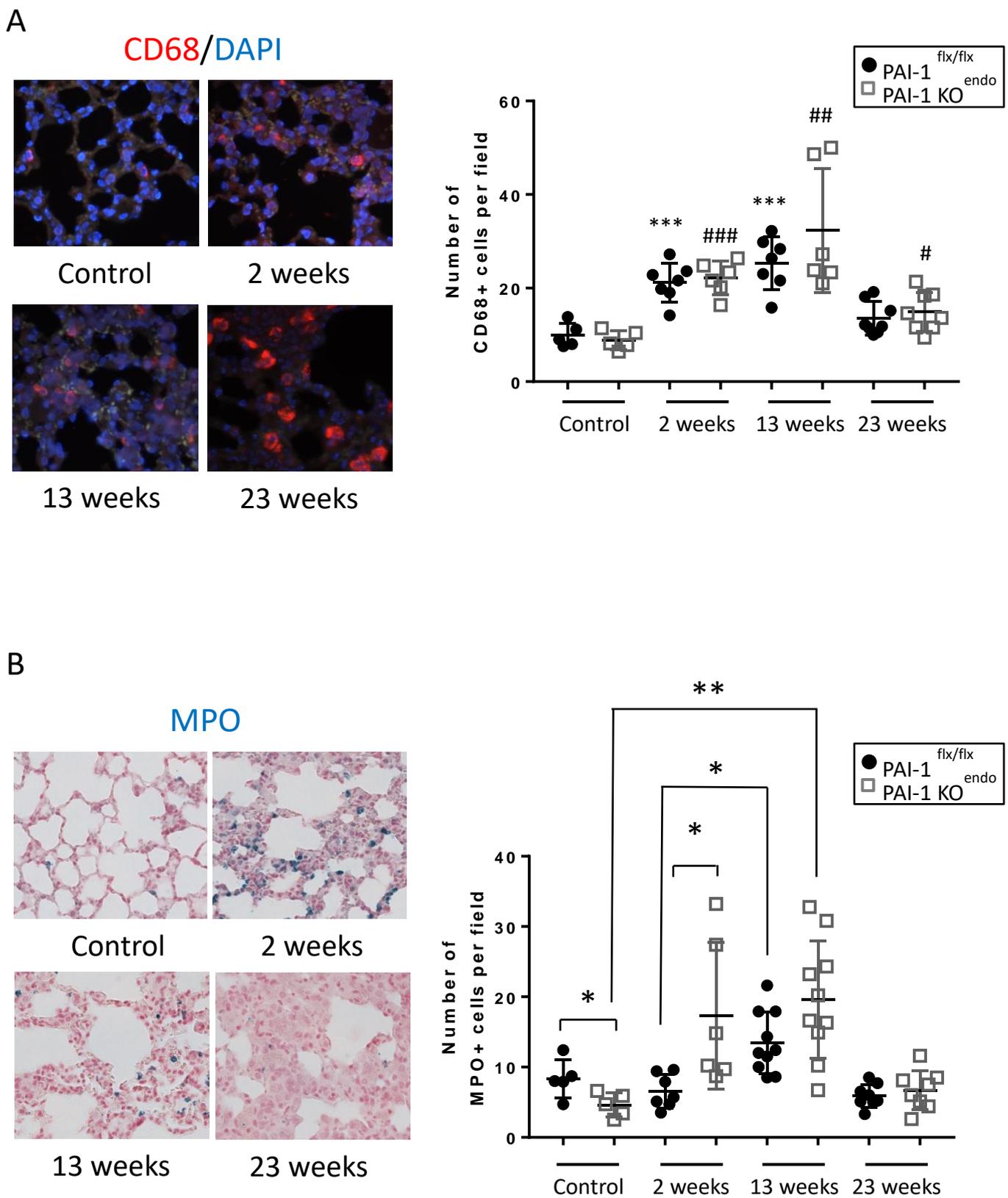
Figure 2: **EndoMT occurs in vivo but is not influenced by genotype.** A: Representative pictures of TGF- $\beta$  immunostaining in control and irradiated lung tissues 2, 13 and 23 weeks post-exposure. Original magnification x100. B: co-immunostaining of vWF (green) and alpha-SMA (red) in control and irradiated lungs 2 weeks post-exposure, showing yellow merging signal in irradiated lung signing the EndoMT process *in vivo*. C: Table showing the number of mice concerned or not with endoMT in PAI-1<sup>flx/flx</sup> and PAI-1KO<sup>endo</sup> groups 2 weeks after irradiation. Contingency analyses revealed no statistical difference between groups (p=0.1469).



**Figure 3: Irradiation increases the number of type II pneumocytes in both genotypes, with virtually no EMT process.** A: Number of type II pneumocytes in control and irradiated lung tissues in PAI-1<sup>flx/flx</sup> and PAI-1KO<sup>endo</sup> mice 2, 13 and 23 weeks post-exposure to 17 Gy whole-thorax irradiation. \*\*\* $p < 0.001$  compared to unirradiated PAI-1<sup>flx/flx</sup> mice; ### $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  compared to unirradiated PAI-1 KO<sup>endo</sup> mice. B: Pictures as examples of pro-SFPC/ $\alpha$ -sma and pro-SFPC/sm22- $\alpha$  co-immunostaining in lung tissues. C: details of pro-SFPC/SM22- $\alpha$  co-immunostaining (counterstained with DAPI) showing co-expression of both markers in a type II pneumocyte (arrows) signing EMT. Original magnification x400.



**Figure 4: Lung tissue damage shows a tendency to be increased in PAI KO<sup>endo</sup> mice.** A: First panel: representative HES-stained unirradiated and 17 Gy-irradiated lung tissues (original magnification x40). Second panel: higher magnification of HES-stained tissues detailing the alveolar septa (x400). Third panel: Fibrin(ogen) immunostaining in control and irradiated lungs. Fourth panel: Masson's trichrome staining in control and irradiated lungs (original magnification x100). B: Radiation injury score assigned to PAI<sup>flx/flx</sup> and PAI KO<sup>endo</sup> mice. \*p<0.05. C: Detailed changes of alveolar thickness in PAI<sup>flx/flx</sup> and PAI KO<sup>endo</sup> mice; \*\*\*p<0.001 vs PAI-1<sup>flx/flx</sup> mice; ###p<0.001 vs PAI-1 KO<sup>endo</sup> mice; \$p<0.05. D: Percentage of lung surface area concerned by radiation damage measured in PAI<sup>flx/flx</sup> and PAI KO<sup>endo</sup> mice. \*p<0.05; \*\*p<0.01. E: Masson's Trichrome staining intensity measured in control (unirradiated PAI<sup>flx/flx</sup>) and PAI<sup>flx/flx</sup> and PAI KO<sup>endo</sup> mice 23 weeks post-irradiation. \*\*\*p<0.001 compared to controls.



**Figure 5: Lung macrophages and neutrophils invasion is globally comparable in both mouse strains.** A: Representative pictures of macrophages immunostaining (left panel, example of PAI-1 KO<sup>endo</sup> mice). Right panel shows CD68-positive cell counts. \*\*\* $p < 0.001$  vs PAI-1<sup>flx/flx</sup> mice; # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$ ; ### $p < 0.001$  vs PAI-1 KO<sup>endo</sup> mice. B: Representative pictures of neutrophil immunostaining (left panel, example of PAI-1 KO<sup>endo</sup> mice). Right panel shows MPO-positive cell counts. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

## Discussion

In the present work we used the Cre-Lox strategy to inactivate PAI-1 in the endothelial compartment and to determine whether this has an impact on the severity of radiation-induced pulmonary damage following whole-thorax irradiation in mice.

Endothelial cell damage in the lung is determinant in tissue response to radiation exposure, in particular by the breakdown of blood-alveolar barrier [21], and a recent study demonstrated that adoptive transfer of mesenchymal stem cells afforded lung radioprotection through preservation of microvascular endothelial cells [29]. We first showed that HMVEC-L acquire *in vitro* an “activated” phenotype (Fig. 1), as already observed in several macrovascular and microvascular endothelial cell types [30-32]. Moreover, irradiated HMVEC-L undergo EndoMT, a phenotypic conversion through mesenchymal-like cells, suggesting that lung endothelial cells may, as previously demonstrated for human intestinal microvascular endothelial cells [22], be active participants in the development of radiation pneumonitis. It has previously been reported that PAI-1-deficient cardiac endothelial cells are more susceptible to TGF- $\beta$ 2-induced EndoMT *in vitro* than wild-type ones, and may be responsible for spontaneous cardiac fibrosis in aging PAI-1-deficient mice [33]. *In vivo*, we showed that whole-thorax irradiation is associated with increased TGF- $\beta$  immunoreactivity and pictures of EndoMT were observed in lung microvascularization (Fig. 2). Endothelial PAI-1 deletion in mice had no influence on EndoMT. *In vivo*, endothelial cells are exposed to a very complex microenvironment and PAI-1 deletion may not be sufficient to influence EndoMT in our conditions.

The lung is a flexible organ with no stem compartment. However, in cases of lung tissue damage, a reactive proliferation of type II pneumocytes occurs to restore a

functional alveolar epithelium by transdifferentiation into type I pneumocytes. In this study, we monitored two mesenchymal markers in injured lung, in co-immunostaining with pro-SFPC, a surfactant protein used as a marker of type II pneumocytes. We show that the number of pro-SFPC<sup>+</sup> cells increases after radiation exposure (Fig. 3), which is suggestive of an attempt at alveolar reconstruction, as shown also after 12 Gy single dose or 30 Gy fractionated whole-thorax irradiation [4]. However, no difference was noted between strains, suggesting that endothelial PAI-1 deletion does not influence the ability of type II pneumocytes to undergo reactive proliferation after radiation exposure. In parallel to their “stem” function, type II pneumocytes can also undergo EMT and participate in tissue damage and fibrosis [4, 34]. PAI-1 RNA interference has been shown to have a beneficial effect on bleomycin-induced pulmonary fibrosis, and reduced TGF- $\beta$ -induced EMT *in vitro* in mouse lung epithelial adenocarcinoma cells [13]. We observed strong TGF- $\beta$  immunostaining of epithelial cells in injured lungs, which may favor EMT. Co-immunostaining of mesenchymal markers  $\alpha$ -SMA and SM22- $\alpha$  with pro-SFPC revealed very rare pictures of EMT, highlighted with SM22- $\alpha$  immunostaining in our conditions (Fig. 3), whatever the time point studied, in contrast to published data after 12 Gy whole-thorax irradiation [4]. The reasons for such discrepancies are unknown, but one may exclude technical staining issues since the immunostaining obtained was of excellent quality. EMT and EndoMT are often related to severe inflammatory conditions. In our case, the inflammatory phase 2 weeks post-exposure offered appropriate conditions for EndoMT, but not for EMT. Other study time points during the initiation and development of pneumonitis after 17 Gy irradiation may reveal EMT, if this process exists in our model.

Overall, late RP (23 weeks) was comparable in both mouse strains,

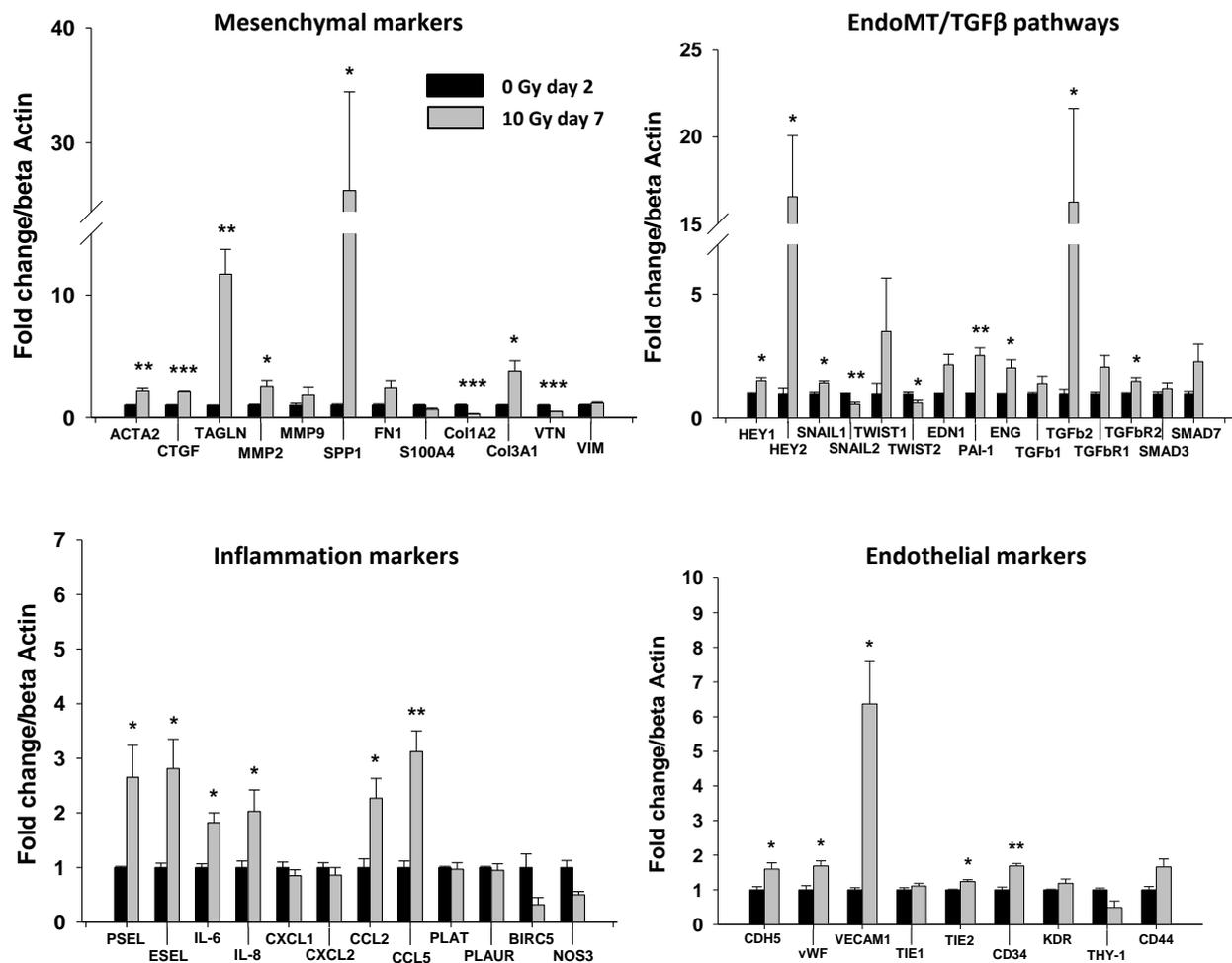
preceded by the 2- and 13-week time points demonstrating higher tissue damage severity in PAI-1 KO<sup>endo</sup> mice as illustrated by RIS, alveolar thickening, percentage of lung involvement and invasion of both macrophages and neutrophils (Fig. 4-5). PAI-1 is an anti-fibrinolytic protein [35], and deficiency in endothelial cells may influence the plasminogen/plasmin/fibrinogen/fibrin balance. Surprisingly, no difference in lung tissue fibrin deposition was noticed between strains, as already observed in the irradiated intestine, suggesting that the putative role of PAI-1 in lung damage may be independent of its antifibrinolytic actions. The role of PAI-1 in lung fibrosis, including RP, has been demonstrated using total PAI-1 pharmacological or genetic deletion. Multiple cellular sources of PAI-1 are possible, such as type II pneumocytes or macrophages, as demonstrated in an elegant study of targeted type II cell insult [36]. In our study, numerous type II pneumocytes and macrophages were observed and may be sources of PAI-1 and prevent a possible beneficial effect of PAI-1 deletion exclusively in the endothelium.

In conclusion, and in contrast to what we previously observed in the radiation-injured intestine, the endothelial pool of PAI-1 by itself does not affect large, single fraction-mediated lung injury, suggesting that pathological mechanisms may differ according to the nature of the irradiated tissue. Recent concepts highlight the possible cell type-dependent role of PAI-1 in lung fibrosis development [37] and this paradigm may be illustrated by the present study in which endothelial PAI-1 knockout may be detrimental while global PAI-1 inhibition is beneficial in several models of lung fibrosis.

## References

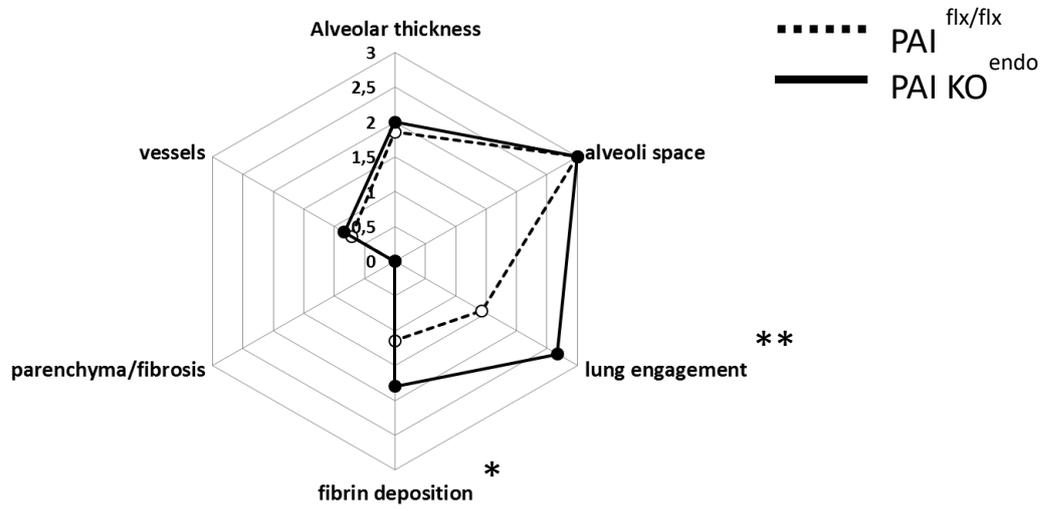
1. Marks, L.B., et al., *Radiation-induced lung injury*. *Semin Radiat Oncol*, 2003. **13**(3): p. 333-45.
2. Tsoutsou, P.G. and M.I. Koukourakis, *Radiation pneumonitis and fibrosis: mechanisms underlying its pathogenesis and implications for future research*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006. **66**(5): p. 1281-93.
3. Fuks, Z., et al., *Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death in vitro and in vivo*. *Cancer Res*, 1994. **54**(10): p. 2582-90.
4. Almeida, C., et al., *The role of alveolar epithelium in radiation-induced lung injury*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e53628.
5. Choi, S.H., et al., *A Hypoxia-Induced Vascular Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Development of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(16): p. 3716-26.
6. Flechsig, P., et al., *LY2109761 attenuates radiation-induced pulmonary murine fibrosis via reversal of TGF-beta and BMP-associated proinflammatory and proangiogenic signals*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(13): p. 3616-27.
7. Dadrich, M., et al., *Combined inhibition of TGFbeta and PDGF signaling attenuates radiation-induced pulmonary fibrosis*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(5): p. e1123366.
8. Mangoni, M., et al., *A PPAR-gamma agonist attenuates pulmonary injury induced by irradiation in a murine model*. *Lung Cancer*, 2015. **90**(3): p. 405-9.
9. Yang, S., et al., *Triptolide Mitigates Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis*. *Radiat Res*, 2015. **184**(5): p. 509-17.
10. Lee, S.J., et al., *Clarithromycin Attenuates Radiation-Induced Lung Injury in Mice*. *PLoS One*, 2015. **10**(6): p. e0131671.
11. Thomas, D.M., J. Fox, and C.K. Haston, *Imatinib therapy reduces radiation-induced pulmonary mast cell influx and delays lung disease in the mouse*. *Int J Radiat Biol*, 2010. **86**(6): p. 436-44.
12. Mahmood, J., et al., *Targeting the Renin-angiotensin system combined with an antioxidant is highly effective in mitigating radiation-induced lung damage*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2014. **89**(4): p. 722-8.
13. Senoo, T., et al., *Suppression of plasminogen activator inhibitor-1 by RNA*

- interference attenuates pulmonary fibrosis*. Thorax, 2010. **65**(4): p. 334-40.
14. Chung, E.J., et al., *Truncated Plasminogen Activator Inhibitor-1 Protein Protects From Pulmonary Fibrosis Mediated by Irradiation in a Murine Model*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2016. **94**(5): p. 1163-72.
  15. Liu, B., et al., *Genetic variants in the plasminogen activator inhibitor-1 gene are associated with an increased risk of radiation pneumonitis in lung cancer patients*. Cancer Med, 2017.
  16. Abderrahmani, R., et al., *Effects of pharmacological inhibition and genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 in radiation-induced intestinal injury*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2009. **74**(3): p. 942-8.
  17. Abderrahmani, R., et al., *PAI-1-dependent endothelial cell death determines severity of radiation-induced intestinal injury*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35740.
  18. Rannou, E., et al., *In vivo evidence for an endothelium-dependent mechanism in radiation-induced normal tissue injury*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 15738.
  19. Milliat, F., et al., *Essential role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation enteropathy*. Am J Pathol, 2008. **172**(3): p. 691-701.
  20. Paris, F., et al., *Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice*. Science, 2001. **293**(5528): p. 293-7.
  21. Qiu, J., J. Li, and T.C. He, *Endothelial cell damage induces a blood-alveolus barrier breakdown in the development of radiation-induced lung injury*. Asia Pac J Clin Oncol, 2011. **7**(4): p. 392-8.
  22. Mintet, E., et al., *Identification of Endothelial-to-Mesenchymal Transition as a Potential Participant in Radiation Proctitis*. Am J Pathol, 2015. **185**(9): p. 2550-62.
  23. Travis, E.L., *Organizational response of normal tissues to irradiation*. Semin Radiat Oncol, 2001. **11**(3): p. 184-96.
  24. Alva, J.A., et al., *VE-Cadherin-Cre-recombinase transgenic mouse: a tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells*. Dev Dyn, 2006. **235**(3): p. 759-67.
  25. Downing, L., et al., *A simple quantitative method for assessing pulmonary damage after x irradiation*. Radiat Res, 2010. **173**(4): p. 536-44.
  26. Hubner, R.H., et al., *Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples*. Biotechniques, 2008. **44**(4): p. 507-11, 514-7.
  27. Ashcroft, T., J.M. Simpson, and V. Timbrell, *Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale*. J Clin Pathol, 1988. **41**(4): p. 467-70.
  28. Haston, C.K., et al., *Distinct loci influence radiation-induced alveolitis from fibrosing alveolitis in the mouse*. Cancer Res, 2007. **67**(22): p. 10796-803.
  29. Klein, D., et al., *Mesenchymal Stem Cell Therapy Protects Lungs from Radiation-Induced Endothelial Cell Loss by Restoring Superoxide Dismutase 1 Expression*. Antioxid Redox Signal, 2016.
  30. Milliat, F., et al., *Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation: implication in radiation-induced vascular damages*. Am J Pathol, 2006. **169**(4): p. 1484-95.
  31. Blirando, K., et al., *Mast cells and ionizing radiation induce a synergistic expression of inflammatory genes in endothelial cells by a mechanism involving p38alpha MAP kinase and (p65) NF-kappaB activation*. Radiat Res, 2012. **178**(6): p. 556-67.
  32. Soloviev, A.I., et al., *Mechanisms of endothelial dysfunction after ionized radiation: selective impairment of the nitric oxide component of endothelium-dependent vasodilation*. Br J Pharmacol, 2003. **138**(5): p. 837-44.
  33. Ghosh, A.K., et al., *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, 2010. **122**(12): p. 1200-9.
  34. Nagarajan, D., et al., *ERK/GSK3beta/Snail signaling mediates radiation-induced alveolar epithelial-to-mesenchymal transition*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(6): p. 983-92.
  35. Kohler, H.P. and P.J. Grant, *Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2000. **342**(24): p. 1792-801.
  36. Osterholzer, J.J., et al., *PAI-1 promotes the accumulation of exudate macrophages and worsens pulmonary fibrosis following type II alveolar epithelial cell injury*. J Pathol, 2012. **228**(2): p. 170-80.
  37. Marudamuthu, A.S., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 suppresses profibrotic responses in fibroblasts from fibrotic lungs*. J Biol Chem, 2015. **290**(15): p. 9428-41.

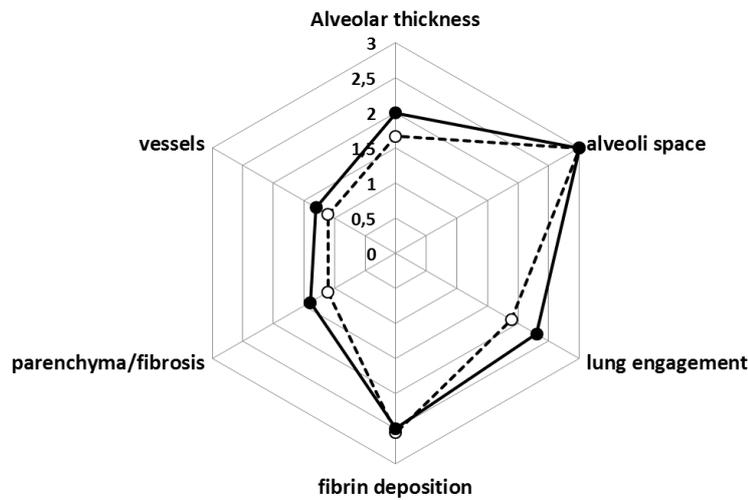


Supplementary figure 1: Expression levels of 48 genes measured by RT-PCR (listing in supplemental table 3) related to the endothelial or mesenchymal phenotype, to EndoMT/TGFβ pathways or to inflammation in irradiated HMVEC-L 7 days post-exposure compared to unirradiated cells harvested at day 2 (young control). Data are representative of 2 experiments performed in triplicate. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

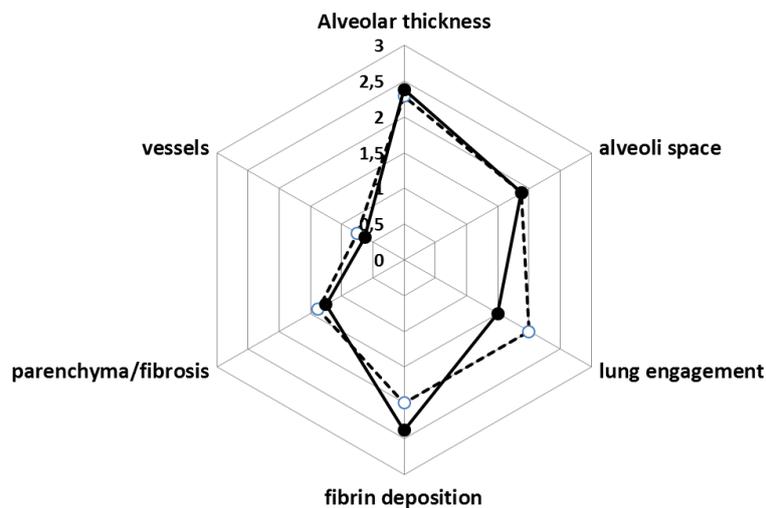
2 weeks



13 weeks



23 weeks



Supplementary figure 2: Diagrams showing radiation injury scores detailing each parameter obtained in PAI-1<sup>flx/flx</sup> and PAI-1 KO<sup>endo</sup> mice at 2 weeks (n=7 and n=6, respectively), 13 weeks (n=10 per group) and 23 weeks (n=8 per group) after radiation exposure. \*p<0.05; \*\*p<0.01.

	RIS Alveolar Thickness Lung Engagement Fibrosis		Macrophages Type 2 pneumocytes		MPO TGF-beta		EMT EndoMT	
	PAI1 <sup>flx/flx</sup>	PAI1 KO <sup>endo</sup>	PAI1 <sup>flx/flx</sup>	PAI1 KO <sup>endo</sup>	PAI1 <sup>flx/flx</sup>	PAI1 KO <sup>endo</sup>	PAI1 <sup>flx/flx</sup>	PAI1 KO <sup>endo</sup>
Controls	5	5	5	5	5	5	5	5
2 weeks	7	6	7	6	7	6	11	7
13 weeks	10	10	7	7	9	10	7	7
23 weeks	8	8	8	8	7	8	7	7

Supplementary table 1: Number of animals in control and irradiated groups at 2, 13 and 23 weeks of both mouse strains concerned with specified measurements; RIS: Radiation Injury Score; MPO: myeloperoxidase for neutrophils staining; EMT: epithelial-to-mesenchymal transition, EndoMT: endothelial-to-mesenchymal transition.

Parameter	Damage Scoring
Alveolar septa	Normal : 0 Moderately thickened < x2 normal thickness: 1 Markedly thickened < x3 normal thickness : 2 Severely thickened > x3 normal thickness: 3
Alveoli space	Normal: 0 Reduced: 1 Reduced with inflammatory cells: 2 Loss of alveolar organization: 3
Lung Engagement	None: 0 <20%: 1 20 to 50%: 2 >50%: 3
Fibrin deposition	Normal with intra-microvascular fibrin: 0 Abnormal with slight fibrin deposition in capillaries: 1 Markedly abnormal with dense fibrin deposition in capillaries : 2 Severely abnormal with strong fibrin deposition in capillaries: 3
Vessels	Normal: 0 Abnormal with slight increased perivascular cellularity: 1 Severely abnormal with moderate perivascular cellularity: 2 Severely abnormal with strong perivascular cellularity: 3
Parenchyma/fibrosis	Normal: 0 Markedly abnormal with slight matrix deposition (<30% of total lung volume): 1 Severely abnormal with strong matrix deposition (>30% of total lung volume): 2

Supplementary table 2: Semiquantitative histopathology scoring system modified from the method of Ashcroft *et al.*[25-27].

<b>Gene Name</b>	<b>Reference</b>	<b>Gene Name</b>	<b>Reference</b>
SELE	Hs00174057	VTN	Hs00940758
IL6	Hs00985639	SMAD3	Hs00232219
IL8	Hs00174103	TGFb1	Hs00171257
CCL2	Hs00234140	VIM	Hs00185584
PAI-1	Hs01126606	CXCL1	Hs00236937
EDN1	Hs00174961	CXCL2	Hs00601975
MMP2	Hs01548724	FN1	Hs00365052
ACTA2	Hs00909449	ENG	Hs00923996
CTGF	Hs00170014	TFRC	Hs00951083
MMP9	Hs00957555	KDR	Hs00911700
TWIST1	Hs01675818	SNAIL1	Hs00195591
THY1	Hs00264235	HEY1	Hs01114113
BIRC5	Hs00978503	PLAUR	Hs00182181
NOS3	Hs00167166	CD44	Hs01075864
TWIST2	Hs02379973	CD34	Hs00990732
SMAD7	Hs00178696	PLAT	Hs00263492
TGFbR1	Hs00610320	SPP1	Hs00167093
TGFbR2	Hs00234253	COL3A1	Hs00164103
CDH5	Hs00901463	SELP	Hs00174583
VWF	Hs00169795	CCL5	Hs00174575
TIE1	Hs00892696	VCAM1	Hs00365486
TIE2	Hs00945146	HEY2	Hs00232622
COL1A2	Hs01028971	TAGLN	Hs00162558
S100A4	Hs00243202	TGFb2	Hs00234244

Supplementary table 3: Listing of the 48 genes followed by RT-PCR in control and irradiated HMVEC-L, and primers' references (Applied Biosystems).

## **Article 2 :**

*Ces travaux sont en cours et seront soumis en tant que premier auteur.*

### **Objectifs :**

La radiothérapie pulmonaire en conditions stéréotaxiques tend à devenir de plus en plus fréquemment utilisée en clinique, notamment dans le traitement de cancers pulmonaires non à petites cellules inopérables. Elle commence de plus désormais à être proposée aux patients refusant l'acte chirurgical. Bien que cette technique permette d'irradier de très faibles volumes avec de fortes doses par fraction, offrant ainsi un bon contrôle tumoral, elle ne permet cependant pas d'éviter le développement de pneumopathies radiques chez certains patients. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces effets secondaires est donc requise. Ce projet tend ainsi à caractériser les conséquences tissulaires d'une exposition du poumon droit à une seule irradiation forte dose localisée sur un faible volume. Le second objectif est d'investiguer le rôle potentiel joué par HIF-1 $\alpha$  dans la mise en place de ces pathologies.

### **Principaux résultats :**

L'exposition du poumon droit de souris à une dose unique de 90 Gy via un collimateur de 3 mm x 3 mm a permis d'induire une lésion focale sévère, sans dommages à la peau grâce à l'arc-thérapie. L'utilisation d'un scanner CBCT a mis en évidence un volume maximal de cette lésion à deux semaines après irradiation, avant une diminution dès un mois. Les analyses histologiques ont démontré que cette lésion correspond à un patch inflammatoire très dense associé à une destruction totale des structures alvéolaire. La présence d'un œdème dans le poumon ipsilatéral à deux semaines, mais résorbé par la suite, a de plus été caractérisée. A 20 semaines la lésion focale est consolidée via une accumulation de fibres de collagène et moins dense en cellules inflammatoires. Des altérations importantes du parenchyme pulmonaire ipsilatéral et controlatéral sont cependant visibles. Une bronchiolite est ainsi présente près du volume cible, avec l'observation de nombreux macrophages spumeux. La zone pleurale démontre pour sa part une alvéolite macrophagique et la présence de nombreuses bulles.

Des tests à l'effort réalisés sur un tapis de course pour rongeurs ont permis de démontrer que ces fortes altérations tissulaires sont corrélées à une diminution significative de la distance parcourue par rapport aux performances basales. Des analyses transcriptomiques ont été menées pour étudier les mécanismes moléculaires à l'origine de ces phénomènes. Celles-ci

ont mis en évidence un *clustering* des tissus issus de la lésion focale et du poumon ipsilatéral à tous les temps post-irradiation.

Peu de différences ont été démontrées entre les souris contrôles et celles invalidées pour HIF-1 $\alpha$  dans l'endothélium lors de l'ensemble de ces expérimentations. A la vue des analyses histologiques une surface d'œdème ipsilatéral et des septa alvéolaires plus épaisses ont toutefois été mesurées chez les souris floxées. De plus une trentaine de gènes sont encore modulés dans les poumons de ces souris alors que seuls deux d'entre eux le sont chez les animaux KOendo.

### **Conclusion :**

Cette étude a permis de mettre en évidence la bonne adéquation de ce modèle d'irradiation pour l'étude sur le long terme des conséquences d'une irradiation pulmonaire unique à forte dose. Une lésion focale très sévère a ainsi été induite avec des répercussions structurales sur les poumons ipsi et controlatéraux. Un œdème alvéolaire a de plus été observé à deux semaines après irradiation, phénomène actuellement très peu décrit dans la littérature. Ces données nous ont encouragé à étudier indirectement la fonction pulmonaire de nos animaux via la réalisation de tests à l'effort. Une diminution significative des performances a comme attendu ainsi été mesurée. Les analyses transcriptomiques confirment pour leur part les altérations importantes de l'ensemble du poumon droit, mettant ainsi en évidence l'impact de la lésion focale mais également des doses inférieures à la dose délivrée et affectant des volumes pulmonaires variables. Des expérimentations supplémentaires sont à prévoir pour préciser l'ensemble de ces mécanismes ainsi que le rôle de HIF-1 $\alpha$  dans la mise en place des lésions.

**Impact of HIF conditional deletion in the endothelial compartment on radiation pneumonitis using a preclinical mouse model of lung stereotactic arc therapy**

Jérémy Lavigne<sup>1</sup>, Nicolas Verger<sup>1</sup>, Morgane Dos Santos<sup>2</sup>, Alexandra Suissa<sup>1</sup>, Laurence Hamard<sup>3</sup>, Iman Momken<sup>3</sup>, Frédéric Soysouvanh<sup>1</sup>, Valérie Buard<sup>1</sup>, Olivier Guipaud<sup>1</sup>, Vincent Paget<sup>1</sup>, Georges Tarlet<sup>1</sup>, Fabien Milliat<sup>1</sup> and Agnès François<sup>1</sup>.

1. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), Service de Recherche en Radiobiologie et en Médecine régénérative, Laboratoire de Radiobiologie des expositions Médicales, 31 Avenue de la Division Leclerc, 92260 Fontenay-aux-Roses.
2. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), Service de Recherche en Radiobiologie et en Médecine régénérative, Laboratoire de Radiobiologie des expositions Accidentelles, 31 Avenue de la Division Leclerc, 92260 Fontenay-aux-Roses.
3. Unité de Biologie Intégrative des Adaptations à l'Exercice (UBIAE), Université Évry-Val-d'Essonne, 23 boulevard François Mitterrand, 91000 Evry.

## Introduction

Stereotactic body radiation therapy (SBRT) or stereotactic ablative radiotherapy (SABR) has become the treatment of choice for NSCLC inoperable patients or for those who refuse surgical resection. SBRT allows the use of high dose-per-fraction sizes (6-20 Gy) though the image-guided precise targeting of very small volumes [1]. SBRT provides an excellent tumor control rate with however persisting side effects such as radiation pneumonitis (RP) and radiation-induced lung fibrosis (RILF) and efforts have to be done to understand the physiopathological mechanisms responsible for side effects in these new treatment modalities [2].

Normal lung irradiation induces acute pneumonitis characterized by type I pneumocytes apoptosis, counterbalanced by reactive type II pneumocytes proliferation [3]. Irradiated type II pneumocytes undergo epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) during experimental lung fibrosis in mice [4]. Damage to endothelial cells such as apoptosis or endothelial activation through a pro-inflammatory and procoagulant phenotype compromises the integrity of alveolo-capillary units and favors acute tissue inflammation, RP and RILF development [5, 6]. Endothelial cells can also undergo an endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) and participate in radiation-induced chronic tissue scarring process [7]. Capillary damage may induce tissue hypoxia and compromise lung tissue regeneration [8]. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF1) is a transcription factor composed of 2 subunits, HIF-1 $\alpha$  and HIF-1 $\beta$  as a heterodimer. Whereas HIF-1 $\beta$  is constitutively expressed, HIF-1 $\alpha$  mRNA levels are finely regulated by oxygen availability within the tissue [9]. In normoxia, HIF-1 $\alpha$  is hydroxylated by prolyl hydroxylases (PHDs). Hydroxylated HIF-1 $\alpha$  forms a complex with the Von Hippel-Lindau protein (VHL), is ubiquitinated and addressed to the proteasome for degradation. Under hypoxic conditions, PHDs activity is inhibited, and stabilized HIF-1 $\alpha$  translocates into the nucleus and activates the expression of its target genes by binding to hypoxia-response elements. It is now well established that HIF plays a determinant role in lung development and diseases such as cancer, inflammation/fibrosis and pulmonary hypertension [10]. HIF-1 $\alpha$  mRNA expression in lung tumors is generally associated with poor prognosis [11]. HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  have been implicated in tumor growth and invasiveness, and strategies based on HIF inhibition in association to regular therapies are promising to control lung cancer progression and metastasis [10]. In a preclinical model of bleomycin-induced lung fibrosis in mice, HIF-1 $\alpha$  has been implicated in the TGF- $\beta$ -induced PAI-1 secretion by alveolar macrophages during lung fibrosis development [12]. EMT participates to lung fibrosis and is

present in lungs from patients with idiopathic pulmonary fibrosis [4]. This process is under the control of a hypoxia- HIF-1 $\alpha$ -ZEB1 pathway in bleomycin-induced fibrosis in mice [13]. A classical complication of idiopathic pulmonary fibrosis is pulmonary hypertension. In a chronic hypoxia model, pulmonary hypertension has been shown to be mediated by HIF-1 $\alpha$  activation [14] and mice with selective HIF deletion in the endothelium are protected from lung fibrosis associated with pulmonary hypertension [15].

Conversely to idiopathic pulmonary fibrosis or preclinical models of lung fibrosis such as bleomycin instillation, the role of HIF in radiation-induced pneumonitis and fibrosis is poorly documented. Tissue oxidative stress, hypoxia, angiogenesis and inflammation have been observed after fractionated (8 Gy x 5 days) hemithoracic irradiation in the rat, associated with early HIF-1 $\alpha$  expression, driving the latter a potential active participant in radiation-induced lung damage [16]. Moreover, in a model of 28 Gy single dose hemithoracic irradiation, the radioprotective effect of the superoxide dismutase mimetic MnTE-2-PyP5<sup>+</sup> occurred together with decreased HIF-1 $\alpha$  expression [17]. These aforementioned studies highlighting a possible role for HIF-1 $\alpha$  in radiation-induced normal lung damage used ablative doses of radiation on large volumes. The hallmark of SBRT is the use of ablative doses of radiations on very small volumes of normal lung. Studies have been published modelling stereotactic irradiation in rabbits using 1.6 cm<sup>3</sup> irradiation fields [18, 19]. Preclinical modeling of stereotactic irradiation is now possible in mice thanks to image-guided highly focused irradiator with sub-millimetric precision [20-22], including for the effective targeting of spontaneous lung tumors in a genetically engineered mouse model [23]. In a recent study using 20, 50 or 90 Gy single doses to different tissue volumes in stereotactic conditions in mice, Choi et al. demonstrated that radiation-induced hypoxia favors EndoMT via activation of HIF-1 $\alpha$  and participate in RILF, confirming the role of HIF-1 $\alpha$  in lung damage, with emphasis on endothelial compartment [7].

To go further, we made the choice to use small animal radiation research platform and mouse engineering to explore the putative role of HIF-1 $\alpha$  in a preclinical model of lung stereotactic irradiation. Conditional deletion of HIF-1 $\alpha$  in the endothelium was obtained using the CreLoxp strategy and a 90 Gy single dose was applied to the right lung, using arc therapy to avoid cutaneous lesions and allow long term following.

## Materials and methods

### Animal experimental procedures

#### *Mouse strains*

All animal experiments procedures were approved by the ethics committee of the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (protocol number P15-03), animal facilities agreement number C92-032-01. The conditional tissue specific HIF-1 $\alpha$  deletion was generated by crossing mice expressing Cre Recombinase under the endothelial promoter VE-cadherin (VECad-Cre<sup>+/+</sup> mice [24]) with HIF-1 $\alpha$  floxed mice (B6.129-*Hif1 $\alpha$* <sup>tm3Rsj0</sup>/J strain from the Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA). The following mice were used for experiments: HIF-1 $\alpha$ <sup>flx/flx</sup>/VECad-Cre<sup>-/-</sup> mice used as controls (named HIF-1 $\alpha$ <sup>flx/flx</sup>) and HIF-1 $\alpha$ <sup>flx/flx</sup>/VECad-Cre<sup>+/-</sup> mice (named HIF-1 $\alpha$  KO<sup>endo</sup>).

#### *Cone beam computed tomography (CBCT), treatment planning and dose delivery*

The SARRP (Small Animal Radiation Research Platform, XSTRAHL Ltd., UK) provides 3D volumetric image guidance for localization and targeting of the dose [25]. Mice were anesthetized (1.5% isoflurane, inhalation) and immobilized on the treatment bed. CBCT images were obtained using uncollimated beam (20 x 20 cm), a high tension of 60 kV, an intensity of 0.8 mA with an inherent and additional filtration of 0.8 and 1 mm of Beryllium and Aluminum respectively,, with continuous beam on and 360° (horizontal) stage rotation between the x-rays source and the digital flat panel detector. A total of 236 projections were obtained and a 3D reconstruction image of the mouse was transferred to the dose planning, verification and delivery Muriplan® system. For irradiation, mice were anesthetized with ketamine (100 mg/Kg) and xylazine (10 mg/Kg). After image segmentation into air, lung, fat, tissue and bone, we then placed the isocenter within the right lung on the 3D image and arc therapy was planned to deliver 90 Gy to the isocenter using the 3 x 3 mm<sup>2</sup> collimator with immobile stage and 240° gantry rotation from 160 to -80° for heart sparing. Dose delivery was performed using a tension of 220 kV and an intensity of 13 mA with inherent and additional filtrations of 0.8 mm and 0.15 mm of Beryllium and copper respectively corresponding to our reference configuration for dose computation with Muriplan. Muriplan system provides also dose/volume histograms (DVH) and isodose lines to ensure accuracy of desired configuration and chosen treatment modalities.

### *Lung damage assessment by CBCT*

Follow-up CBCT scans were performed at 2, 4, 8 and 12 weeks after irradiation. The volume of the focal radiation-induced injury was assessed by contouring the whole lung followed by the whole lung except the damaged area on CBCT images. Given the small size of the target volume, this contouring strategy was more precise than directly measuring the damaged area. Although the SARRP allowed us to acquire and analyze images at different end points, in order to improve image resolution, additional mouse lung imaging were performed at “plateforme d’imagerie du vivant”, Université Paris Descartes, faculté de chirurgie dentaire” at 20 weeks using a micro-CT scanner (Quantum GX, PerkinElmer) with respiratory gating. The images were acquired at 90 kV, 160  $\mu$ A, no additional filtration and with a FOV (Field Of View) of about 20x20x20mm for a resolution of 40 micrometers. The estimated shooting time was about 4 minutes and 10 seconds and 512 slices were acquired.

### *Test of maximal running distance*

Results of running maximal distance tests can be influenced by sexe and age, so only males HIF<sup>flx/flx</sup> and HIF KO<sup>endo</sup> mice were used, at the age of 4 months  $\pm$  6 days. Running speed tests were performed at early afternoon, on a calibrated 5% slope treadmill (BioSeb, USA) by an incremental exercise test. Mice were trained 4 and 2 days before the first real test giving a control value before irradiation for each mouse. The habituation program consisted in running 2 min at 5 cm.s<sup>-1</sup>, 2 min at 17 cm.s<sup>-1</sup>, 2 min at 18 cm.s<sup>-1</sup> followed by an increment of 1 cm.s<sup>-1</sup> every minute until 12 minutes of exercise. Mice unable to follow the habituation program were excluded. The real tests performed before and after irradiation were similar as habituation exercise, with no time limit. The distance traveled at the time as the mouse becomes unable to run is then registered.

### *Lung tissue harvesting and treatment*

Mice were anesthetized at 2, 8 and 20 weeks post-exposure and total lung/heart bloc harvested for macroscopic observation. For histology, hearts, right and left lungs were then fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Five micrometers paraffin tissue sections were used for HES, Masson’s Trichrome and reticulin stainings and for immunohistological studies. For mRNA preparation, lung tissues were frozen in RNAlater™ RNA Stabilization Reagent (Qiagen, Valencia, CA) until analysis.

### *Histopathology and immunohistochemistry*

Histopathology: HES, Masson's Trichrome and reticulin-stained tissue sections were observed and used to the appreciation of global lesion severity. Measurements of the percentage of lung concerned with oedema and alveolar septa thickness were performed using the Visiol@bTM2000 image analysis software (Biocom SA, Les Ulis, France).

Immunohistochemistry: Sections were incubated with rabbit polyclonal antibodies to CD68, rabbit polyclonal to myeloperoxidase (Abcam, Paris, France), or rabbit polyclonal to fibrin(ogen) (Dako, Les Ulis, France). Samples were then incubated with Alexa fluor $\square$ -conjugated corresponding secondary antibodies (Life Technologies, Saint Aubin, France). Sections were mounted in Vectashield mounting medium with DAPI (Eurobio/Abcys, Courtaboeuf, France).

#### *Tissue RNA extraction and quantitative real-time PCR*

Total RNA was prepared with the total RNA isolation kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). After quantification on a NanoDrop ND-1000 apparatus (NanoDrop Technologies, Rockland, DE), reverse transcription was performed with 1  $\mu$ g RNA using a reverse transcription kit from Applied Biosystems (Courtaboeuf, France). Quantitative PCR was carried out on a 7900HT Fast-Real Time PCR system (Applied Biosystems) using on demand TaqMan $\text{\textcircled{R}}$  Low Density Array regrouping a list of 90 genes previously chosen according to their demonstrated role in tissue response to radiation exposure or to their established links with HIF-1 $\alpha$  pathway (Applied Biosystems, see table 1), together with 5 different housekeeping genes. Relative mRNA was quantified using the  $\Delta\Delta$ CT method. DataAssist $\text{\textsuperscript{TM}}$  software (Life Technologies) was used to perform hierarchical clustering with global normalization and Pearson's correlation.

## Results

### *SBRT delivery by arc-therapy using the SARRP*

Focal irradiation was delivered to the right lung to ensure maximal heart sparing. Figure 1A shows isocenter positioning and isodose lines obtained when delivering 240° arc-therapy with gantry rotation from 160° to -80° to remain tangential to the heart to obtain maximal sparing. Arc-therapy was also chosen to avoid skin/muscles necrosis. Angles of start and stop points for gantry rotation may vary according to mouse morphology. Both lungs and the heart have been contoured (figure 1B) to obtain DVH (figure 1C). The right lung was contoured with patch exclusion to give a representative mean lung dose outside the target volume. Calculated mean doses were 4.02 Gy to the heart, 5.90 Gy to the left lung and 11.72 Gy to the right lung. Contouring allowed total mouse lung volume calculation at 0.5 cm<sup>3</sup>. Arc therapy delivering on 240° using 3x3 mm<sup>2</sup> beam collimation generates a cylindrical target volume of 0.021 cm<sup>3</sup>, i.e. around 4% of the total lung volume, a percentage comparable to what can be done in the clinic.

### *Clinical consequences and macroscopic aspects of lung tissue following 90 Gy focal irradiation*

No noticeable clinical consequence was observed on irradiated animals all along the experimental procedure. Dose distribution by arc-therapy avoided damaging the skin, and only fur depigmentation was observed at 8 weeks (figure 2A, arrow).

### *CBCT*

The onboard CBCT scanner was used to image and follow lung tissue damage. Images were obtained at 2, 4, 8, 12, 16 and 20 weeks post-exposure. Figure 2B shows examples of pictures obtained for the same mouse before irradiation and until 12 weeks, showing the target volume as a white patch on the scanner, imaging densification of injured tissue compared to healthy lung. No ground-glass opacity was observed outside the irradiated area. Measurement of injured patch on scanner images revealed progressive diminution of the volume of the injured area, signing lesion consolidation and constriction (figure 2C). In the HIF-1 $\alpha$ <sup>flx/flx</sup> group, the patch volume decreased at 4 weeks compared to 2 weeks (indicated by asterix), and remained stable until 20 weeks. In the HIF-1 $\alpha$  KO<sup>endo</sup> group, the patch volume was significantly decreased at 4 (compared to 2), 8 (compared to 4) and 16 weeks compared to 12 weeks

(indicated by asterix). Nevertheless, the size of the patch at each time point was comparable in both mouse strains, suggesting no effect of HIF-1 $\alpha$  endothelial deletion.

#### *Macroscopic whole lung observation*

Macroscopic observation of the whole heart/lung bloc the day of euthanasia revealed an easily detectable greyish injured area at all-time points. Two weeks after focal irradiation, the whole ipsilateral lung appears voluminous and red/brownish, resembling pulmonary red hepatization (figure 2D). Immersed in water, the concerned lobes sink whereas the left lung floats, this is a feature of lung hepatization. At 8 and 20 weeks, hepatization resolves as shown by right lung pink coloration and floating again when immersed.

#### *Impact of focal irradiation of maximal running distance*

Figure 3A shows the maximal distance traveled during the running test by unirradiated and irradiated HIF-1 $\alpha$ <sup>flx/flx</sup> and HIF-1 $\alpha$  KO<sup>endo</sup> mice. Each mouse performed the running test before and 2, 4 and 8 weeks after irradiation. The Generalized Estimating Equation (GEE) test (figure 3B) revealed that irradiation reduces traveled distance from 2 to 8 weeks post-exposure ( $p < 0.001$ ), with no significant influence of the mouse strain ( $p = 0.76$ ).

#### *Histopathological changes in the lung tissue focally irradiated with 90 Gy*

Two weeks post-irradiation, the target volume shows dense/hypercellular inflammatory infiltrate with total destruction of alveolar architecture, hyaline material deposition in the lung parenchyme and fibrino-leucocytary bronchiolitis and alveolitis (figure 4A). In the target volume margins, we perceive remaining alveolar structures with however pictures of severe fibrino-leucocytary/oedematous/congestive alveolitis with foamy macrophages. Focal irradiation impacts the quasi totality of lung tissue, mainly characterized by out-of-field puddle-like oedema and macrophagic congestive alveolitis. After 8 weeks, dense inflammatory patch persists with perialveolar lymphocytic infiltrate and macrophagic bronchiolitis, showing foamy and hemosiderin-laden macrophages. Out-of-field oedema disappeared but severe congestive alveolitis with macrophages and perivascular lymphocytic infiltrate are still present from the target volume margins to the pleural area. At 20 weeks, the target volume is consolidated with dense hyaline material and decreased immune cells density. Bronchiolitis occurs close to the target volume showing foamy and hemosiderin-laden macrophages. The pleural area demonstrates macrophagic alveolitis and multiple bubbles which may be at risk for pneumothorax.

Masson's trichrome coloration at 2 weeks showed strong blue-stained unorganized collagen structures in the patch and light blue colored effusion material in the alveoli. At 20 weeks, lesion is characterized by a severely consolidated and fibrosed injured area with dense collagen accumulation colored in dense blue with Masson's trichrome (figure 4B). Reticulin belongs to the extracellular matrix, forms a chain-like fence to support lung parenchyma and can be considered as the alveoli frame. Reticulin coloration shows well-organized alveoli spaces in control tissues and a densification of the reticulin network at 2 weeks with however still recognizable alveoli structures. At 20 weeks, the injured area lost totally its alveoli organization and reticulin staining demonstrated a dense muddle of fibers, signing together with Masson's trichrome coloration a severe fibrosis of the exposed lung tissue.

Finally and as imaged by the patch's volume measurement (figure 2C), no difference was visible between HIF-1 $\alpha$ <sup>flx/flx</sup> and HIF-1 $\alpha$  KO<sup>endo</sup> mice concerning the global severity of radation damage.

*The presence of focal radiation damaged area impacts both ipsilateral and contralateral lungs differentially between strains*

Oedema concerned only the ipsilateral lung. The surface of tissue section concerned with oedema was measured and expressed as a percentage of total tissue section and shown figure 5A. At 2 weeks, HIF-1 $\alpha$  KO<sup>endo</sup> mice demonstrated a significantly reduced surface concerned by oedema compared to HIF-1 $\alpha$ <sup>flx/flx</sup> mice. Oedema disappeared at 8 weeks in both mouse strains. Measurement of alveolar thickness in both the ipsilateral and contralateral lungs was used as a witness of radiation damage to the lung parenchyma (figure 5B). Alveolar thickness in the ipsilateral lung was significantly increased at 8 and 20 weeks, only in HIF-1 $\alpha$ <sup>flx/flx</sup> mice (left panel). In the controlateral lung, alveolar thickness was increased at all-time points post-irradiation (right panel). A significant difference between strains was observed at 2 weeks, where alveolar septa in HIF-1 $\alpha$ <sup>flx/flx</sup> mice were thicker than in HIF-1 $\alpha$  KO<sup>endo</sup> mice. Neutrophils counting in the ipsilateral lung revealed an acute (2 weeks) increase in neutrophil number in HIF-1 $\alpha$ <sup>flx/flx</sup> mice only, with a rebound at 20 weeks again only in HIF-1 $\alpha$ <sup>flx/flx</sup> mice (figure 5C, left panel). In the controlateral lung (figure 5C, right panel), an increase in neutrophil numbers is observed 20 weeks post-exposure in HIF-1 $\alpha$ <sup>flx/flx</sup> mice only (figure 5C, right panel).

*Neither irradiated patch/ipsilateral lung nor mouse genotype can be discriminated by gene expression levels*

Genes have been measured in irradiated target volume (patch) and ipsilateral lungs of HIF-1 $\alpha$ <sup>flx/flx</sup> and HIF-1 $\alpha$  KO<sup>endo</sup> mice at 2 weeks (acute time point) and at 20 weeks (late time point). The heat map shown in figure 6 highlights 3 different groups: group 1 includes unirradiated tissues, group 2 includes both irradiated patch and ipsilateral lung at 20 weeks from both mouse strains, and group 3 includes irradiated patch and ipsilateral lung at 2 weeks from both mouse strains. This hierarchical clustering highlights that radiation exposure impacts gene expression in both irradiated patch and ipsilateral lung similarly, and is unable to discriminate between mouse strains. Venn diagrams (figure 7) show relationships between sets of genes differentially expressed in both mouse strains in the patch versus ipsilateral lung at 2 weeks (figure 7A), and again in both mouse strains in the patch at 2 weeks versus 20 weeks (figure 7B). In Venn diagrams, sets are represented as close circles (in the present work 4 sets corresponding to the 4 groups studied), and overlapped in every possible ways showing the number of genes belonging to one or multiple sets. At 2 weeks (figure 7A), 26 genes are in common to all samples and differentially expressed both in the patches and in the ipsilateral lungs of both mouse strains. A higher number of genes are modified in the patches, but numerous also in the ipsilateral lungs. Only 9 genes are specific to the ipsilateral lungs. When comparing the patches of both mouse strains at 2 and 20 weeks (figure 7B), we can see that the majority of differentially expressed genes concerns the acute time point (left part of the diagram). At 20 weeks, 30 genes are still differentially expressed in the patch of HIF-1 $\alpha$ <sup>flx/flx</sup> mice, whereas only 2 genes remain modified at this time point in the HIF-1 $\alpha$  KO<sup>endo</sup> mice (right part of the diagram).

## Discussion

Important progresses have been realized in the understanding of radiation-induced damage on the healthy lung using models of entire or hemi-thorax irradiations[26]. Large field irradiation is suited for the study of radiation-induced healthy lung damage following 3D-CRT and IMRT radiation protocols. However, the recent development of SBRT for the treatment of small lung tumors delivering very high doses per fraction up to 20 Gy on small volumes necessitates nowadays new radiation exposure facilities to organize adapted preclinical models to study the mechanisms of radiation damage to healthy tissues in such situations. We demonstrated here that the SARRP enables SBRT modeling in mice and precise dose delivery, using beam collimation and image guidance dosimetry planning to spare organs at risk such as the heart. Several studies have been published using such preclinical model of mouse SBRT using one fixed collimated beam and thus delivering high doses to the thoracic skin/muscles, preventing long term studies [20, 21, 27, 28]. The 240° arc-therapy developed here allows high dose planning and very long term follow-up while drastically reducing the dose received by skin and muscles. The aim of this study was double: 1) to characterize lung tissue damage both into the target volume and in the ipsilateral and contralateral lungs following focal exposure to 90 Gy in arc-therapy; 2) to investigate the impact of HIF-1 $\alpha$  deletion specifically in the endothelial compartment on observed tissue damage.

Confirming the advantage of arc-therapy, no skin damage was observed, only fur depigmentation at 8 weeks was observable on the thorax as a beam mark. The two weeks' time point demonstrated a dense inflamed irradiated patch, comparable to what was already observed in previous work using 90 Gy focal irradiation [28]. The CBCT images showed a diffuse injury patch, larger than those observed at latter time points, with no difference between strains at any time point. Macroscopical observations revealed red ipsilateral lung hepatization, however without extended ground-glass opacity at scanner images observation, but which may explain the diffuse aspect of the injured patch at 2 weeks. The red hepatization signs that the lung parenchyma is gorged with effused matter. Histological analyses of the target volume did not show noticeable differences in damage severity between strains but confirmed red hepatization showing ipsilateral lung filled with intra-alveolar material in puddles.

Dose-volume histograms are not available in published data with the same preclinical models, but no such oedema has been reported in the ipsilateral lung. Lung oedema can result from

left heart insufficiency. In our study, the treatment planning system allows dose-volume histogram tracing and the calculation of mean doses received by each of the contoured organs. In our conditions, the mean heart dose was 4.02 Gy. This is incompatible with radiation-induced heart dysfunction sufficient to induce lung hemodynamic oedema. A recent study showed impaired contractile reserve and left ventricle systolic dysfunction after 14 and 20 Gy localized heart irradiation using the SARRP. The authors unfortunately did not follow lung consequences of such irradiation [29]. Moreover, the hypothesis of a hemodynamic oedema is incompatible with its resorption at 8 weeks. Lung oedema may be due to the dose received outside the target volume. Mean lung dose to the ipsilateral lung was 11.72 Gy. Studies using whole thorax exposures to dose ranges between 12 and 20 Gy do not report such oedema, suggesting that the dose received by the ipsilateral lung is not sufficient to generate lung oedema. The reasons for oedema development in our conditions are still unknown, but may probably be related to both the dose received outside the target volume and the presence of a severely damaged area. Finally, an interesting observation is that HIF-1 $\alpha$  deletion in the endothelial compartment reduces the surface of lung concerned by oedema development, suggesting a vascular/microvascular role. This merits further investigations. Finally, the thickness of alveolar septa, used as a witness of lung parenchymal damage, was higher in HIF-1 $\alpha^{\text{flx/flx}}$  mice at 8 and 20 weeks in the ipsilateral lung, and at 2 weeks in the contralateral lung. This tendency of higher damage severity is confirmed by neutrophils counting, revealing increased neutrophil numbers only in HIF-1 $\alpha^{\text{flx/flx}}$  mice at 2 weeks with a rebound at 20 weeks. Neutrophils are known as acute reacting cells in the process of tissue response to trauma. Thorax irradiation has been reported to favor the recruitment of immune cells such as monocytes, neutrophils and lymphocytes [30], including foamy macrophages as observed in the present study [31]. Data concerning the precise nature of invading immune cells after focal irradiation of the lung are sparse. Sohn et al. observed increased numbers of macrophages and eosinophils but not neutrophils in the broncho-alveolar lavages of mice 2 weeks after 75 Gy on the left lung [32]. However, immune cells invading the pulmonary interstitium after whole thorax irradiation are not reflected within the broncho-alveolar lavage populations [30]. Studies are ongoing in the laboratory to identify immune cells populations in the focally irradiated area and in remote tissues. Primary data indicate severe foamy macrophages invasion in the ipsilateral lung, which may suggest disturbance of lipid metabolism after focal irradiation as observed after thoracic irradiation [31].

These observations encouraged us to perform running distance capacity tests on both mouse strains, assuming that the observed oedema may impact running capacities. These tests revealed that focal irradiation impacts running capacity, but failed to put in evidence any difference between strains, despite what has been noticed in histological analyses. Hong et al. performed lung functional assessment by measuring the forced-oscillation lung mechanics after 90 Gy focally delivered to the central and peripheral areas of the left mouse lung. The study demonstrated signs or respiratory distress in irradiated mice 4 weeks post-exposure [21]. We observed such decreased lung capacity imaged by decreased distance traveled during running test, but maybe such measurements are not precise enough to detect differences between both irradiated strains.

To go further, we analyzed gene expression levels in irradiated patches and ipsilateral lungs of both mouse strains, 2 and 20 weeks after focal irradiation. A recent study from Jin et al. reported microarray data showing a total of 39,429 genes differentially expressed in the injured area following focal lung irradiation (90 Gy) of mouse lung trying to find “signature” genes for SBRT compared to whole left lung exposure to 20 Gy, with no data outside the target volume [28]. Here we made the choice to select genes of interest based on known mechanisms implicated in normal tissue response to radiation exposure (inflammation, fibrosis, coagulation, senescence, apoptosis). The genes highlighted by Jin et al. are thus absent from our listing, but measuring those genes in our samples would be an interesting point. Gene expression levels data obtained in the present study reveal several points. First of all, focal lung irradiation induces changes in gene expression levels of numerous genes described in other irradiation configurations. Secondly, focal irradiation severely impacts the ipsilateral lung, and this would be interesting to compare with gene expression levels after hemithoracic irradiation to doses comparable to the mean lung dose obtained in the present study. Such modifications of gene expression in neighboring lung regions after focal exposure to 90 Gy have been reported, with however no data concerning isodose lines or mean lung doses [33]. Finally, if it was impossible to discriminate between HIF-1 $\alpha^{\text{flx/flx}}$  and HIF-1 $\alpha^{\text{KO}^{\text{endo}}}$  mice on the basis of gene expression levels, it is interesting to note that at 20 weeks, in irradiated patch of HIF-1 $\alpha^{\text{flx/flx}}$  mice, 30 genes are still modified, whereas only 2 genes are modified in HIF-1 $\alpha^{\text{KO}^{\text{endo}}}$  mice. The irradiated patch seems to consolidate and return to normal faster in HIF-1 $\alpha^{\text{KO}^{\text{endo}}}$  mice compared to HIF-1 $\alpha^{\text{flx/flx}}$  ones. Investigating the reasons for such differences warrants exciting results in the future.

In conclusion, this study demonstrates that arc-therapy for high dose focal irradiation of mouse lung is a good model to spare skin/muscle tissues and allows long term studies. Focal irradiation impact the target volume but also strongly the ipsilateral lung, showing severe oedema never encountered in whole thorax irradiation models, and strong gene expression levels modifications. If damage to the ipsilateral lung is representative of the calculated mean lung dose or isodose lines has to be investigated. Finally, HIF-1 $\alpha$  deletion in the endothelial compartment seems to be able to ensure a relative protection to the ipsilateral lung but this has to be confirmed.

### Figure legends

Figure 1: **SBRT delivery by arc-therapy using the SARRP.** A: 3D reconstruction image of a mouse transferred to the dose planning, verification and delivery Muriplan® system showing isocenter position and isodose lines obtained when delivering 90 Gy by arc-therapy/240°. B: Tissue contouring necessary to calculate the dose-volume histograms. Right lung: green; left lung: blue; heart: pink. C: example of dose-volume histogram for right lung (pink), left lung (blue), heart (yellow) and target volume (red). Dose-volume histograms allow the calculation of mean doses received by each contoured organ as shown in the box on the right side of the histogram.

Figure 2: **Focally irradiated area is visible on CBCT and associated with ipsilateral lung hepatization.** A: Picture of fur depigmentation observed 8 weeks following 90 Gy focal irradiation by arc-therapy. B: CBCT images obtained in the same mouse from 2 to 16 weeks post-irradiation, showing the injured patch as a white area inside the black lung volume. The image shown for the 20 weeks' time point has been obtained using a micro-CT scanner. C: Volume of the patch measured on CBCT scans from 2 to 20 weeks post-exposure in both mouse strains. \* $p < 0.0001$  compared to the previous time point in the same strain. 2, 4 and 8 weeks 15 < n < 17; 12 and 16 weeks n=6; 20 weeks n=4. D: Macroscopic aspect of the whole lungs/heart block at the time of tissue harvesting, with examples of 2 and 8 weeks' time points. For each time point, the left panel shows lungs/heart block in the open air, and the right panel shows the same sample immersed in physiological serum. 1: Ipsilateral lung; 2: Controlateral lung; white circle: Irradiated area.

Figure 3: **Focal irradiation reduces the maximal running distance.** A: distance traveled before irradiation and 2, 4 and 8 weeks post-exposure in controls and in HIF-1 $\alpha$ <sup>flx/flx</sup> and HIF-1 $\alpha$ KO<sup>endo</sup> mice. Each mouse is tested before and after irradiation until 8 weeks. B: table

showing results of Generalized Estimating Equation test for statistical differences between groups and demonstrating statistically significant effect of radiation exposure but not mouse genotype on the distance traveled. n=5 per group.

Figure 4: **Histopathology of focally irradiated lung.** A: HES staining of control and irradiated lungs 2, 8 and 20 weeks post-irradiation. Red dotted square: irradiated area; Blue dotted square: area in proximity to the irradiated patch; Black dotted square: near to the pleural area. Left column magnification x25; others x400. B: Masson's trichrome (blue) and reticulin (black) stainings on control and irradiated lungs 2 and 20 weeks post-irradiation. Upper line magnification x25; others x400.

Figure 5: **HIF-1 $\alpha$  endothelial deletion reduces lung damage outside the target volume.** A: Surface of lung oedema measured in the ipsilateral lung at 2 and 8 weeks following focal irradiation in HIF-1 $\alpha^{\text{flx/flx}}$  and HIF-1 $\alpha\text{KO}^{\text{endo}}$  mice. n=6 per group. B: Thickness of the alveolar septa reflecting damage to the lung parenchyma measured in the ipsilateral and contralateral lungs in control mice (floxed mice), and HIF-1 $\alpha^{\text{flx/flx}}$  and HIF-1 $\alpha\text{KO}^{\text{endo}}$  irradiated mice at 2, 8 and 20 weeks post-exposure. \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001 compared to control values; §p<0.05; §§§p<0.001 between indicated groups. 3<n<9 per group. C: Number of neutrophils per field counted in ipsilateral and contralateral lungs in control mice (floxed mice), and HIF-1 $\alpha^{\text{flx/flx}}$  and HIF-1 $\alpha\text{KO}^{\text{endo}}$  irradiated mice at 2, 8 and 20 weeks post-exposure. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 compared to control group. 3<n<8 per group.

Figure 6: **Gene expression levels are severely impacted in the ipsilateral lung.** Assay heat map illustrating differentially expressed genes among 90 genes measured in the target volume and in the ipsilateral lungs 2 and 20 weeks after focal lung irradiation of HIF-1 $\alpha^{\text{flx/flx}}$  and HIF-1 $\alpha\text{KO}^{\text{endo}}$  mice. For one gene considered, red represents high expression and green represents low expression. 3<n<5 per group.

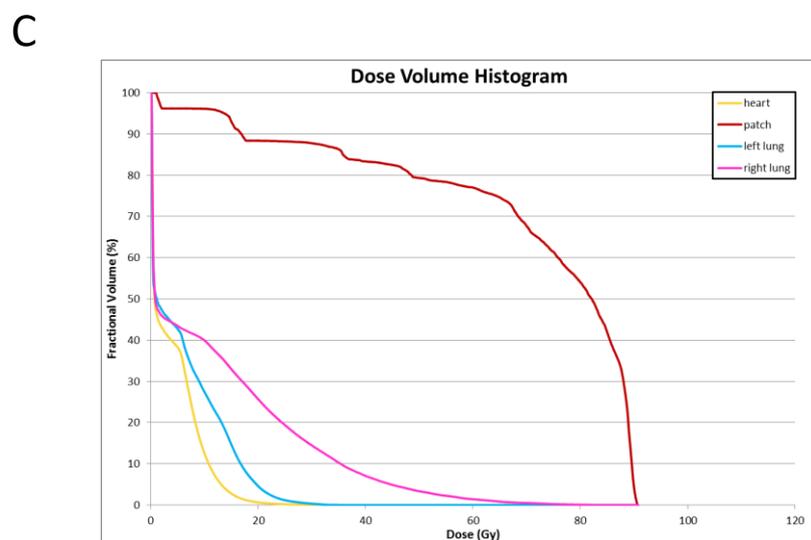
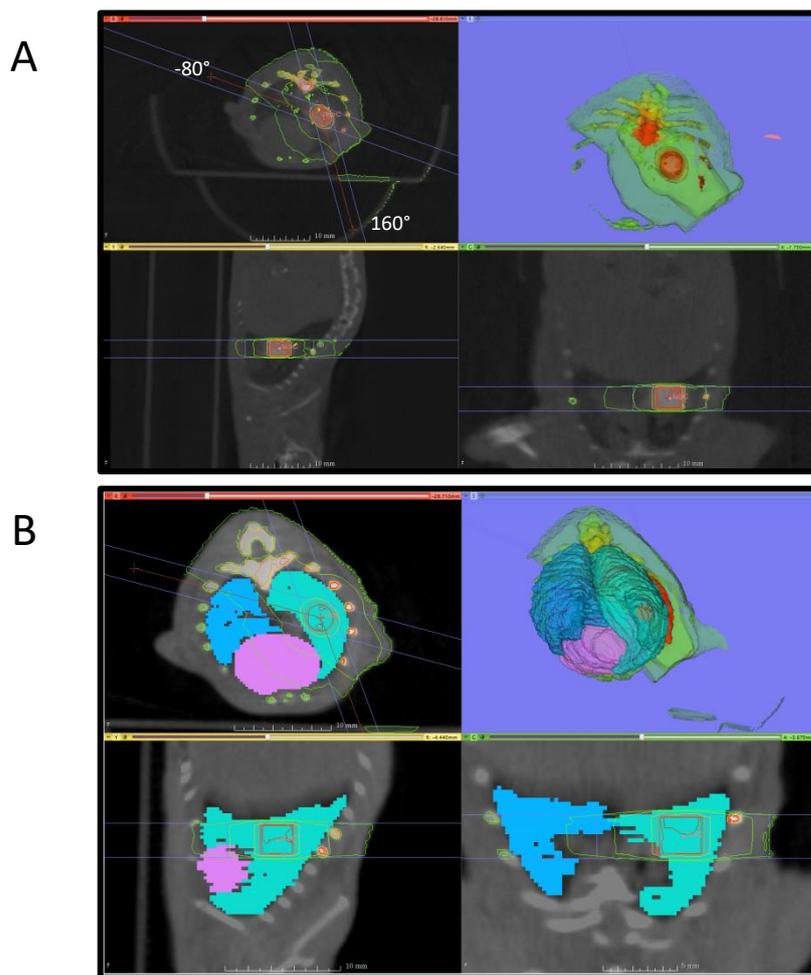
Figure 7: **HIF-1 $\alpha$  deletion in the endothelium may impact gene expression modifications in the target volume at 20 weeks.** A: Venn diagram representing gene sets when comparing irradiated patch and ipsilateral lungs 2 weeks post-exposure in both mouse strains. Corrected p values using the Benjamini-Hochberg method and p value<0.05 considered significant. B: Venn diagram representing gene sets when comparing irradiated patch at 2 and 20 weeks post-exposure in both mouse strains. Corrected p values using the Benjamini-Hochberg method and p value<0.05 considered as significant.

## References

1. Folkert, M.R. and R.D. Timmerman, *Stereotactic ablative body radiosurgery (SABR) or Stereotactic body radiation therapy (SBRT)*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017. **109**: p. 3-14.
2. Kang, K.H., et al., *Complications from Stereotactic Body Radiotherapy for Lung Cancer*. *Cancers (Basel)*, 2015. **7**(2): p. 981-1004.
3. Almeida, C., et al., *The role of alveolar epithelium in radiation-induced lung injury*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e53628.
4. Kim, K.K., et al., *Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(35): p. 13180-5.
5. Qiu, J., J. Li, and T.C. He, *Endothelial cell damage induces a blood-alveolus barrier breakdown in the development of radiation-induced lung injury*. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2011. **7**(4): p. 392-8.
6. Fuks, Z., et al., *Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death in vitro and in vivo*. *Cancer Res*, 1994. **54**(10): p. 2582-90.
7. Choi, S.H., et al., *A Hypoxia-Induced Vascular Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Development of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(16): p. 3716-26.
8. Fleckenstein, K., et al., *Temporal onset of hypoxia and oxidative stress after pulmonary irradiation*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2007. **68**(1): p. 196-204.
9. Yu, A.Y., et al., *Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung*. *Am J Physiol*, 1998. **275**(4 Pt 1): p. L818-26.
10. Shimoda, L.A. and G.L. Semenza, *HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011. **183**(2): p. 152-6.
11. Yohena, T., et al., *Upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA and its clinical significance in non-small cell lung cancer*. *J Thorac Oncol*, 2009. **4**(3): p. 284-90.
12. Ueno, M., et al., *Hypoxia-inducible factor-1alpha mediates TGF-beta-induced PAI-1 production in alveolar macrophages in pulmonary fibrosis*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011. **300**(5): p. L740-52.
13. Guo, L., et al., *Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Is Involved in Bleomycin-Induced Lung Fibrosis*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 232791.
14. Ball, M.K., et al., *Regulation of hypoxia-induced pulmonary hypertension by vascular smooth muscle hypoxia-inducible factor-1alpha*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014. **189**(3): p. 314-24.
15. Bryant, A.J., et al., *Endothelial HIF signaling regulates pulmonary fibrosis-associated pulmonary hypertension*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016. **310**(3): p. L249-62.
16. Rabbani, Z.N., et al., *Hypoxia inducible factor 1alpha signaling in fractionated radiation-induced lung injury: role of oxidative stress and tissue hypoxia*. *Radiat Res*, 2010. **173**(2): p. 165-74.
17. Gauter-Fleckenstein, B., et al., *Early and late administration of MnTE-2-PyP5+ in mitigation and treatment of radiation-induced lung damage*. *Free Radic Biol Med*, 2010. **48**(8): p. 1034-43.
18. Cai, J., et al., *A rabbit irradiation platform for outcome assessment of lung stereotactic radiosurgery*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009. **73**(5): p. 1588-95.
19. Mata, J., et al., *Pulmonary toxicity in a rabbit model of stereotactic lung radiation therapy: efficacy of a radioprotector*. *Exp Lung Res*, 2014. **40**(6): p. 308-16.
20. Cho, J., et al., *High dose-per-fraction irradiation of limited lung volumes using an image-guided, highly focused irradiator: simulating stereotactic body radiotherapy regimens in a small-animal model*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010. **77**(3): p. 895-902.
21. Hong, Z.Y., et al., *Development of a small animal model to simulate clinical stereotactic body radiotherapy-induced central and peripheral lung injuries*. *J Radiat Res*, 2014. **55**(4): p. 648-57.

22. Hong, Z.Y., et al., *A preclinical rodent model of acute radiation-induced lung injury after ablative focal irradiation reflecting clinical stereotactic body radiotherapy*. *Radiat Res*, 2014. **182**(1): p. 83-91.
23. Du, S., et al., *Stereotactic Body Radiation Therapy Delivery in a Genetically Engineered Mouse Model of Lung Cancer*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2016. **96**(3): p. 529-37.
24. Alva, J.A., et al., *VE-Cadherin-Cre-recombinase transgenic mouse: a tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells*. *Dev Dyn*, 2006. **235**(3): p. 759-67.
25. Wong, J., et al., *High-resolution, small animal radiation research platform with x-ray tomographic guidance capabilities*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008. **71**(5): p. 1591-9.
26. Tsoutsou, P.G. and M.I. Koukourakis, *Radiation pneumonitis and fibrosis: mechanisms underlying its pathogenesis and implications for future research*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006. **66**(5): p. 1281-93.
27. Hong, Z.Y., et al., *Time, Dose, and Volume Responses in a Mouse Pulmonary Injury Model Following Ablative Irradiation*. *Lung*, 2016. **194**(1): p. 81-90.
28. Jin, H., et al., *Identification of radiation response genes and proteins from mouse pulmonary tissues after high-dose per fraction irradiation of limited lung volumes*. *Int J Radiat Biol*, 2017. **93**(2): p. 184-193.
29. Mezzaroma, E., et al., *Role of Interleukin-1 in Radiation-Induced Cardiomyopathy*. *Mol Med*, 2015. **21**: p. 210-8.
30. Chiang, C.S., et al., *Compartmental responses after thoracic irradiation of mice: strain differences*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005. **62**(3): p. 862-71.
31. Cappuccini, F., et al., *New insights into the molecular pathology of radiation-induced pneumopathy*. *Radiother Oncol*, 2011. **101**(1): p. 86-92.
32. Sohn, S.H., et al., *The inflammasome accelerates radiation-induced lung inflammation and fibrosis in mice*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2015. **39**(2): p. 917-26.
33. Kim, B.Y., et al., *Focal exposure of limited lung volumes to high-dose irradiation down-regulated organ development-related functions and up-regulated the immune response in mouse pulmonary tissues*. *BMC Genet*, 2016. **17**: p. 29.

Figure 1



Mean doses:

Heart: 4,02 Gy

Left lung: 5,90 Gy

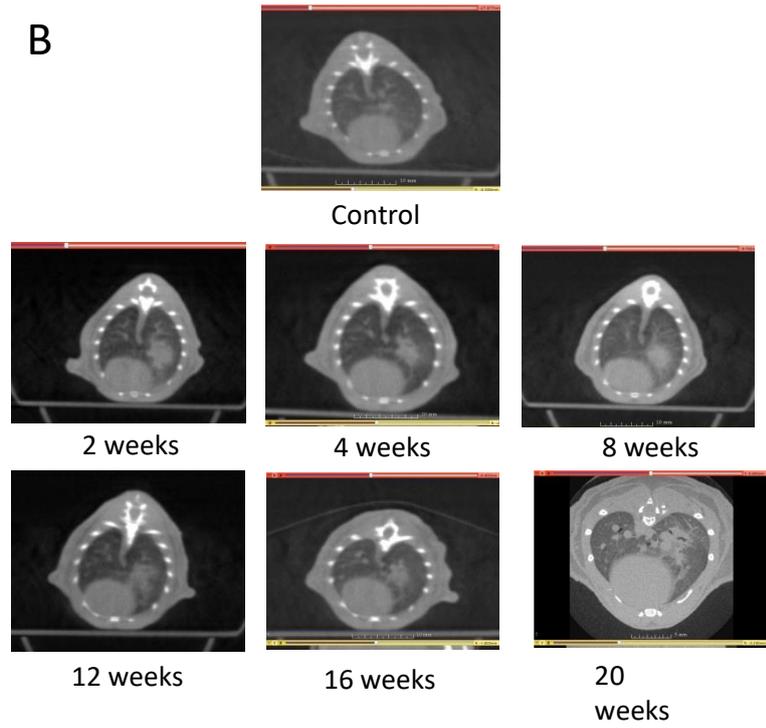
Right lung: 11,72 Gy

Figure 2

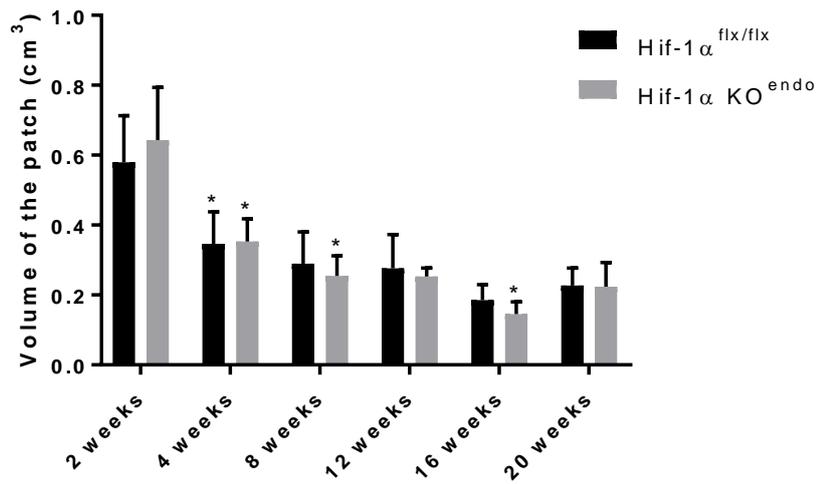
A



B



C



D

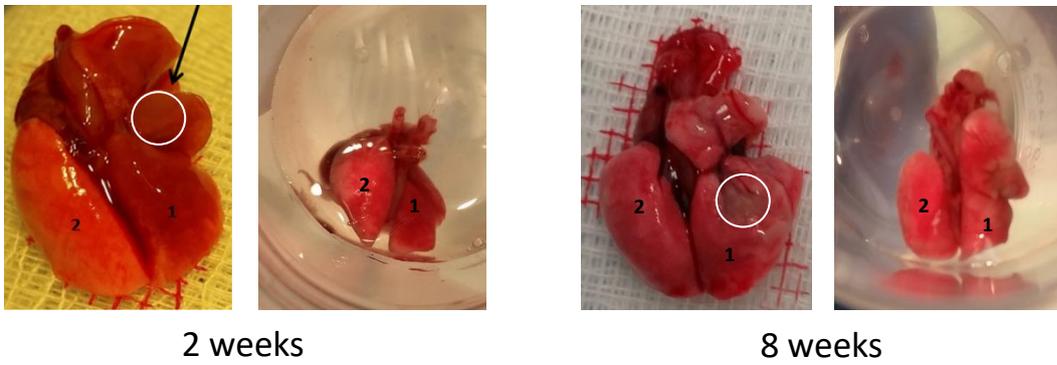
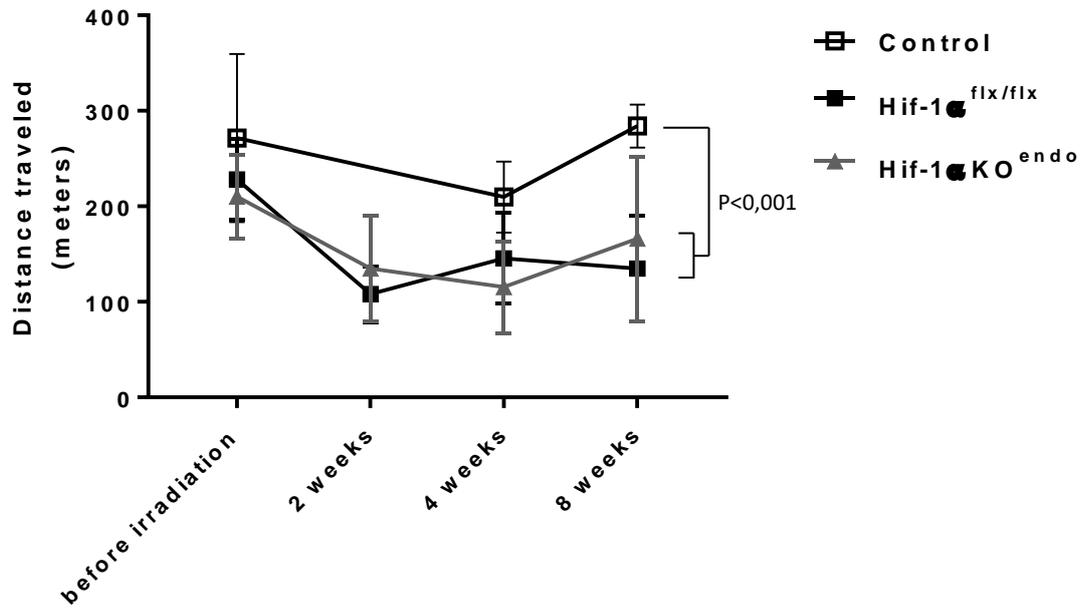


Figure 3

A



B

Variable	Mean	p-value	Confidence interval
Distance before irradiation	228,81 meters		(208,60;249,02)
Irradiation effect	-97,39 meters	<0,001	(-124,61;-70,18)
Genotype effect	5,03	0,76	(-27,76;37,83)

Figure 4

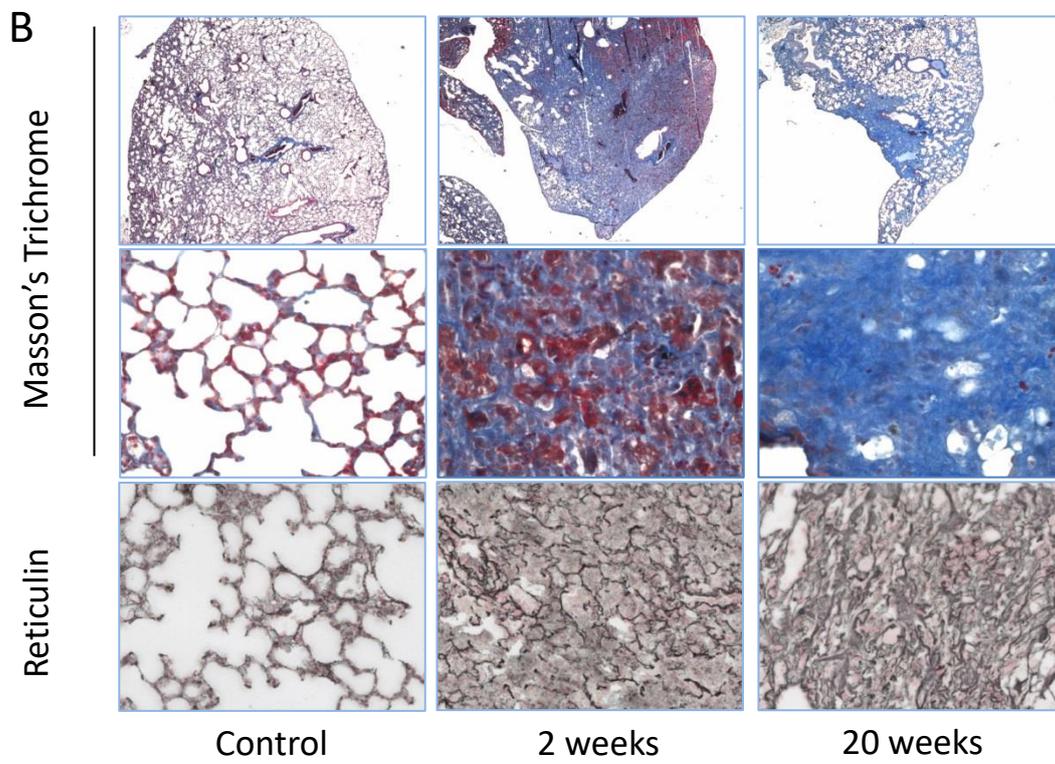
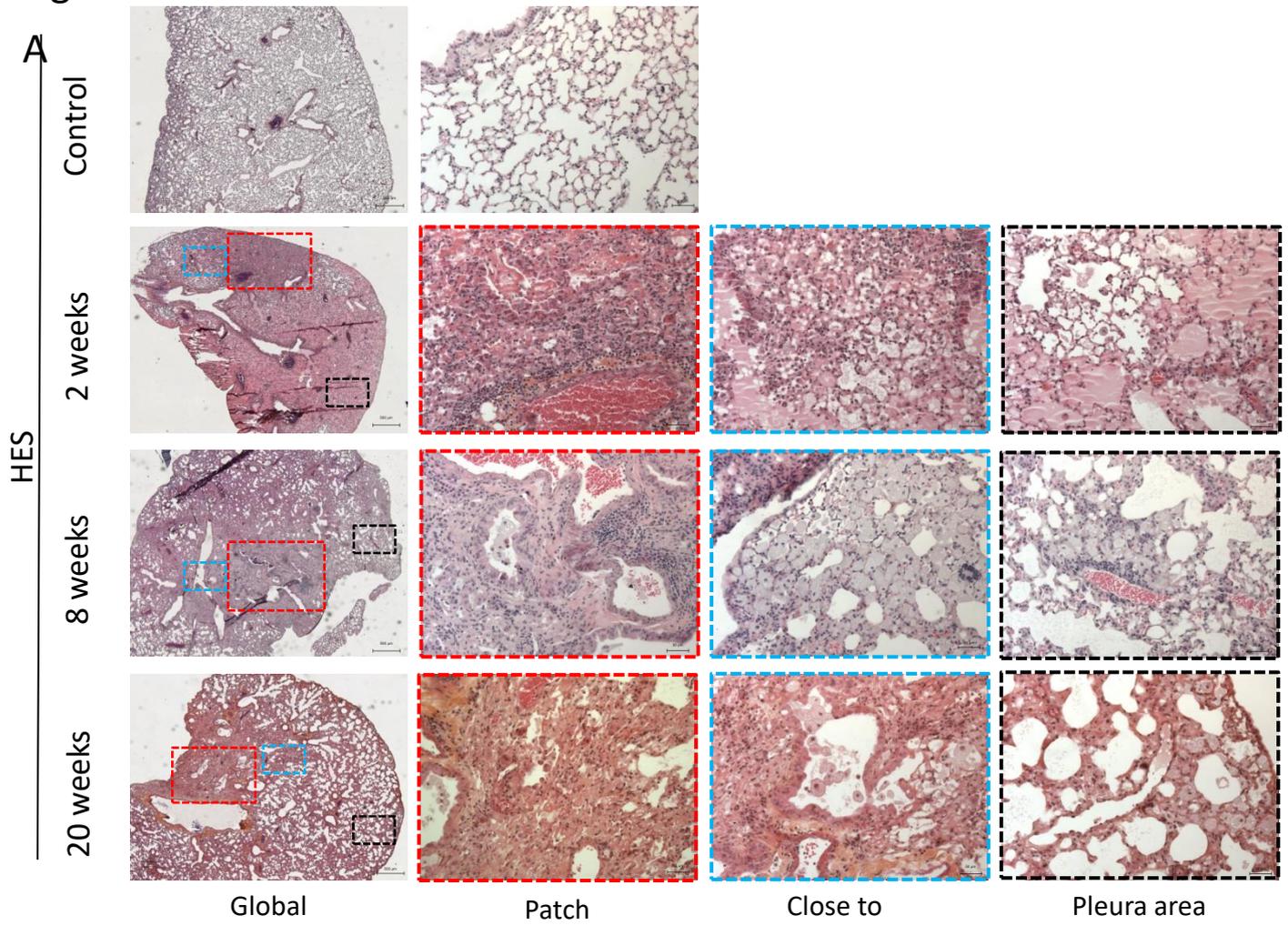


Figure 5

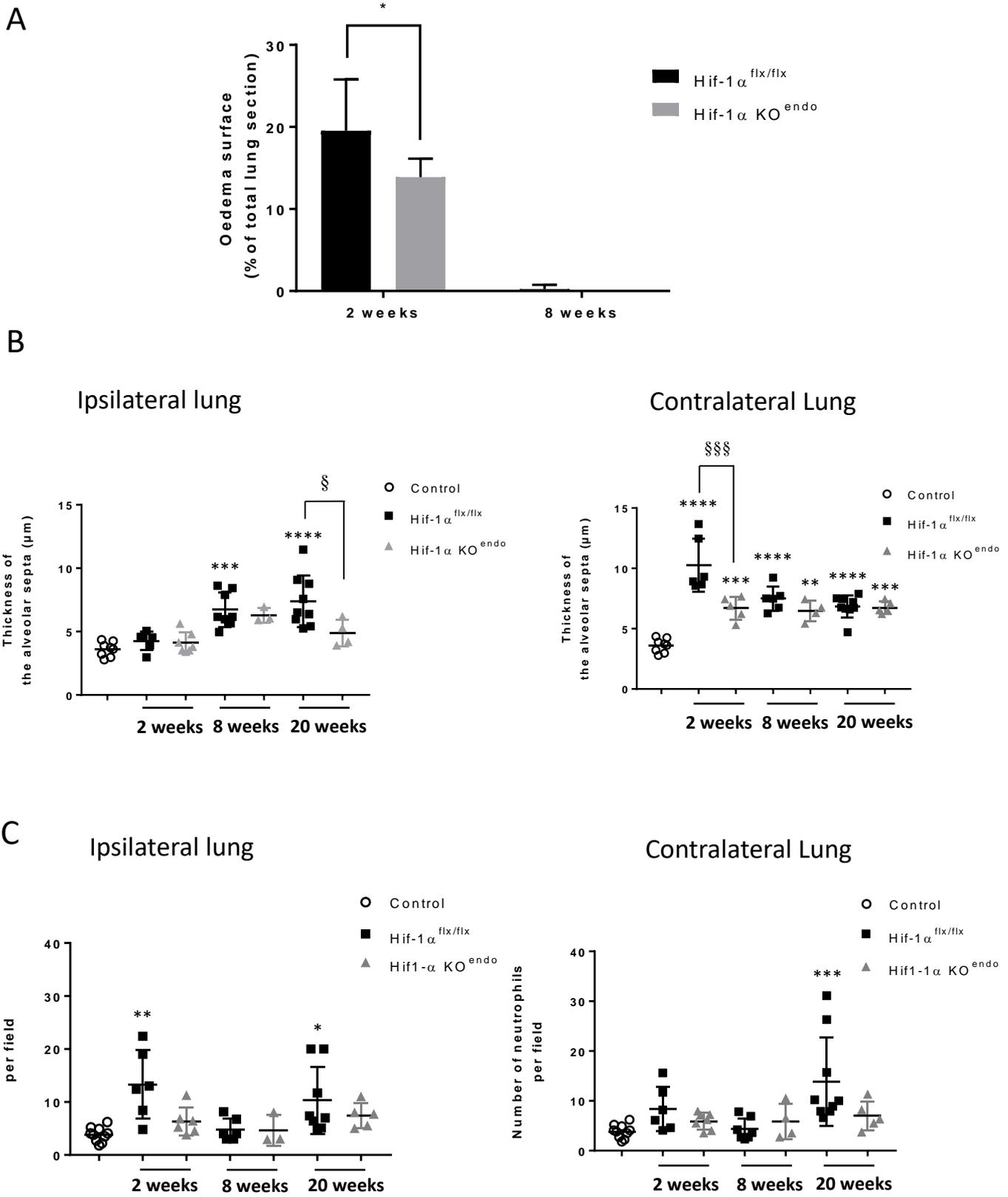


Figure 6

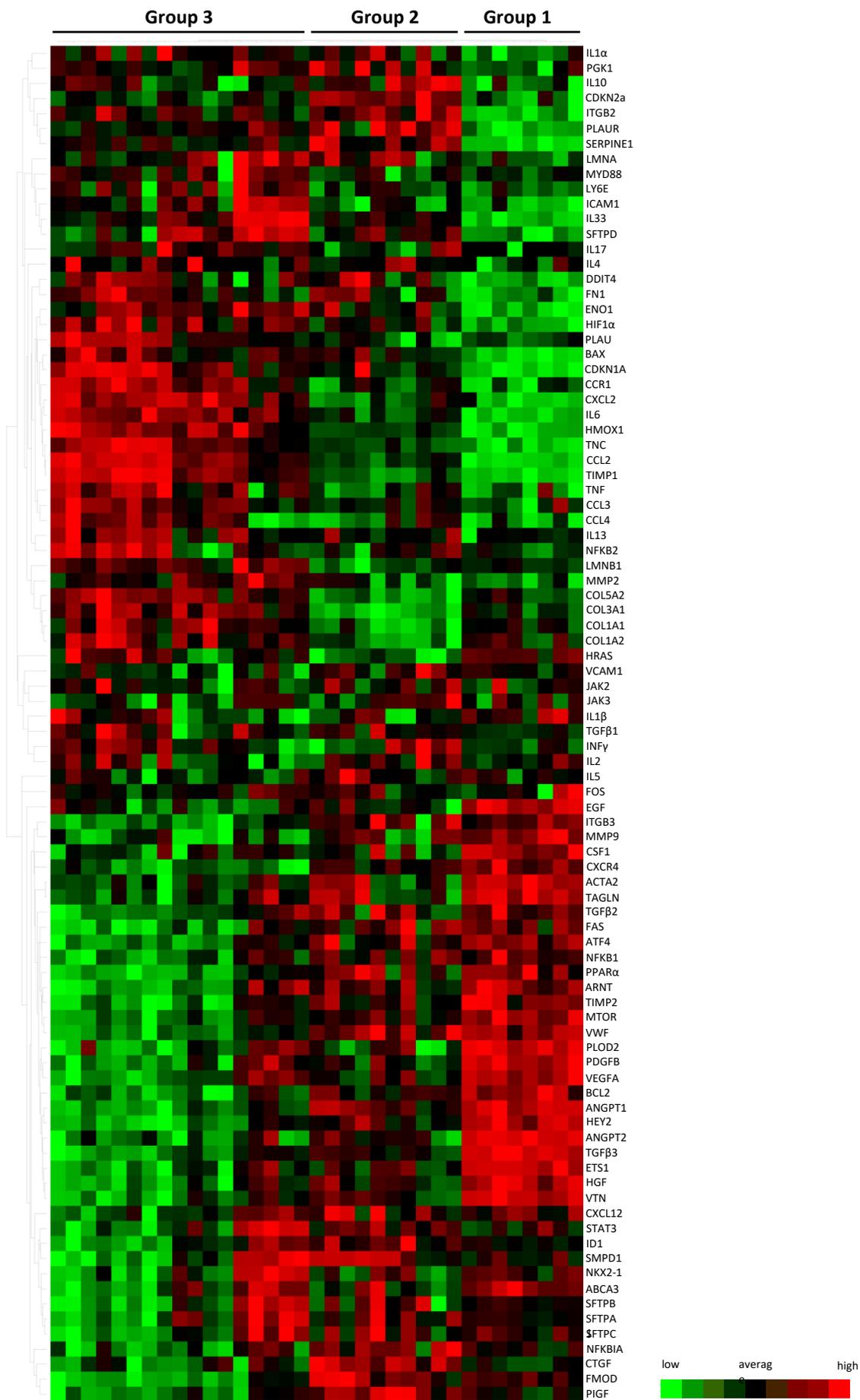
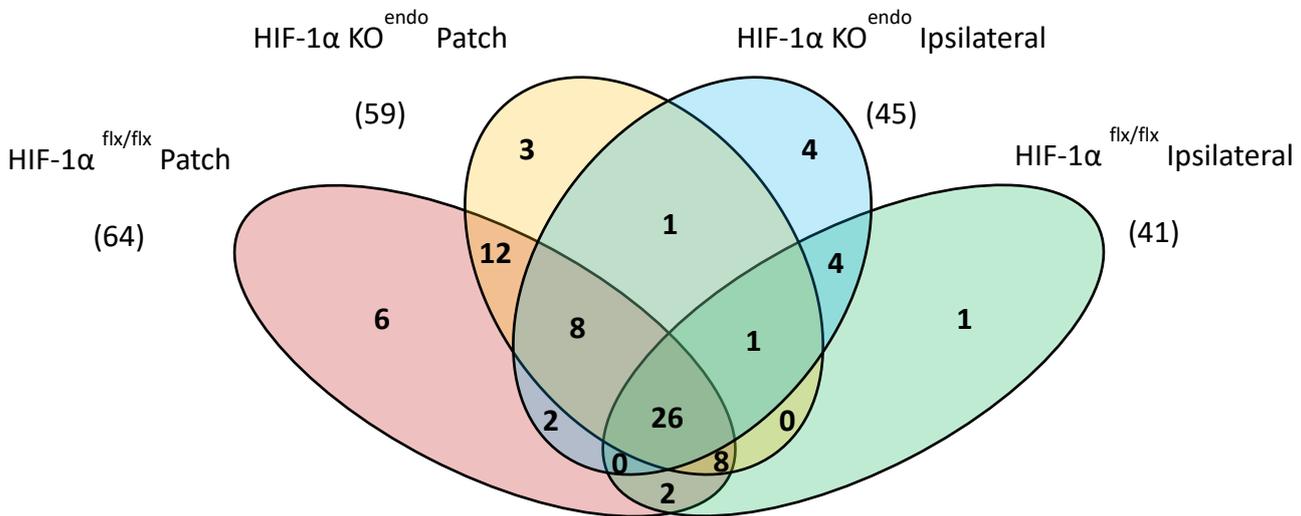
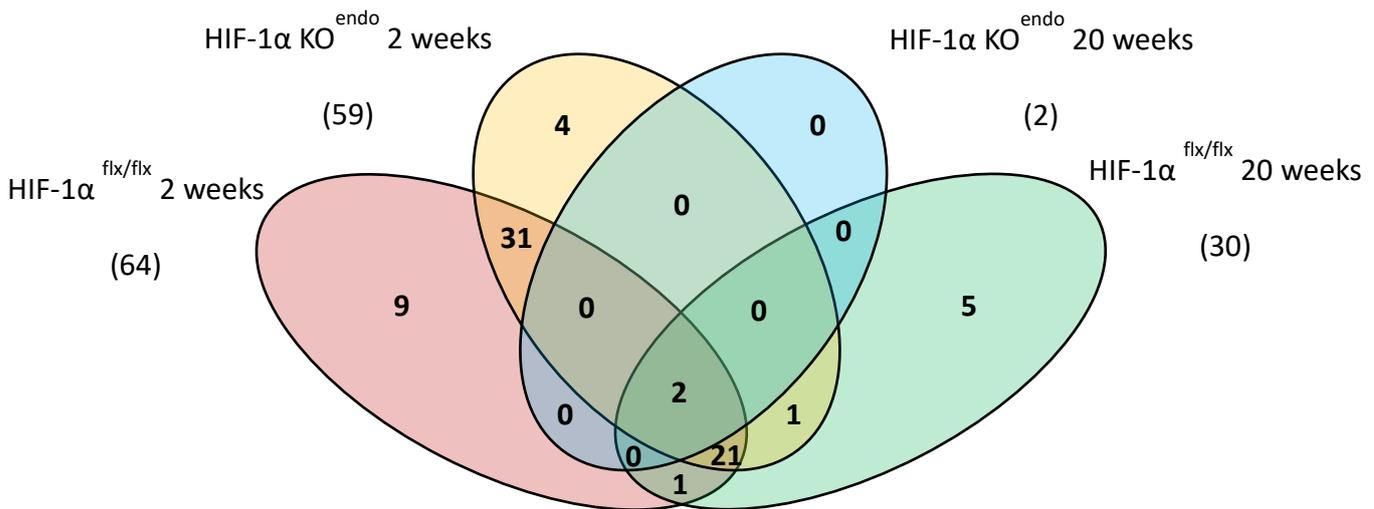


Figure 7

A: patch versus ipsilateral lung at 2 weeks



B: patch 2 weeks versus patch 20 weeks



Inflammation/immunity	TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, IL-10, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-17, IL-33, CCL2, CXCL2, CXCL12, CCR1, CXCR4, CCL3, CCL4, IFN $\gamma$ , TNF, MYD88, LY6E, CSF1, ETS1
Surfactant	SFTPA, SFTPB, SFTPC, SFTPD, ABCA3, NKX2-1
Angiogenesis and hypoxia	VEGFA, ANGPT1, ANGPT2, HIF1A, ARNT, STAT3
Growth factors	HGF, CTGF, EGF, FN1, PDGFB, PIGF
Cell adhesion	ICAM1, VCAM1, VTN, TNC, ITGB2, ITGB3
Matrix	COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A2, MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, PLOD2, FMOD
Endothelial to mesenchymal transition	ACTA2, VWF, HEY2
Apoptosis	HRAS, BCL2, BAX, SMPD1
Tumor suppressors/oncogenes	CDKN2A, CDKN1A, FOS
Senescence	LMNA, LMNB1, FAS, TAGLN, ID1
Signal transduction	JAK2, JAK3, NFKB1, NFKB1A, NFKB2, MTOR, DDIT4
Metabolism	PPAR $\alpha$ , HMOX1, PGK1, ENO1, ATF4
Coagulation/fibrinolysis	SERPINE1, PLAU, PLAU
Housekeeping genes	18S, TBP, HPRT1, ACTB, RPLPO

Table 1

### **Article 3 : Endothelial Hey2 deletion reduces endothelial-to-mesenchymal transition and mitigates radiation proctitis in mice.**

*Travaux acceptés pour publication en co-premier auteur dans « Scientific Reports » le 30 Mai 2017*

#### **Objectifs :**

Cette étude fait suite aux travaux d'Elodie Mintet effectués au sein du laboratoire et publiés dans *The American Journal of Pathology* en 2015, intitulés « *Identification of Endothelial-to-Mesenchymal Transition as a Potential Participant in Radiation Proctitis* ».

Après avoir démontré que le processus d'endoMT pouvait être induit par une exposition aux rayonnements ionisants *in vitro* sur les cellules microvasculaires intestinales et *in vivo* dans un modèle de rectite radique chez la souris, la suite du projet consistait à explorer le rôle potentiel du facteur de transcription Hey2 dans l'endoMT radio-induite.

#### **Principaux résultats :**

*In vitro* chez les HUVECs, l'exposition aux rayonnements ionisants induit un processus d'endoMT associé à une surexpression de Hey2. La transfection des HUVECs avec un vecteur plasmidique d'expression de Hey2 induit spontanément de l'endoMT sans irradiation. *In vivo*, une délétion de Hey2 spécifiquement dans le compartiment endothélial réduit la fréquence du processus d'endoMT dans les tissus irradiés et réduit la sévérité de la rectite radique aiguë et tardive, en protégeant le compartiment microvasculaire et en limitant la perte cellulaire au sein du compartiment souche intestinal.

#### **Conclusion :**

Ces travaux montrent que le facteur de transcription Hey2 joue un rôle dans le processus d'endoMT radio-induit *in vitro* et *in vivo* et qu'une stratégie basée sur la diminution du processus d'endoMT peut limiter les dommages aux tissus sains digestifs.

OPEN

## Endothelial Hey2 deletion reduces endothelial-to-mesenchymal transition and mitigates radiation proctitis in mice

Elodie Mintet<sup>1</sup>, Jérémy Lavigne<sup>1</sup>, Vincent Paget<sup>1</sup>, Georges Tarlet<sup>1</sup>, Valérie Buard<sup>1</sup>, Olivier Guipaud<sup>1</sup>, Jean-Christophe Sabourin<sup>2</sup>, Maria-Luisa Iruela-Arispe<sup>3</sup>, Fabien Milliat<sup>1</sup> & Agnès François<sup>1</sup>

The current study evaluated the role of Hey2 transcription factor in radiation-induced endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) and its impact on radiation-induced tissue damage in mice. Phenotypic modifications of irradiated, Hey2 siRNA- and Hey2 vector plasmid-transfected human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) resembling EndoMT were monitored by qPCR, immunocytochemistry and western blots. Subsequently, in mice, a Cre-LoxP strategy for inactivation of Hey2 specifically in the endothelium was used to study the biological consequences. Total body irradiation and radiation proctitis were monitored to investigate the impact of conditional Hey2 deletion on intestinal stem cells and microvascular compartment radiosensitivity, EndoMT and rectal damage severity. We found that EndoMT occurs in irradiated HUVECs with concomitant Hey2 mRNA and protein increase. While Hey2 silencing has no effect on radiation-induced EndoMT *in vitro*, Hey2 overexpression is sufficient to induce phenotypic conversion of endothelial cells. In mice, the conditional deletion of Hey2 reduces EndoMT frequency and the severity of rectal tissue damage. Our data indicate that the reduction in mucosal damage occurs through decline in stem/clonogenic epithelial cell loss mediated by microvascular protection. EndoMT is involved in radiation proctitis and this study demonstrates that a strategy based on the reduction of EndoMT mitigates intestinal tissue damage.

About half of cancer patients undergo radiation therapy as part of their cancer treatment. Even though great advances have been made in treatment delivery techniques, allowing for better tumor targeting and sparing large volumes of healthy tissue, radiation exposure of significant volumes of normal intestine and rectum persists, limiting the chances of cancer cure and impacting on the patient's quality of life post-treatment. Patients treated for abdominal-pelvic tumors may experience what is referred to as "pelvic radiation disease"<sup>1</sup>. Acute radiation damage is mainly due to the death of a significant proportion of epithelial stem cells and to compromised regeneration of differentiated epithelium, leading to mucosal ulceration and vascular compartment cell death and activation, which is responsible for a severe inflammatory reaction. The clinical consequences of acute damage concern 60 to 80% of patients and are expressed as abdominal pain and diarrhea. The acute phase can be followed by adverse tissue scarring resulting in gut fibrosis, with important associated morbidity such as dysmotility and malabsorption, but also fistulae and perforations of the most severe grades. Late adverse effects may occur from 3 months to several years following the end of radiation therapy and generally concern 5 to 10% of patients. Overall, external irradiation can be considered as a pro-inflammatory stimulus and the response of normal digestive tissue to ionizing radiation exposure is characterized by acute inflammation progressively evolving through chronic inflammation/excessive scarring<sup>2</sup>. Vascular abnormalities are consistently observed in injured healthy tissues of patients

<sup>1</sup>Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), Department of Radiobiology and Epidemiology (SRBE), Radiobiology and Radiopathology Research Laboratory (L3R), Rouen, France. <sup>2</sup>Department of Pathology, Rouen University Hospital, Rouen, France. <sup>3</sup>Department of Molecular, Cell, and Developmental Biology, University of California, California, USA. Elodie Mintet and Jérémy Lavigne contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.F. (email: [agnes.francois@irsn.fr](mailto:agnes.francois@irsn.fr))

Received: 26 January 2017

Accepted: 30 May 2017

Published: xx xx xxxx

undergoing radiation therapy for cancer treatment, and endothelial injury has been described as a crucial event in the initiation and progression of radiation side effects in normal tissues<sup>3</sup>. Irradiated endothelial cells undergo apoptosis or may acquire a long-lasting procoagulant and antifibrinolytic phenotype with sustained immune cell recruitment, which participates in the development of tissue damage.

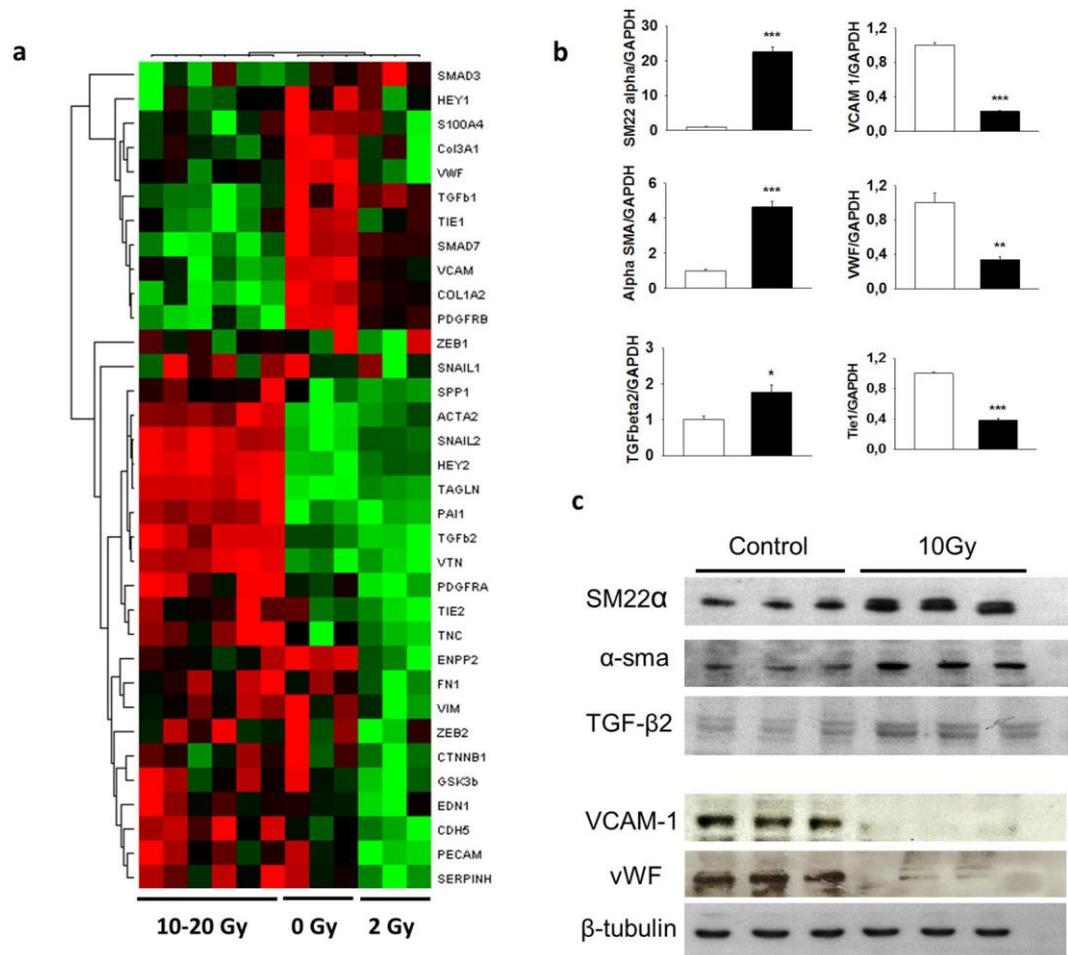
It has been known for several years now that adult cells retain a plastic capacity, as illustrated by the ability of epithelial and endothelial cells to undergo phenotypic conversion to mesenchymal-like cells via the processes of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT), respectively. During EndoMT, endothelial cells lose their endothelial markers (e.g. VE-cadherin, vWF, VCAM-1) and progressively gain expression of mesenchymal markers (e.g.  $\alpha$ -SMA, SM22- $\alpha$ ), while becoming motile. EndoMT was first discovered as a mechanism responsible for cardiac septation and formation of cardiac cushions and valves during embryogenesis<sup>4</sup>. EndoMT was also soon implicated in several systemic diseases, such as fibrodysplasia ossificans progressiva<sup>5</sup> and systemic sclerosis<sup>6</sup>, and participates in tumor progression as an inducer of carcinoma-associated fibroblasts<sup>7</sup>. As for EMT, EndoMT can be subdivided into three main biological settings, namely organ development, tissue regeneration and scarring, and cancer progression and metastasis<sup>8</sup>. Data concerning EndoMT and tissue regeneration and scarring are relatively recent, and cells doubly positive for endothelial and mesenchymal markers, suggesting EndoMT, have been found in various contexts of tissue inflammation and fibrosis following different types of insult in the lung, heart and kidney<sup>9–13</sup>. Data concerning the putative role of EndoMT in gut damage are sparse, perhaps because it is complicated to obtain severe intestinal fibrosis in preclinical rodent models. Nevertheless, Rieder *et al.*<sup>14</sup> identified EndoMT as a potential participant in human gut inflammation and in a preclinical model of colonic fibrosis in mice, demonstrating both *in vitro* and *in vivo* that inflammatory signals in the gut are able to trigger phenotypic conversion of endothelial cells to mesenchymal-like cells. We recently showed in a preclinical model of radiation proctitis in Tie2-GFP mice that radiation-induced tissue inflammation and scarring offer environmental conditions in favor of EndoMT, and that EndoMT is also present in human radiation proctitis<sup>15</sup>. Our next objective was to determine a putative pathway implicated in radiation-induced EndoMT and tissue damage, to offer new possibilities concerning the management of radiation injury to the gastrointestinal tract.

Previous mechanistic studies have highlighted the TGF  $\beta$  and Notch signaling pathways as promoting EndoMT<sup>16, 17</sup>. The canonical Notch pathway is highly conserved in vertebrates and is essential in embryonic development, organogenesis and vascular remodeling in adults<sup>18</sup>. The role of Notch in EndoMT was first highlighted by Nosedá *et al.*, who demonstrated that overexpression of intracellular fragments Notch1IC and Notch4IC and of the ligand Jagged1 is sufficient to induce EndoMT in adult human macrovascular and microvascular cells<sup>19</sup>. Moreover, Notch overexpression in the endothelial compartment using a transgenic mouse model is associated with excessive endocardial EndoMT, myocardial enlargement and the formation of hyperplastic valves, confirming the role of the Notch signaling pathway in EndoMT<sup>17</sup>. When activated, the Notch pathway carries out transactivation of target genes including transcriptional repressors of the Hes, Hersh or Hey (hairy/enhancer of split-related with YRPW motif) genes<sup>20</sup>. Members of the Hersh/Hey family are identified as the main effectors of the Notch pathway during development. Among Notch targets and together with Hey1, Hey2 has been implicated in embryogenesis, and Hey2 deficiency in mice displays defects in cardiovascular development<sup>21</sup>. Several studies have demonstrated the role of Hey2 in cardiac valve formation and especially in the EMT of endocardial cells<sup>22</sup>. Whereas the role of the Notch target gene Hey2 in physiological EndoMT has been demonstrated, there are few studies on the putative role of Hey2 in stress-induced EndoMT<sup>23, 24</sup>.

Here we report that irradiation is a stimulus sufficient to induce EndoMT *in vitro* in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), associated with increased Hey2 mRNA and protein expression. Moreover, Hey2 overexpression is sufficient to induce phenotypic conversion of HUVECs to mesenchymal-like cells. Finally, conditional deletion of Hey2 in the endothelium in mice reduces EndoMT frequency and the severity of radiation-induced acute proctitis. Using a model of total body irradiation, we showed that Hey2 deletion in the endothelium reduced the number of apoptotic cells in the small intestinal stem cell compartment and increased surviving crypts. Immunostaining of plasmalemmal vesicle-associated protein suggests that Hey2 deletion may protect the endothelium, and consequently the epithelial stem cell compartment, from radiation damage. We thus propose reducing EndoMT as a possible strategy to mitigate radiation-induced damage to normal digestive tissue.

## Results

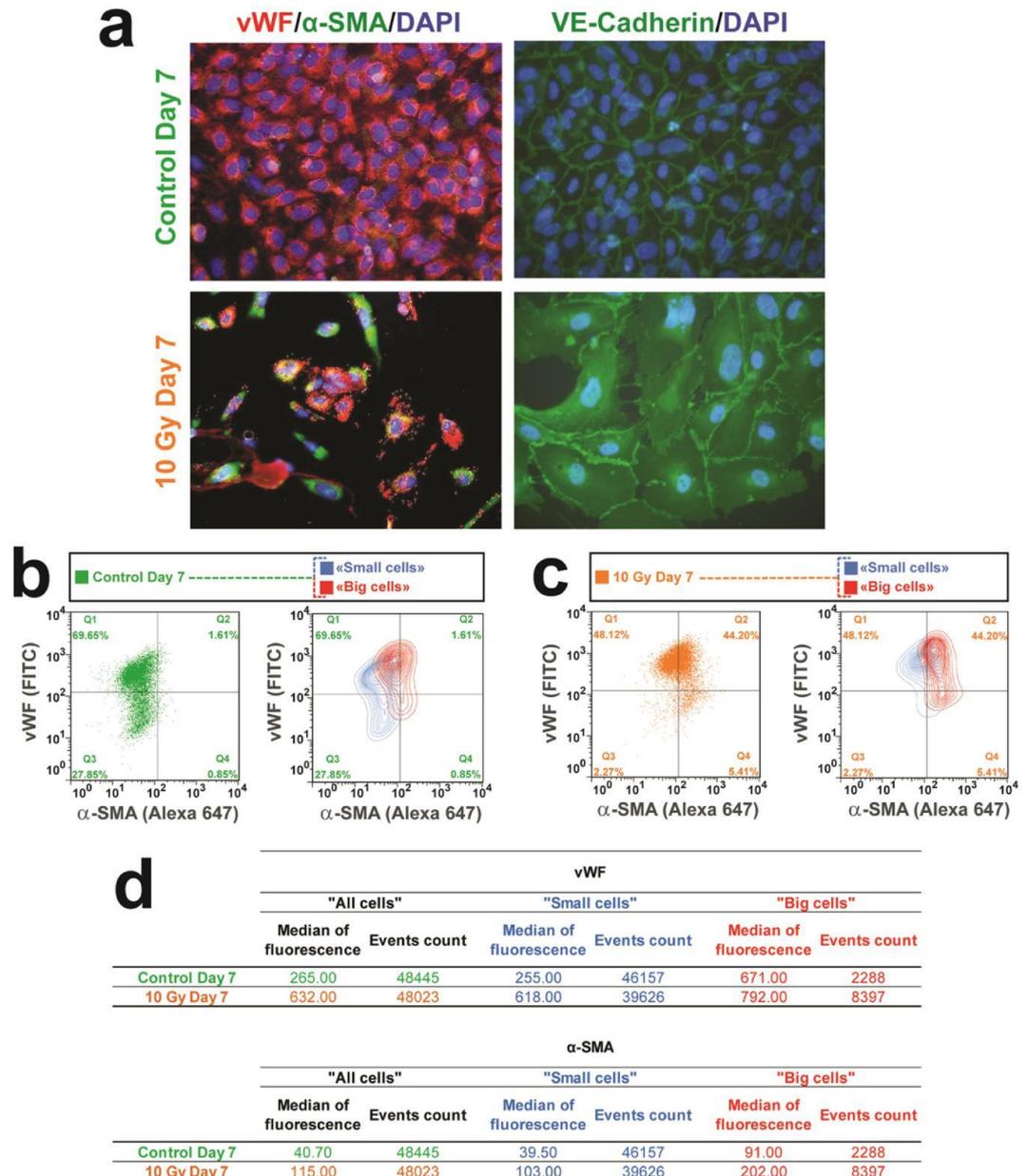
**Irradiation induces the endothelial-to-mesenchymal transition in HUVECs.** The response of endothelial cells to radiation exposure is characterized by cell death and long-lasting phenotypic changes referred to as radiation-induced “activated” phenotype. To investigate whether these radiation-induced changes in the endothelial cell phenotype include EMT features, 90% confluent HUVECs were exposed to 0-, 2-, 10- or 20-Gy irradiation and monitored from day 4 to day 10 after exposure. We show that ionizing radiation induces a phenotypic conversion of HUVECs that resembles EndoMT. EndoMT is illustrated by heat map representation of expression levels of 34 different genes previously used to monitor EndoMT in human intestinal microvascular endothelial cells<sup>15</sup> and related to endothelial or mesenchymal phenotypes and molecules involved in the EndoMT process 7 days after single doses of 2, 10 or 20 Gy exposure (Fig. 1a). Clustering occurs for 0, 2 and 10–20 Gy irradiated HUVECs. Given that 10 and 20 Gy irradiated cells clustered together, we decided to pursue the experiments on 10 Gy irradiated cells, to obtain satisfying phenotypic conversion without excessive cell death due to radiation exposure. The results show changes in expression levels of genes coding for proteins recognized as witnesses or inducers of the EndoMT process, such as increased  $\alpha$ -SMA, SM-22 $\alpha$  or TGF- $\beta$ 2, decreased vWF and VCAM1, or decreased Tie1 expression (Fig. 1b), whose deficiency has been shown to induce EndoMT<sup>25</sup>. Radiation-induced fold changes of several genes are dose-dependent (Supplementary Fig. 1). The global phenotypic switch at the mRNA level is conserved when cells are exposed to fractionated irradiation (20 Gy administered as 2 Gy daily x10, with a weekend break) as shown in Table 1. Radiation-induced changes in mRNA expression were confirmed



**Figure 1.** Irradiation induces phenotypic conversion of endothelial cells resembling EndoMT. (a) HUVECs were exposed to a single dose of 0, 2, 10 or 20 Gy and 34 genes related to the endothelial or mesenchymal phenotype and to the EndoMT process were measured by qPCR 7 days after radiation exposure. Hierarchical clustering shows different profiles of gene expression levels between control and irradiated cells. (b) Values of up- or down-regulation of expression of several endothelial and mesenchymal markers in irradiated HUVECs, 7 days after 10 Gy radiation exposure. (c) Confirmation of radiation-induced gene expression modifications at the protein level by western blot. Data are representative of three independent experiments performed in triplicate. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.

Gene (protein)	20 Gy single dose Day 7	20 Gy fractionated dose Day 7 post-last fraction
ACTA2 (alpha-SMA)	5.64 ± 0.85**	2.45 ± 0.22**
HEY2	9.57 ± 0.43***	2.64 ± 0.53*
SERPINE 1 (PAI-1)	1.77 ± 0.06***	1.98 ± 0.24*
TAGLN (SM22-alpha)	24.42 ± 2.36***	14.72 ± 1.65**
TGFbeta 2	1.77 ± 0.19*	2.39 ± 0.27*
TNC	4.32 ± 0.05	348.00 ± 17.79***
VTN	5.70 ± 0.9**	6.62 ± 0.35***
TIE1	0.42 ± 0.06***	0.50 ± 0.05**
TIE2	0.87 ± 0.04*	0.53 ± 0.05**
vWF	0.26 ± 0.03**	1.29 ± 0.10

**Table 1.** Gene expression profiles marking EndoMT in HUVECs after single dose or fractionated radiation exposure. HUVECs were exposed to 20 Gy administered in a single fractionated dose using 2 Gy per day/5 days a week with weekend break. Data are representative of 3 experiments for the single dose and one experiment for the fractionated dose, both done in triplicate and expressed as means ± sem. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.



**Figure 2.** About 40% of HUVECs undergo phenotypic conversion. **(a)** Phenotypic characterization of 10 Gy-irradiated endothelial cells undergoing EndoMT by double immunostaining of vWF (red) and  $\alpha$ -SMA (green) showing a yellow merging signal, which evidences co-expression of endothelial and mesenchymal markers of EndoMT. VE-Cadherin disorganization is also recognized as a feature of the EndoMT process. Representative images of 3 independent experiments. Original magnification  $\times 400$ . **(b** to **c)** Flow cytometry quantification of EndoMT by double immunostaining of vWF (FITC) and  $\alpha$ -SMA (Alexa 647). Cut-offs for positive staining of both in control cells were defined at control day 7 **(b)** as below 2% **(b**, quarter Q2), showing co-expression marking EndoMT in around 44% of HUVECs on 10 Gy day 7 **(c**, quarter Q2). Median values of fluorescence peaks for each sample and both antibodies are given in the table **(d)**. Data represent one representative experiment among three independent experiments.

at the protein level, with increased expression of mesenchymal markers SM-22 $\alpha$  and  $\alpha$ -SMA and reduced protein levels of the endothelial markers vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and vWF, thus confirming EndoMT (Fig. 1c). To visualize phenotypic conversion of irradiated endothelial cells, we performed co-immunostaining of vWF and  $\alpha$ -SMA (Fig. 2a). While control cells showed consistent vWF immunoreactivity (red), the irradiated cell population, 7 days after 10 Gy exposure, appeared heterogeneous, with sub-populations of vWF $^{+}$  (red),  $\alpha$ -SMA $^{+}$  (green) and vWF $^{+}$ / $\alpha$ -SMA $^{+}$  cells (yellow merging signal). Finally, VE-cadherin immunostaining revealed alterations in its distribution, with the appearance of cytoplasmic staining, a feature of EndoMT<sup>26</sup>.

### About 40% of HUVECs undergo phenotypic conversion to mesenchymal-like cells.

Information on the proportion of cells undergoing EndoMT in the different published models is often missing, and may depend on the stimulus applied to induce phenotypic conversion. Given that not all cells exhibit phenotypic conversion, as illustrated by immunostaining experiments, flow cytometry was used to corroborate immunocytochemistry experiments, but also to estimate more precisely the percentage of  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> cells in the total HUVEC population. Prior to this, isotype controls were used to check the specificity of the staining, showing and testifying to the absence of interference or false-positive overlap signals (Supplementary Fig. 2). After exclusion of dead cells and debris from the analysis (Supplementary Fig. 3a and b), both FSC/SSC bi-parametric representation (Supplementary Fig. 3c–e) and FSC histogram representation (Supplementary Fig. 3f) clearly showed a shift of the size of the whole cell population in irradiated HUVECs compared with controls. A size cut-off of “small cells” versus “big cells” around 5% was determined for gated events in control cells in order to discriminate small cells from big cells. Seven days after 10 Gy irradiation, the proportion of big cells was 20%, 4 times more than the percentage observed in non-irradiated HUVECs.

Regarding  $\alpha$ -SMA/vWF bi-parametric analyses, we used for the whole living cell population an  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>/vWF<sup>+</sup> cut-off below 2% for non-irradiated HUVECs (Fig. 2b, left panel, square Q2), this proportion of SMA<sup>+</sup>/vWF<sup>+</sup> living cells representing around 44% for irradiated HUVECs (Fig. 2c, left panel, square Q2), showing that whereas  $\alpha$ -SMA expression is virtually absent in control cells, around 44% of irradiated cells express  $\alpha$ -SMA. Based on the cell size cut-off,  $\alpha$ -SMA/vWF bi-parametric analysis was performed on small cells and big cells both for non-irradiated HUVECs (Fig. 2b, right panel) and for 10 Gy irradiated HUVECs (Fig. 2c, right panel). Globally, both small and big cells acquire  $\alpha$ -SMA expression, big cells exhibiting, however, higher  $\alpha$ -SMA staining than small ones, suggesting that EndoMT may be associated with an increase in cell size after radiation exposure. All these data confirm that radiation exposure of confluent HUVECs induces 7 days post-exposure changes in cell shape and mesenchymal marker expression, occurring in about 40% of the cell population at this time point.

### The endothelial-to-mesenchymal transition is associated with Hey2 overexpression in irradiated HUVECs.

EndoMT was initially discovered as an essential mechanism for heart development, with an important role played by the Notch pathway in primitive cardiac tube septation and the formation of cardiac valves<sup>19</sup>. Hairy and Enhancer of Split (HES)-related genes together with YRPW motif (Hey) genes (Hey1, Hey2 and HeyL) are the main target genes of the canonical Notch signaling pathway. Inactivation of *Hey2* results in severe embryonic defects in heart development, whereas deficiency in *Hey1* alone does not<sup>27</sup>. Based on bibliographic data, Hey2 was included in the set of genes related to EndoMT we chose for mRNA expression measurements and Hey2 appeared as an up-regulated gene in the hierarchical clustering (Fig. 1a). In accordance with previous studies relating to Hey2 and EndoMT in embryonic development, we demonstrated that EndoMT induced by exogenous stress is also associated with Hey2 mRNA and protein overexpression, as confirmed by western blot and immunostaining (Fig. 3). Radiation-induced Hey2 mRNA overexpression is dose-dependent (Supplementary Fig. 4a), maintained over time until at least 10 days post-exposure and independent of culture plastic coating. Conversely, Hey1 expression level is decreased by radiation exposure (Supplementary Fig. 4b).

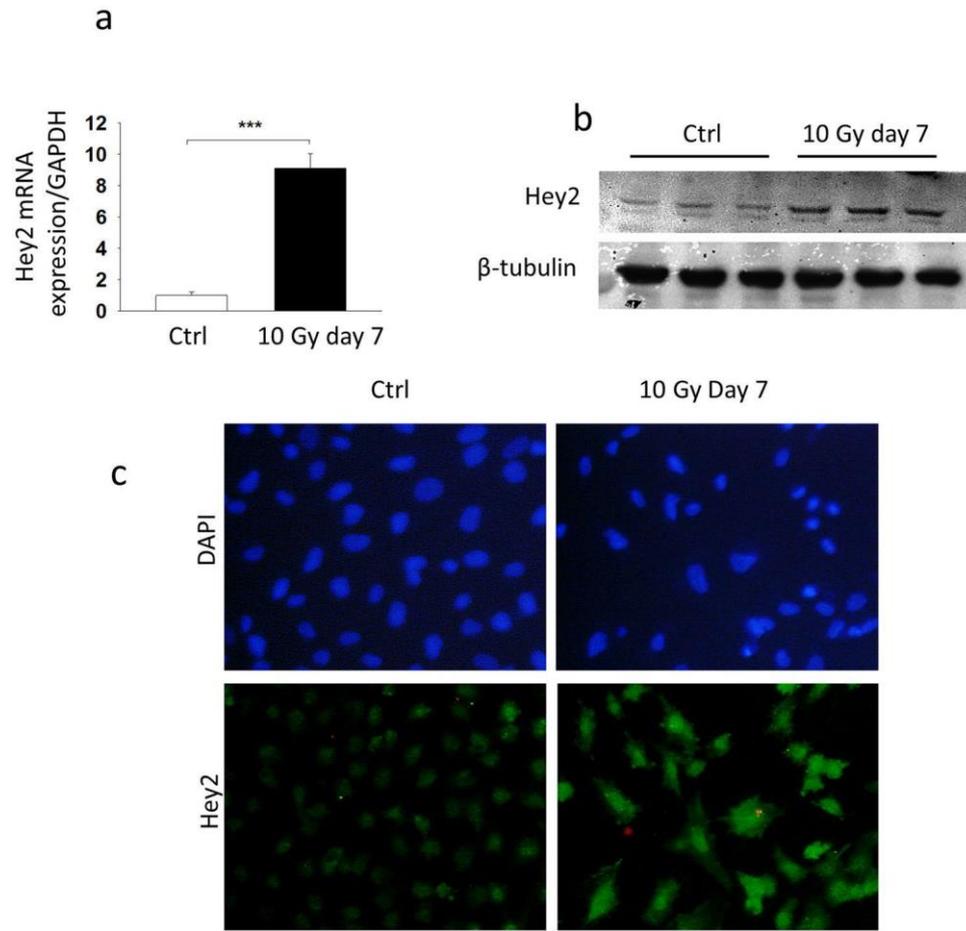
### Hey2 overexpression using expression vector transfection in HUVECs is sufficient to induce EndoMT.

When we observed that radiation-induced phenotypic conversion of HUVECs was associated with Hey2 overexpression, we decided to test the ability of Hey2 siRNA to influence radiation-induced EndoMT *in vitro*. HUVECs were transfected with Hey2 siRNA to inhibit Hey2 mRNA expression and exposed to 10 Gy irradiation. Despite marked reduction in mRNA expression levels in transfected cells even after irradiation (>90%), Hey2 inhibition had no effect on radiation-induced  $\alpha$ -SMA and TGF $\beta$ 2 overexpression or on Tie1 down-regulation (Supplementary Fig. 5). SM22- $\alpha$  expression was significantly reduced and expression of VCAM-1 and of vWF returned to control values in the presence of Hey2 siRNA, but also in the presence of non-targeting siRNA, probably reflecting a transfection-related effect. Overall, these results show that increased Hey2 expression levels *in vitro* are dispensable for radiation-induced EndoMT.

We next decided to investigate if Hey2 by itself was able to induce EndoMT *in vitro*. Cell transfection with Hey2 plasmid expression vector induced EndoMT (Fig. 4a). Transfected cells acquired a typical spindle-shaped morphology, and showed decreased vWF and increased Sm22- $\alpha$  immunoreactivity. Finally, irradiated cells exhibited partial loss of intercellular junctions, as illustrated by p120-catenin immunostaining, a feature of phenotypic conversion of endothelial cells to mesenchymal-like cells. Figure 4b shows the mRNA expression levels of several genes measured in Hey2 plasmid-transfected cells compared with empty plasmid-transfected cells. Hey2 overexpression in HUVECs was associated with increase in SM22- $\alpha$  and TGF $\beta$ 2 expression and reduced expression of Tie1 and vWF, as observed after radiation exposure. Conversely, and as opposed to radiation-induced EndoMT, expression of VCAM-1 and  $\alpha$ -SMA was unchanged. These data show that overexpression of Hey2 is sufficient to induce phenotypic conversion of HUVECs to a mesenchymal-like phenotype, albeit with some differences compared with radiation-induced EndoMT.

### Human radiation proctitis is associated with increased Hey2 immunoreactivity in injured tissues.

Radiation exposure offers microenvironment conditions favoring EndoMT, such as cell apoptosis, oxidative stress, barrier rupture, tissue inflammation, fibrosis and hypoxia, as demonstrated *in vitro* or in different models of trauma<sup>14, 28–30</sup>. We previously showed that EndoMT was present in human radiation proctitis, especially in severely injured/inflamed tissues<sup>15</sup>. Normal rectal tissue immunostaining revealed a general nuclear expression of Hey2 in all cell types including epithelial and endothelial cells. Pathological tissue showed invasion of Hey2-positive immune cells and a possible increase in endothelial cells of nuclear immunoreactivity for Hey2 in



**Figure 3.** Radiation-induced EndoMT in HUVECs occurs together with Hey2 overexpression. **(a)** Hey2 mRNA levels in irradiated HUVECs were assessed by qPCR 7 days after 10 Gy exposure. **(b)** Western blotting for Hey2 protein expression in irradiated HUVECs, 7 days after radiation exposure to 10 Gy. **(c)** Hey2 immunostaining in HUVECs 7 days after 10 Gy exposure. Data are representative of three independent experiments performed in triplicate. \*\*\* $p < 0.001$ .

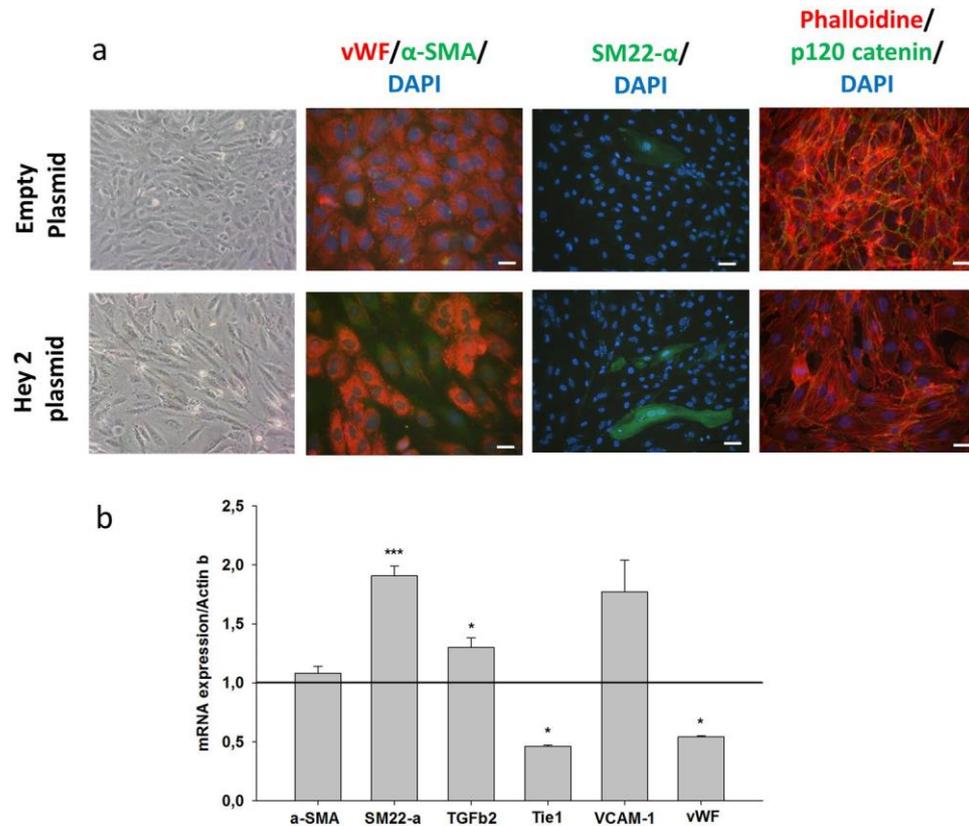
several submucosal vessels (Fig. 5). Nevertheless, these results should be interpreted cautiously, given that a lot of submucosal vessels in damaged tissues showed only slight Hey2 staining.

### Conditional deletion of Hey2 in the endothelium reduces endothelial-to-mesenchymal transition frequency associated with preclinical acute radiation proctitis.

The Notch signaling pathway and its main downstream target gene Hey2 have been implicated in the EndoMT process during cardiac development and in endothelial cells *in vitro*<sup>8</sup>, but to our knowledge there are currently few findings regarding the role of Hey2 in stress-induced EndoMT. Following *in vitro* observations of overexpression of Hey2 mRNA and protein in irradiated endothelial cells, we decided to inactivate Hey2 specifically in the endothelial compartment using the Cre-LoxP strategy, to avoid defects in cardiac development associated with Hey2 knock-out<sup>21</sup>. To do this, we crossed Hey2<sup>flx/flx</sup> mice with VE-CadCre<sup>+/+</sup> mice to obtain Hey2<sup>flx/flx</sup>/Ve-CadCre<sup>-/-</sup> mice as controls (Hey2<sup>flx/flx</sup>) and Hey2<sup>flx/flx</sup>/Ve-CadCre<sup>-/-</sup> mice (Hey2KO<sup>endo</sup>) in which Hey2 expression is inactivated specifically in the endothelial compartment (Supplementary Fig. 6). Both were submitted to 22 Gy colorectal irradiation. The first step was to investigate whether Hey2 deletion in endothelial cells lessened radiation-induced EndoMT in our preclinical model of radiation proctitis. Co-immunostaining of vWF and  $\alpha$ -SMA evidenced transitioning endothelial cells in irradiated tissues by the co-expression of both markers (Fig. 6a). EndoMT occurred in the submucosal as well as in the mucosal vessels, as already observed in this model<sup>15</sup>. Both Hey2<sup>flx/flx</sup> and Hey2KO<sup>endo</sup> mice exhibited EndoMT, albeit with a reduced percentage of mice exhibiting EndoMT in the Hey2KO<sup>endo</sup> group (Fig. 6b), demonstrating that Hey2 deletion in endothelial cells is an effective strategy to reduce the frequency of radiation-induced EndoMT in digestive tissues.

### Reducing EndoMT frequency impacts the severity of acute and late preclinical radiation proctitis.

Exposure of mouse rectum to a single 22 Gy dose of ionizing radiation resulted in severe acute (14 days) mucosal damage, with crypt rarefaction, severe mucosal inflammation and ulceration. Ulceration is defined as the total loss of bordering epithelium. Ulceration is a sign of severity because the absence of bordering epithelium exposes underlying tissues to luminal contents and favors severe intestinal transmural inflammation. The 14-day

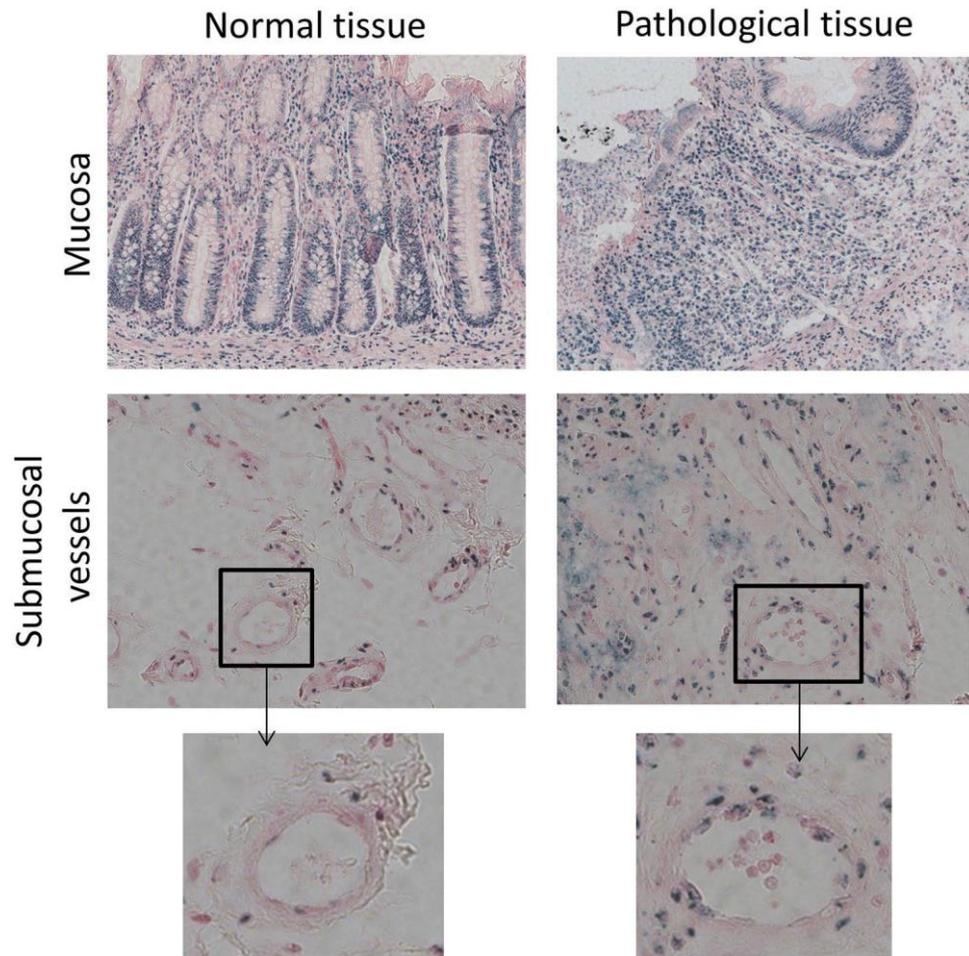


**Figure 4.** Hey 2 overexpression is sufficient to induce phenotypic conversion of endothelial cells to a mesenchymal phenotype. HUVECs were transfected with pCMV6-HEY2-Myc-DDK plasmid expression vector or with pCMV6-AC-HA-His as a control. Three days after transfection, some cells were spindle-shaped, lost their vWF expression while acquiring alpha-sma and sm22-alpha expression, and lost some intercellular connections via p120 catenin. Optical observation x400; immunostaining: bar = 50  $\mu$ m, except for SM22- $\alpha$  bar = 100  $\mu$ m. **(b)** mRNA expression levels measured by qPCR in Hey2 expression plasmid-transfected HUVECs compared with HUVECs transfected with empty plasmid (retrieved to 1, bar), 72 h after cell transfection. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Data are representative of two independent experiments performed in triplicate, and values are the mean  $\pm$  sem.

time point in this model is also characterized by reactive hyperproliferation of surviving crypts, demonstrating high cell density and often multilobed glands that sometimes resemble adenocarcinoma (Fig. 7a). Glandular hyperplasia, as opposed to epithelial ulceration, is a sign of tissue scarring. Epithelial cell production by hyperplastic crypts to recover the bordering epithelium is a crucial step in repair of injured intestinal tissue. To evaluate the severity of radiation damage in both Hey2<sup>flx/flx</sup> and Hey2KO<sup>endo</sup> mice, we measured the percentage of total lesions concerned with complete loss of bordering epithelium and the number of simple and multilobed glandular hyperplasias. Acute tissue protection in Hey2KO<sup>endo</sup> mice was characterized by a lower percentage of mucosa concerned with bordering epithelial loss and more multilobed glandular hyperplasias (Fig. 7b), suggesting reduced acute tissue damage.

Exposure of the rectum to high single doses of ionizing radiation is known to generate late effects with a strong consequential component, i.e. the severity of late damage is highly influenced by the severity of acute injury. Given that Hey2 deletion in the endothelial compartment lessened acute radiation proctitis, we aimed to determine whether this has an impact on late rectal injury. Late damage was characterized by mucosal ulcer healing, but also by persistent severe epithelial atypia, crypt hyperplasia, mucosal collagen deposition and moderate vas-cular dystrophy. HES staining in Fig. 8a shows visibly reduced severity 7–8 weeks post-irradiation in Hey2KO<sup>endo</sup> compared with Hey2<sup>flx/flx</sup> mice, but the Radiation Injury Score (RIS, Fig. 8b) failed to reach statistical significance. The RIS consists of several parameters related to all intestinal wall compartments, thus minimizing the impact of mucosal damage score on the total score applied. We investigated more precisely late mucosal damage by measuring the percentage of total lesions affecting healthy bordering epithelium (well-oriented/elongated columnar cells with basal nucleus) and those indicating atypical epithelium (cuboidal epithelial cells with centered nucleus, pictures in Fig. 8c). These measurements were done using HES staining and p120-catenin immunofluorescent staining. Hey2KO<sup>endo</sup> mice showed a lower percentage of total lesions affecting cuboidal/atypical epithelium than Hey2<sup>flx/flx</sup> mice (Fig. 8c). These data may indicate lessened severity of late radiation proctitis in Hey2KO<sup>endo</sup> mice.

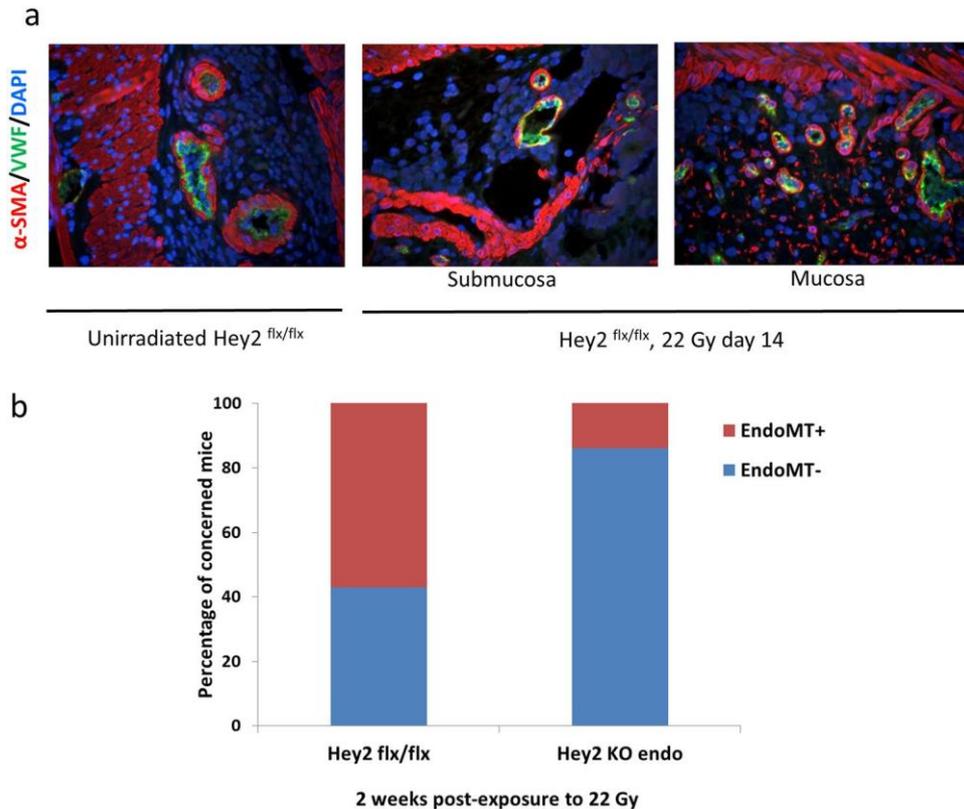
**Conditional deletion of Hey2 in the endothelium protects the intestinal stem cell compartment from radiation damage.** Total body irradiation is a model frequently used to investigate the role of several



**Figure 5.** Hey2 immunoreactivity in the endothelial compartment is increased in human radiation proctitis. Hey2 immunostaining was performed in human rectal tissues (pictures of mucosa and submucosa are presented) following pre-operative radiation therapy for rectal adenocarcinoma at a total dose of 45 Gy. Surgical resection occurred 5–7 weeks after radiation therapy taking rectal tissue within the irradiation field near the tumor bed (pathological tissue) and in margins (normal tissue) outside the irradiation field. Insert: submucosal vessel magnification detailing Hey2 immunoreactivity in endothelial cells. Original magnification x200.

agents in the regenerative capacity of the small intestinal stem cell compartment<sup>31</sup>. We saw that Hey2 endothelial deletion reduced acute mucosal ulceration. Ulceration is defined as the loss of bordering epithelium, due to radiation-induced insult to/sterilization of the stem/progenitor crypt compartment and compromised epithelial regeneration. To assess intestinal crypt response to ionizing radiation, we exposed Hey2<sup>flx/flx</sup> and Hey2KO<sup>endo</sup> mice to 12 Gy total body irradiation and monitored small intestinal stem cell apoptosis (24 h post-exposure) and the number of surviving crypts at 3 days, indirectly reflecting the number of surviving stem cells. TUNEL/p120 catenin double immunostaining revealed radiation-induced cell apoptosis in the stem and transit/amplifying compartments as exemplified by pictures obtained in control and 12 Gy total body-irradiated Hey2<sup>flx/flx</sup> mice (Fig. 9a). The number of TUNEL-positive cells per crypt was significantly reduced in Hey2KO<sup>endo</sup> mice compared with Hey2<sup>flx/flx</sup> mice (Fig. 9a), suggesting intestinal crypt compartment protection by conditional Hey2 deletion in the endothelium. The severity of intestinal radiation damage may be further evaluated by counting the surviving crypts. Three to four days post-irradiation, the number of crypt-like foci of surviving epithelial cells can be counted on histological/HES-stained tissue sections based on their morphological appearance, i.e. no base dilatation and presenting at least 10 well-stained epithelial cells and one Paneth cell. The number of surviving crypts at 3 days post-exposure was significantly higher in Hey2KO<sup>endo</sup> mice than in Hey2<sup>flx/flx</sup> mice (Fig. 9b), confirming the epithelial protection afforded by the conditional deletion of Hey2 in endothelial cells.

The next question was how an endothelial-specific Hey2 deletion influences intestinal stem compartment response to radiation exposure. Our hypothesis was that protection of crypt cells in Hey2KO<sup>endo</sup> mice occurred via protection of endothelial cells from radiation damage. Endothelial protection, and especially reduced endothelial apoptosis, has been shown to protect small intestinal crypts from radiation damage. Radiation-induced apoptosis of endothelial cells has been observed in the chorion of small intestinal villi. Probably because the mucosal microvasculature is more difficult to observe, we were unable to see any radiation-induced endothelial apoptosis in irradiated rectum 5 h post-exposure. We then decided to use Plasmalemmal Vesicle-Associated Protein-1



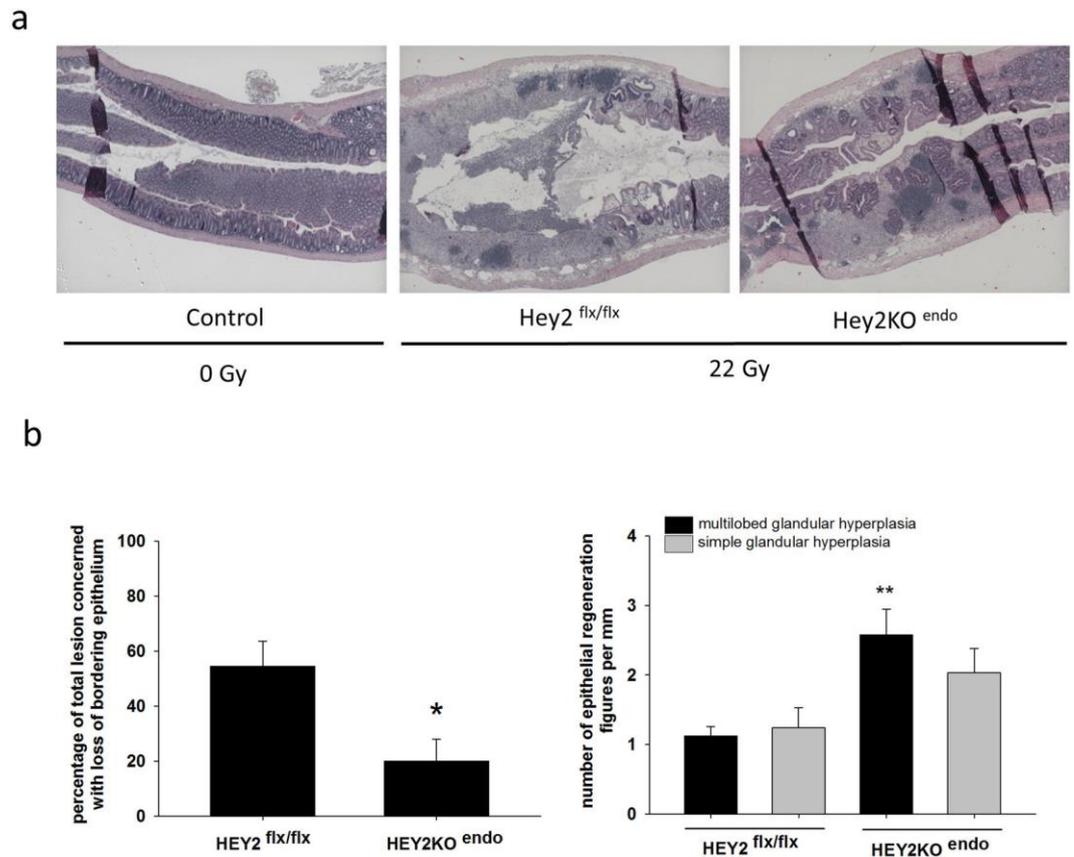
**Figure 6.** Conditional Hey2 knock-out in the endothelium reduces EndoMT frequency in injured colorectum. Hey2<sup>flx/flx</sup> and Hey2KO<sup>endo</sup> mice were exposed to 22 Gy in the colorectal area. **(a)** Representative pictures of vWF/ $\alpha$ -sma co-immunostaining showing no merging signal in unirradiated tissues, and EndoMT figures (yellow merging signal marking co-expression) observed by confocal microscopy in the mucosa as well as in the submucosa of 22 Gy irradiated tissues. Co-expression was observed in both mouse strains. Original magnification x400. **(b)** Hey2 conditional deletion in the endothelium reduced the percentage of mice concerned with EndoMT 14 days after radiation injury. Hey2<sup>flx/flx</sup> n = 6; Hey2KO<sup>endo</sup> n = 7.

(PLVAP/PV-1) immunostaining. PLVAP is a transmembrane protein associated with the caveolae of fenestrated microvascular endothelia. PLVAP up-regulation is a marker of endothelial barrier disruption and endothelial activation, and is often used to monitor the state of the blood-brain barrier<sup>32</sup>. PLVAP immunostaining was performed in 22 Gy irradiated rectal tissues 2 and 7/8 weeks post-exposure, showing no difference from unirradiated tissues in which PLVAP immunostaining was virtually absent. We hypothesized that earlier time points following radiation exposure may be more informative and performed PLVAP immunostaining 24 h and 3 days after 12 Gy total body irradiation in rectal and small intestinal tissues. Whereas there was again no PLVAP positive signal at 24 h, the 3-day time point was characterized by a marked increase in PLVAP immunoreactivity (Fig. 9c). The number of PLVAP-positive spots was thus quantified in both mouse strains on small intestinal tissue sections to allow easier observation of microvascularization than in rectal sections. Conditional Hey2 deletion lessened the number of PLVAP-positive spots in small intestinal tissue sections (Fig. 9c), suggesting reduced endothelial barrier disruption in Hey2KO<sup>endo</sup> mice.

## Discussion

The response of normal digestive tissue to radiation exposure is characterized by inflammation and fibrosis, a context known favor EndoMT. We recently demonstrated that EndoMT participates in tissue injury in radiation-induced proctitis in Tie2-GFP mice and is present in human radiation proctitis following rectal cancer treatment by radiation therapy<sup>15</sup>. This earlier report, however, did not provide information about possible mechanisms and molecular targets implicated in radiation-induced EndoMT. The present study demonstrates that Hey2, a transcriptional repressor and Notch pathway target, is implicated in radiation-induced EndoMT, and that its conditional deletion in the endothelial compartment efficiently reduces EndoMT and consequently the severity of tissue damage in our preclinical model of radiation-induced proctitis. This is the first report demonstrating that EndoMT may represent an interesting strategy to mitigate radiation-induced damage to healthy digestive tissues.

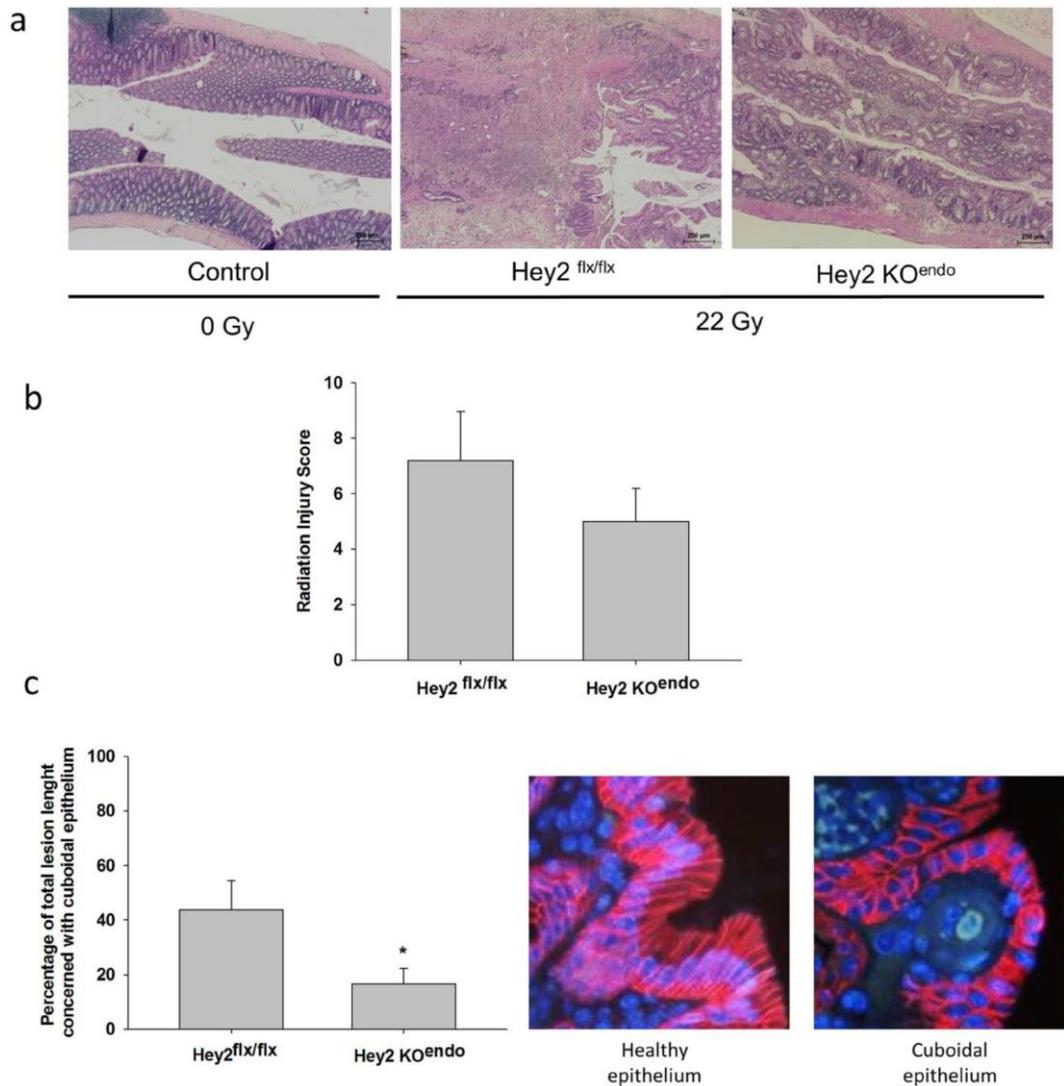
Adult endothelial cells possess plastic properties allowing phenotypic conversion to mesenchymal cells via different induction methods. The response of endothelial cells to radiation exposure is characterized by cell death, but also by the acquisition of a long-lasting activated phenotype responsible for now well-described radiation-induced vascular dysfunction. The endothelial compartment is present in normal tissues as well as in tumors, and advances in the radiobiology of endothelial cells may be determinant in understanding how tumors and healthy tissues



**Figure 7.** Conditional Hey2 deletion in the endothelium mitigates radiation-induced acute tissue damage. **(a)** HES staining of control colorectum and irradiated colorectum of Hey2<sup>flx/flx</sup> and Hey2KO<sup>endo</sup> mice 14 days post-exposure. Original magnification x40. **(b)** The percentage of total lesions demonstrating loss of bordering epithelium (ulceration) and multilobed and simple glandular reactive epithelial hyperplasias were counted for each mouse over a total injured area length between 4 and 9 mm 14 days post-injury. Hey2<sup>flx/flx</sup> n = 6; Hey2KO<sup>endo</sup> n = 7.

respond to radiation therapy<sup>3,33</sup>. EndoMT has been shown to belong to the various phenotypic changes observed after radiation exposure of endothelial cells, and was previously demonstrated in irradiated human aortic endothelial cells<sup>30</sup>, human pulmonary endothelial cells<sup>29</sup> and human intestinal microvascular endothelial cells (HIMECs)<sup>15</sup>. Here we made the choice to use HUVECs as an *in vitro* model to explore possible candidate genes involved in radiation-induced EndoMT that may represent interesting molecular targets. The use of HUVECs is, of course, questionable, given that we had the opportunity to use HIMECs. Our objective in the present study was to obtain the more representative gene expression profile in primary cells obtained from a pool of patients rather than that extracted from a particular one, and to work with less precious and easily transfectable cells. The ability of HUVECs to undergo phenotypic conversion to mesenchymal cells has been demonstrated using various stimuli<sup>34,35</sup> and here we show that ionizing radiation is another stimulus able to induce EndoMT in these human macrovascular cells, with a gene expression profile resembling the one obtained in irradiated HIMECs<sup>15</sup>. *In vivo* as well as *in vitro*, it is known that not all endothelial cells undergo EndoMT. *In vivo*, there are percentage estimates concerning the number of mesenchymal cells of endothelial origin in several models<sup>10,12,13</sup>, but the number of endothelial cells undergoing EndoMT within the vasculature *in vivo* remains unknown, even *in vitro* in the different situations published hitherto. In the present study we demonstrate that transitioning endothelial cells 7 days after radiation exposure to 10 Gy represent around 40% of total confluent HUVECs. However, we do not know if this percentage represents what happens *in vivo*. Finally, we observed that EndoMT especially concerned “big cells”, i.e. probably irradiated cells becoming senescent, with a characteristic increase in cell size<sup>36</sup>. Further work is needed to establish whether radiation-induced EndoMT shares common features with cellular senescence.

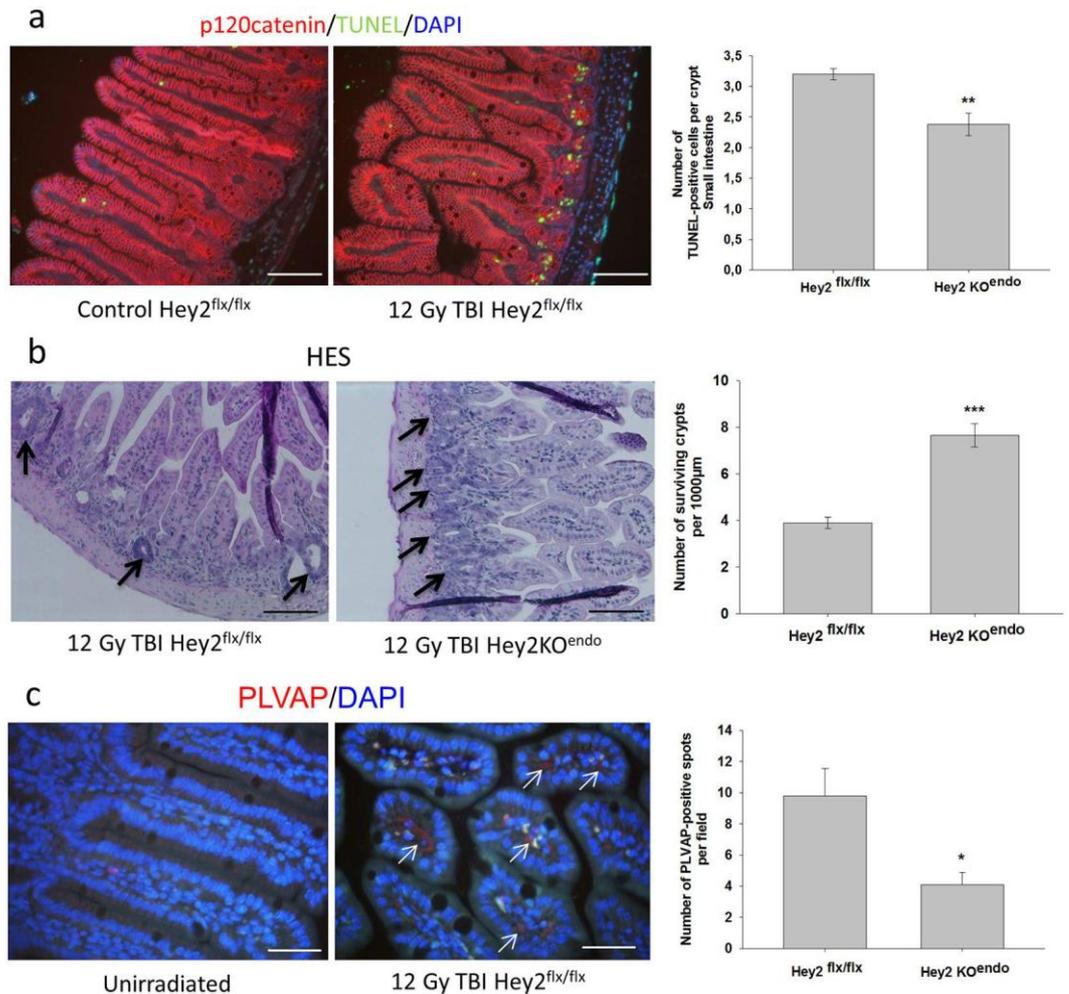
Study of gene expression revealed a marked and very reproducible increase in Hey2 expression levels, and we made the choice to investigate the role of Hey2 in radiation-induced EndoMT. Hey2 is a Notch pathway target acting directly as a transcriptional repressor and may activate some target genes by indirect mechanisms. The link between Notch and Hey2 is not exclusive, since Notch1<sup>-/-</sup> mice still express Hey2 and transcription of Hey2 can be stimulated via the BMP9/Alk1 pathway independently of Notch activation in HUVECs<sup>21,37</sup>. Data demonstrating the role of Hey2 in stress-induced EndoMT or even EMT are sparse and the present study is the first to show that Hey2 overexpression is sufficient to induce EndoMT in HUVECs, decreasing expression of vWF and Tie1 and increasing expression of SM22- $\alpha$  and TGF $\beta$ 2. The absence of increase in  $\alpha$ -SMA expression may be due to study timing. Nevertheless, this is not troublesome considering that the precise phenotype obtained in



**Figure 8.** Acute injury mitigation by conditional deletion of Hey2 reduces the severity of late epithelial damage. **(a)** HES staining of control and irradiated rectal tissues 7–8 weeks following localized radiation exposure to 22 Gy showing radiation damage observed in Hey2<sup>flx/flx</sup> and Hey2KO<sup>endo</sup> mice. **(b)** A semi-quantitative radiation injury score was assigned to irradiated tissues from both strains. Original magnification x40. **(c)** the percentage of bordering epithelium with cuboidal epithelial cells marking epithelial damage was measured on each HES- and p120 catenin-stained (pictures) tissue section. Original magnification x400. Hey2<sup>flx/flx</sup> mice n = 9; Hey2KO<sup>endo</sup> mice n = 12. \*p < 0.05.

endothelial cells undergoing EndoMT may vary depending on the stimulus applied. This is well demonstrated by the literature, in which transitioning cells often have very different expression profiles. Unlike the majority of stimuli applied to endothelial cells to induce EndoMT in published studies, such as cytokines<sup>14</sup>, glucose<sup>34</sup> or oxidative stress<sup>38</sup>, radiation exposure generates a highly complex cell response with cytokine secretion, oxidative stress or again cell death and senescence. This complexity may explain why transfection of HUVECs with Hey2 siRNA before irradiation failed to rescue EndoMT progression, suggesting the involvement of multiple cellular pathways.

Because transfection by itself may have deleterious effects and does not represent what happens *in vivo*, we decided to investigate the involvement of Hey2 in radiation-induced EndoMT in our preclinical model of radiation proctitis in mice. Given that Hey2 knock-out is associated with severe cardiac defects, we used the Cre-LoxP strategy to inactivate Hey2 specifically in the endothelial compartment. The specificity of endothelium recombination events in intestinal tissue was checked using ROSA26 reporter mice crossed with Ve-Cad-Cre mice in previous studies<sup>15</sup>. We used a preclinical model of high-dose localized exposure to the rectum to mimic the severe mucosal ulceration that may be encountered in rectal tissues of patients treated with radiation therapy. This model does not fit with the majority of radiation fractionation schedules used in humans until now, but the evolution of radiation therapy techniques, such as Stereotactic Body Radiation Therapy (SBRT) using ablative doses



**Figure 9.** Conditional Hey2 deletion in the endothelium protects epithelial stem cells and endothelial compartments from radiation damage. (a) Hey2<sup>flx/flx</sup> and Hey2<sup>KO<sup>endo</sup></sup> mice were exposed to 12 Gy total body irradiation (TBI) and TUNEL/p120-catenin co-immunostaining was performed 24 h post-irradiation to monitor apoptosis of crypt epithelial cells. The number of apoptotic crypt cells was determined in the small intestine in a total of 50 crypts per slide. (b) HES staining of small intestine tissue was performed 3 days after total body irradiation. Surviving crypts were identified as surviving irradiation based on their histological appearance, i.e. undilated and with at least 10 well-stained epithelial cells and 1 Paneth cell. Surviving crypts were counted over a total tissue length between 1900 and 2600 µm and related to 1000 µm in both Hey2<sup>flx/flx</sup> (n = 6) and Hey2<sup>KO<sup>endo</sup></sup> mice (n = 3). \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001. Bar = 100 µm. (c) Plasmalemmal Vesicle-Associated Protein-1 (PLVAP, red) immunostaining of small intestine tissue three days post-12 Gy TBI. Bar = 50 µm. PLVAP immunoreactivity was rare in control tissues, but increased dramatically after irradiation. The number of PLVAP-positive spots was thus quantified in 5 different fields per slide in irradiated small intestine in both strains. Hey2<sup>flx/flx</sup> n = 4; Hey2<sup>KO<sup>endo</sup></sup> n = 3. \*p < 0.05.

per fraction in the treatment of prostate tumors, makes this preclinical approach pertinent to the investigation of the possible mechanisms of radiation side effects in such a context.

In this study we show that conditional deletion of Hey2 in the endothelial compartment reduces EndoMT frequency and the severity of radiation proctitis. This enabled us to overcome a barrier to our understanding of the role of EndoMT in radiation proctitis compared with our previous work<sup>15</sup>, demonstrating here that reducing EndoMT has a direct impact on tissue damage severity, as demonstrated in mouse models of cardiac fibrosis or obstructive nephropathy<sup>10, 39</sup>. Reduced tissue damage in Hey2<sup>KO<sup>endo</sup></sup> mice in the present study was expressed as lessened mucosal ulceration. Ulceration results from compromised epithelial regeneration and damage to the gastrointestinal tract after radiation exposure and has been shown to result from the destruction of radiosensitive compartments such as crypt/stem and clonogenic epithelial cells and microvascular endothelium<sup>31, 40</sup>. We thus first explored radiation effects on the epithelial stem compartment and observed that Hey2 deletion in the endothelium preserved crypt function, which may explain reduced ulceration by more efficient epithelial cell production.

We currently do not know how conditional deletion of Hey2 in the endothelium protects the epithelial compartment. One hypothesis is preservation of microvascular endothelial integrity. To investigate the condition of the microvascular endothelium, we used PLVAP or PV-1 immunostaining. PLVAP belongs to the caveolae and

diaphragmed fenestrae structures of fenestrae endothelia, which finely tune endothelial permeability<sup>41</sup>. *In vivo*, PLVAP expression has been correlated with disruption of the blood-brain barrier and with microvascular leakage in diabetic retinopathy<sup>32, 42</sup>. We confirm here that PLVAP is expressed in gut microvascularization and show for the first time that PLVAP immunoreactivity increases in digestive tissues following radiation exposure, which is known to induce vascular leakage<sup>3</sup>, suggesting that PLVAP may be a marker of radiation-induced microvascular damage. The number of PLVAP-positive spots in Hey2KO<sup>endo</sup> mice was significantly reduced, suggesting that Hey2 deletion may protect the endothelium from radiation damage, preserving the clonogenic/stem epithelial cell compartment.

Finally, intestinal tissue exposure to high doses of ionizing radiation is known to generate late damage with a strong consequential component, i.e. the severity of chronic damage depends on the severity and duration of the acute phase<sup>43</sup>. In the present study, reducing the severity of the acute phase had beneficial effects on late damage, as already demonstrated with other acute therapeutic strategies, including strategies targeting epithelial protection<sup>44</sup>. One should, however, remain cautious regarding Hey2 inhibition. Hey2 belongs to the most prominent Notch target genes and dysregulation of Notch signaling occurs in several inherited syndromes and in cancer<sup>45</sup>, in the maintenance of proliferating crypt cells in the intestine<sup>46</sup> and in the process of angiogenesis necessary throughout lifetime<sup>47</sup>. In endothelial cells, Hey2 is dependent on Notch1, but other signaling pathways are involved in Hey gene expression, and crosstalk between Notch, TGF-beta and BMP signaling has been demonstrated<sup>37, 47</sup>. Given that both TGF-beta and BMP may be implicated in tissue scarring and fibrosis, further studies will be necessary to investigate possible negative consequences of Hey2 deletion in different cell types, with particular emphasis on these three pathways.

In conclusion, the present work demonstrates that a strategy of gene deletion only in the endothelium is sufficient to mitigate radiation-induced proctitis in our preclinical model, confirming the cornerstone role of the endothelium in damage to healthy tissues. We also highlighted that Hey2 is involved in radiation-induced EndoMT and that Hey2 invalidation reduces EndoMT and tissue damage. The present work demonstrates for the very first time that a strategy based on the reduction of EndoMT, via Hey2 inhibition but also in principle via other molecular components of EndoMT, offers protection to radiosensitive endothelial and epithelial compartments and mitigates intestinal tissue damage. These interesting results warrant further studies of radiation-induced EndoMT and may offer new perspectives in the understanding of the radiation response of healthy tissues and obviously of tumors in the management of the effectiveness and associated side effects of radiation therapy.

## Methods

**Cell line.** Primary HUVECs (C2519A pooled) were from Lonza (Verviers, Belgium) and grown at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> in EBM-2 MV medium (Lonza).

**Cell transfection.** *Hey2 expression plasmid:* 80% confluent HUVECs were transfected with pCMV6-HEY2-Myc-DDK plasmid expression vector (Clinisciences, Nanterre, France) using FuGENE (Roche Diagnostics, Meylan, France) as transfection reagent. pCMV6-AC-HA-His (Empty vector, Clinisciences) was used as control. Three days after transfection, cells were fixed for immunolabeling or treated for RNA or protein extraction. *Hey2 siRNA:* 60% confluent HUVECs were transfected with ON-TARGET plus human Hey2 siRNA and ON-TARGET control pool siRNA NT as a control, using DharmaFECT 1 as transfection reagent, as indicated by the manufacturer (GE Healthcare Dharmacon, Lafayette, CO, USA). Cells were irradiated 48 h post-transfection and harvested for mRNA extraction 7 days post-irradiation.

**Cell immunofluorescence.** Seven days after 0 or 10 Gy irradiation, cells were rinsed in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde at room temperature for 10 min. After permeabilization (0.1% Triton X100, 10 min) and blocking with 2% bovine serum albumin (1 h), primary antibodies were incubated for 1 h at room temperature: polyclonal rabbit anti-human von Willebrand factor (vWF, Dako, Les Ulis, France), monoclonal mouse anti-human alpha-smooth muscle actin, clone 1A4 (α-SMA, Dako), polyclonal goat anti-human smooth muscle 22-α (SM22-α), rabbit polyclonal anti-Hey2 and rabbit polyclonal anti-VE-cadherin antibodies (Abcam, Paris, France). Cells were incubated with corresponding secondary antibodies (Alexa Fluor<sup>®</sup>-conjugated antibodies, Life Technologies, Saint Aubin, France) for 1 h at room temperature. For double immunostaining of vWF and alpha-SMA, primary antibodies were incubated together, and after rinsing the corresponding secondary antibodies were added. Slides were mounted in Vectashield mounting medium with DAPI (Eurobio/Abcys, Courtaboeuf, France).

p120-Catenin/F-actin co-immunostaining was performed as follows: cells were rinsed, fixed, permeabilized and primary rabbit monoclonal anti-p120 catenin antibody (Abcam) was added and incubated for 1 h at room temperature. Corresponding secondary antibody (Alexa Fluor<sup>®</sup>-conjugated antibody, Life Technologies) was added for 1 h at room temperature. After rinsing, the CytoPainter F-actin Staining Kit – Red Fluorescence (Abcam) was used according to the manufacturer's instructions. Slides were mounted in Vectashield mounting medium without DAPI (Eurobio/Abcys).

**Flow cytometry.** Seven days after 10 Gy irradiation, control and irradiated HUVECs were washed, trypsinized and then 1 × 10<sup>6</sup> cells were resuspended, fixed and permeabilized in 250 μL using BD Cytotfix/Cytoperm<sup>™</sup> Kit. After two rinses, cells were stained for 30 min at room temperature with α-SMA and vWF antibodies (Abcam). Labeled cells were centrifuged and each pellet was suspended in 500 μL of PBS containing 5% FBS. Multi-parametric analyses were performed on a BD FACSCanto<sup>™</sup> II (3-laser, 4-2-2 configuration) for data recording and using FlowJo 7.6.5 software (FlowJo LLC). A first analysis was done on size (FSC: forward scatter)/granulometry (SSC: side scatter) parameters, to collect fixed cells and to remove fragmented cells and debris (Supplementary Fig. 2a and b). This first step allowed us to determine the gate where at least 5 × 10<sup>4</sup> events per

replica were recorded. Then, upon these gated events (Supplementary Fig. 2c), the vWF signal was collected on the FITC channel (filters  $\lambda_{em}$ : 530/30 nm) after air-cooled 488 nm solid state (20-mW output) laser excitation, while the  $\alpha$ -SMA signal was collected on the Alexa 647 channel (filters  $\lambda_{em}$ : 660/20 nm) after air-cooled 633 nm HeNe (17-mW output) laser excitation. The specificity of the staining was previously checked by using isotype controls, sheep IgG fluorescein (Abgent, Clinisciences) and rabbit IgG, monoclonal [EPR25A] (Abcam) for vWF and  $\alpha$ -SMA, respectively (Supplementary Fig. 3).

**Western blots.** Cell total protein was extracted using RIPA buffer supplemented with phosphatase and pro-tease inhibitors (Roche Diagnostics, Meylan, France). Protein concentration was determined using a BCA assay (Sigma Aldrich) and equal amounts of protein were resolved by SDS-PAGE. The blocked membrane was incubated with primary antibodies overnight at 4 °C. Bands were detected by using a horseradish peroxidase second-ary antibody and visualized with ECL Plus reagent (GE Healthcare, Buc, France).  $\beta$ -Tubulin was used as loading control (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany).

**Quantitative real-time PCR.** Total RNA was prepared with the total RNA isolation kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). After quantification on a NanoDrop ND-1000 apparatus (NanoDrop Technologies, Rockland, DE), reverse transcription was performed with 1  $\mu$ g RNA using a reverse transcription kit from Applied Biosystems (Courtaboeuf, France). Quantitative PCR was carried out on a 7900HT Fast-Real Time PCR system (Applied Biosystems) using pre-developed TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression assays (Applied Biosystems), with GAPDH as housekeeping gene. Relative mRNA was quantified using the CT method. DataAssist<sup>TM</sup> software (Life Technologies) was used to perform hierarchical clustering with global normalization and Pearson's correlation.

**Hey2 conditional null mice.** To study the effects of *Hey2* inactivation on radiation-induced EndoMT *in vivo*, mice possessing LoxP sites on either side of exons 2 and 3 of the target gene *Hey2* (*Hey2*<sup>flx/flx</sup>; *Hey2*<sup>tm1Eno</sup> / J; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) were bred with mice with Cre recombinase expression under the endothelial promoter VE-cadherin (*VECad-Cre*<sup>+/+</sup> mice<sup>48</sup>). The following mice were used for experiments: *Hey2*<sup>flx/flx</sup>/*VECad-Cre*<sup>-/-</sup> mice (named *Hey2*<sup>flx/flx</sup>) and *Hey2*<sup>flx/flx</sup>/*VECad-Cre*<sup>+/+</sup> mice (named *Hey2KO*<sup>endo</sup>, see Supplementary Fig. 6).

**Mouse genotyping.** Genomic tail DNA was extracted (KAPA mouse genotyping kit, Kapa Biosystem, USA) and amplified by PCR. Reverse and forward primers were provided by Life Technologies, France. Two primers were used: 5'-CTAGAGAGGACCTGGAGAGTTTAAAG-3' forward and 5'-CTGTGCCACCAGCCTTAAAACC-3' reverse.

**Irradiation.** Cell irradiation (2, 10 or 20 Gy single doses) was performed at 90% cell confluence using a <sup>137</sup>Cs source (IBL 637, CisBio, Saclay, France; dose rate 1 Gy.min<sup>-1</sup>). For fractionated irradiation, confluent cells were exposed to 2 Gy daily fractions, 5 days a week with a weekend break. Animal irradiation procedures: the protocol (P13-18) for animal use in this work was reviewed and approved by national ethics committee no. 81, animal facilities agreement number C92-032-01. For colorectal irradiation, mice were anesthetized (1.5% isoflurane), and a single dose of 22 Gy was delivered through a 1 × 0.8 cm window centered on the colorectal region, using the Elekta Synergy<sup>®</sup> Platform (Elekta S.A.S. France, Boulogne, France) delivering 4 MV X-rays at 2.6 Gy/min. For total body irradiation, mice were anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine/xylazine and exposed to 4 MV X-rays at 2.6 Gy/min through a 30 × 30 cm window at a total dose of 12 Gy.

**Tissue harvesting, histology and immunohistology.** Two and 7/8 weeks after radiation exposure, colorectal tissues were removed, fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (5  $\mu$ m) were stained with hematoxylin-eosin-saffron for routine histological examination.

**Radiation Injury Score (RIS).** RIS variables consisted of mucosal ulceration, epithelial atypia, thickening of the subserosa, vascular sclerosis, intestinal wall thickening, colitis cystica profunda and dystrophy of the muscularis propria (MP). Radiation injury was graded for each variable as null (0), slight (1), moderate (2) or severe (3). Dystrophy of the MP was graded as follows: 0: none; 1: dystrophy of a few muscular cell layers in contact with the submucosa; 2: dystrophy affecting less than 50% of the MP thickness; and 3: dystrophy affecting more than 50% of the MP thickness<sup>49</sup>.

**Measurement of mucosal ulceration in acute samples.** lengths of injured area and area affected by loss of border-ing epithelium were measured using the Visiol@b<sup>TM</sup>2000 image analysis software (Biocom SA, Les Ulis, France), and data were expressed as percentages. The number of epithelial regeneration figures was counted on the entire damaged area (between 4 and 9 mm observable on tissue sections) and reported per mm. Multilobed glandular hyperplasia was defined as at least 2 crypt bases associated with a single crypt lumen.

**Measurement of healthy and cuboidal epithelium in chronic samples.** measurements were done on HES-stained sections, helped by specific epithelial cell staining with p120 catenin antibody using the Visiol@b<sup>TM</sup>2000 image analysis software (Biocom SA) on the total injured area and expressed as percentages. Healthy bordering epithe-lium consisted of numerous columnar epithelial cells close to each other, presenting p120 catenin-stained junc-tions and a basal nucleus. Cuboidal bordering epithelium consisted of cuboidal epithelial cells presenting diffuse p120 catenin staining and a centered nucleus. Counting surviving crypts 3 days after total body irradiation: Crypts surviving irradiation were identified based on histological appearance, i.e. undilated and possessing at least 10 well-stained epithelial cells and 1

Paneth cell. Surviving crypts were counted using the Visiol@b<sup>TM</sup>2000 image analysis software (Biocom SA), over a total tissue length of between 1900 and 2600  $\mu\text{m}$  and related to 1000  $\mu\text{m}$ .

**Immunofluorescence.** Longitudinal sections were deparaffinized/rehydrated, permeabilized in PBS -0.1% Triton X-100 and antigens were unmasked in citrate buffer pH = 9 (Dako). Sections were incubated with rabbit anti- $\alpha$ -SMA antibody, rabbit polyclonal anti-p120 catenin or rat anti-PLVAP (Abcam) for 1 h at room temperature. Samples were then incubated with the corresponding secondary Alexa Fluor<sup>®</sup>-conjugated antibody (Life Technologies). For immunofluorescent double labeling: sections were incubated with rabbit polyclonal antibody to  $\alpha$ -SMA (Abcam) followed by the corresponding secondary Alexa Fluor<sup>®</sup>-conjugated antibody (Life Technologies), and incubated with sheep polyclonal antibody to vWF/FITC-conjugated antibody (Dako). Sections were mounted in Vectashield mounting medium with DAPI (Eurobio/Abcys).

The number of PLVAP-positive spots was quantified on 5 different fields per slide for each animal using the Visiol@b<sup>TM</sup>2000 image analysis software (Biocom SA). Yellow merging signals following  $\alpha$ -SMA/vWF double fluorescence marking EndoMT were monitored by confocal analyses in a Zeiss LSM 780 confocal imaging system (Zeiss France, Marly le Roi, France).

TUNEL staining was performed using the *In situ* Cell Death Detection Kit (Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions. After TUNEL staining, sections were incubated with rabbit monoclonal anti-p120 catenin antibody (Abcam) for 1 h at room temperature followed by the corresponding secondary anti-body (Alexa Fluor<sup>®</sup>-conjugated antibodies, Life Technologies). Apoptotic epithelial cells were counted in about 50 crypts per tissue section and data were reported as number of TUNEL-positive cells per crypt.

**Human rectal tissues.** Human tissues were obtained at the Department of Pathology, Gustave Roussy Institute (Villejuif, France) following institutional ethical guidelines and French Medical Research Council guidelines. Twenty-four patients treated for rectal adenocarcinoma with preoperative radiotherapy (45 Gy, fractions of 2 or 1.8 Gy) underwent surgical resection of tumors 5 to 7 weeks post-treatment. Specimens of normal tissue were taken adjacent to the tumor (in the irradiation field) and distant from the tumor (outside the irradiation field), making each patient his or her own control. For each patient, an RIS was applied as already described<sup>15</sup>. In the present study, tissue specimens from 4 patients presenting a RIS >75/100 were chosen for Hey2 immunostaining.

**Statistical analyses.** Data are given as means  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed by ANOVA, Student's t-test or the Mann-Whitney rank sum test when appropriate, with a level of significance of  $p < 0.05$ .

Q1

## References

- Hauer-Jensen, M., Denham, J. W. & Andreyev, H. J. Radiation enteropathy—pathogenesis, treatment and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **11**, 470–9 (2014).
- Bentzen, S. M. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer* **6**, 702–13 (2006).
- Milliat, F., Francois, A., Tamarat, R. & Benderitter, M. [Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* **57**, 139–48 (2008).
- Liebner, S. *et al.* Beta-catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion development in the mouse. *J Cell Biol* **166**, 359–67 (2004).
- Medici, D. *et al.* Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med* **16**, 1400–6 (2010).
- Jimenez, S. A. Role of endothelial to mesenchymal transition in the pathogenesis of the vascular alterations in systemic sclerosis. *ISRN Rheumatol* **2013**, 835948 (2013).
- Zeisberg, E. M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M. & Kalluri, R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* **67**, 10123–8 (2007).
- Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**, 1420–8 (2009).
- Arciniegas, E., Frid, M. G., Douglas, I. S. & Stenmark, K. R. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**, L1–8 (2007).
- Zeisberg, E. M. *et al.* Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* **13**, 952–61 (2007).
- He, J., Xu, Y., Koya, D. & Kanasaki, K. Role of the endothelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis of chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* **17**, 488–97 (2013).
- Hashimoto, N. *et al.* Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **43**, 161–72 (2010).
- Zeisberg, E. M., Potenta, S. E., Sugimoto, H., Zeisberg, M. & Kalluri, R. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* **19**, 2282–7 (2008).
- Rieder, F. *et al.* Inflammation-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a novel mechanism of intestinal fibrosis. *Am J Pathol* **179**, 2660–73 (2011).
- Mintet, E. *et al.* Identification of Endothelial-to-Mesenchymal Transition as a Potential Participant in Radiation Proctitis. *Am J Pathol* (2015).
- Kokudo, T. *et al.* Snail is required for TGF $\beta$ -induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J Cell Sci* **121**, 3317–24 (2008).
- Liu, J., Dong, F., Jeong, J., Masuda, T. & Lobe, C. G. Constitutively active Notch1 signaling promotes endothelial-mesenchymal transition in a conditional transgenic mouse model. *Int J Mol Med* **34**, 669–76 (2014).
- Lai, E. C. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131**, 965–73 (2004).
- Nosedá, M. *et al.* Notch activation results in phenotypic and functional changes consistent with endothelial-to-mesenchymal transformation. *Circ Res* **94**, 910–7 (2004).
- Mayeuf, A. & Relaix, F. [Notch pathway: from development to regeneration of skeletal muscle]. *Med Sci (Paris)* **27**, 521–6 (2011).
- Fischer, A., Schumacher, N., Maier, M., Sendtner, M. & Gessler, M. The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes Dev* **18**, 901–11 (2004).
- Kokubo, H., Miyagawa-Tomita, S., Nakazawa, M., Saga, Y. & Johnson, R. L. Mouse hesr1 and hesr2 genes are redundantly required to mediate Notch signaling in the developing cardiovascular system. *Dev Biol* **278**, 301–9 (2005).
- Fu, Y. *et al.* RUNX3 maintains the mesenchymal phenotype after termination of the Notch signal. *J Biol Chem* **286**, 11803–13 (2011).
- Gasperini, P. *et al.* Kaposi sarcoma herpesvirus promotes endothelial-to-mesenchymal transition through Notch-dependent signaling. *Cancer Res* **72**, 1157–69 (2012).

25. Garcia, J. *et al.* Tie1 deficiency induces endothelial-mesenchymal transition. *EMBO Rep* **13**, 431–9 (2012).
26. Arciniegas, E., Neves, Y. C. & Carrillo, L. M. Potential role for insulin-like growth factor II and vitronectin in the endothelial-mesenchymal transition process. *Differentiation* **74**, 277–92 (2006).
27. Kokubo, H. *et al.* Targeted disruption of *hesr2* results in atrioventricular valve anomalies that lead to heart dysfunction. *Circ Res* **95**, 540–7 (2004).
28. Li, J. *et al.* Endothelial Cell Apoptosis Induces TGF-beta Signaling-Dependent Host Endothelial-Mesenchymal Transition to Promote Transplant Arteriosclerosis. *Am J Transplant* (2015).
29. Choi, S. H. *et al.* A Hypoxia-Induced Vascular Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Development of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis. *Clin Cancer Res* **21**, 3716–26 (2015).
30. Kim, M. *et al.* The effect of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) on radiation-induced endothelial-to-mesenchymal transition. *Int J Radiat Biol* **89**, 356–63 (2013).
31. Potten, C. S. Radiation, the ideal cytotoxic agent for studying the cell biology of tissues such as the small intestine. *Radiat Res* **161**, 123–36 (2004).
32. Shue, E. H. *et al.* Plasmalemmal vesicle associated protein-1 (PV-1) is a marker of blood-brain barrier disruption in rodent models. *BMC Neurosci* **9**, 29 (2008).
33. Supiot, S. & Paris, F. [Radiobiology dedicated to endothelium]. *Cancer Radiother* **16**, 11–5 (2012).
34. Chen, X.Y. *et al.* Inhibition of myocyte-specific enhancer factor 2A improved diabetic cardiac fibrosis partially by regulating endothelial-to-mesenchymal transition. *Oncotarget* (2016).
35. Ying, R. *et al.* Hydrogen sulfide suppresses endoplasmic reticulum stress-induced endothelial-to-mesenchymal transition through Src pathway. *Life Sci* **144**, 208–17 (2016).
36. Suzuki, K. *et al.* Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening. *Radiat Res* **155**, 248–253 (2001).
37. Woltje, K., Jabs, M. & Fischer, A. Serum induces transcription of *Hey1* and *Hey2* genes by *Alk1* but not *Notch* signaling in endothelial cells. *PLoS One* **10**, e0120547 (2015).
38. Montorfano, I. *et al.* Oxidative stress mediates the conversion of endothelial cells into myofibroblasts via a TGF-beta1 and TGF-beta2-dependent pathway. *Lab Invest* **94**, 1068–82 (2014).
39. Deng, Y. *et al.* Blocking protein phosphatase 2A signaling prevents endothelial-to-mesenchymal transition and renal fibrosis: a peptide-based drug therapy. *Sci Rep* **6**, 19821 (2016).
40. Paris, F. *et al.* Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* **293**, 293–7 (2001).
41. Stan, R. V., Kubitzka, M. & Palade, G. E. PV-1 is a component of the fenestral and stomatal diaphragms in fenestrated endothelia. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 13203–7 (1999).
42. Schlingemann, R. O., Hofman, P., Vrensen, G. F. & Blaauwgeers, H. G. Increased expression of endothelial antigen PAL-E in human diabetic retinopathy correlates with microvascular leakage. *Diabetologia* **42**, 596–602 (1999).
43. Dorr, W. & Hendry, J. H. Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol* **61**, 223–31 (2001).
44. Torres, S. *et al.* Glucagon-like peptide-2 improves both acute and late experimental radiation enteritis in the rat. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **69**, 1563–71 (2007).
45. Penton, A. L., Leonard, L. D. & Spinner, N. B. Notch signaling in human development and disease. *Semin Cell Dev Biol* **23**, 450–7 (2012).
46. Fre, S. *et al.* Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* **435**, 964–8 (2005).
47. Moya, I. M. *et al.* Stalk cell phenotype depends on integration of Notch and *Smad1/5* signaling cascades. *Dev Cell* **22**, 501–14 (2012).
48. Alva, J. A. *et al.* VE-Cadherin-Cre-recombinase transgenic mouse: a tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells. *Dev Dyn* **235**, 759–67 (2006).
49. Blirando, K. *et al.* Mast cells are an essential component of human radiation proctitis and contribute to experimental colorectal damage in mice. *Am J Pathol* **178**, 640–51 (2011).

## Discussion et Perspectives

---

La radiothérapie est un atout phare dans la lutte contre le cancer. Permettant de stériliser la tumeur, de contrôler sa progression ou de soulager les patients, son utilisation est multiple et souvent indispensable. Comme nous l'avons vu en introduction, la radiothérapie est une technique permettant de cibler de plus en plus précisément la zone à traiter. Ainsi l'évolution des techniques et des protocoles n'a cessé d'améliorer la prise en charge des patients tout en limitant au maximum les risques de pathologies radio-induites. Malgré ces améliorations, les risques de développer des pathologies secondaires à la radiothérapie sont encore inéluctablement présents, d'où l'importance de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de leur apparition.

Comme nous l'avons vu dans le Chapitre II, l'endothélium subit d'importantes altérations lors d'une exposition à des rayonnements ionisants. Au niveau pulmonaire Qiu et al. ont notamment démontré une rupture de la barrière alvéolo-capillaire suite à une irradiation hémithoracique du poumon droit de rats à 14.4 Gy<sup>134</sup>. Une étude très récente a d'ailleurs mis en évidence une radioprotection du poumon via la préservation des cellules endothéliales microvasculaires après exposition de l'ensemble du thorax de souris à 15 Gy<sup>135</sup>. C'est pourquoi au cours de cette thèse nous nous sommes intéressés à caractériser le rôle de l'endothélium et de deux de ses principaux acteurs moléculaires (PAI-1 et HIF-1 $\alpha$ ) dans le développement des pneumopathies radiques. Ceci a respectivement été réalisé dans le cadre d'une irradiation thorax entier pour le premier et en conditions stéréotaxiques pour le second.

### **1. Les modèles d'irradiation**

Nous avons tout d'abord débuté ce projet par la réalisation d'irradiations thorax entier chez la souris via un accélérateur linéaire de photons et d'électrons (LINAC, *Linear Accelerator*). Cette méthode d'irradiation est la plus répandue au sein de la littérature de par sa simplicité d'utilisation et son accès relativement aisé. Elle permet de plus un gain de temps non-négligeable puisque dans notre cas il était possible d'irradier cinq animaux à la fois. Cependant, cette technique possède deux inconvénients majeurs.

Le premier est la présence du cœur dans le champ d'irradiation. Bien que celui-ci soit considéré comme plus radiorésistant que les poumons, il n'est pas à exclure que son exposition aux rayonnements ionisants puissent induire un biais lors de mesures de survie ou de tests à l'effort par exemple. En plus de l'irradiation du myocarde en lui-même, les

coronaires et les vaisseaux de gros calibre entrant et sortant du cœur sont également exposés. Cela peut par conséquent être à l'origine de l'apparition de pathologies cardiovasculaires sévères comme des péricardites, des cardiomyopathies, des insuffisances coronaires ou des problèmes d'arythmie cardiaque<sup>136</sup>. L'atteinte vasculaire est de plus considérée comme la cause majeure de la morbidité radio-induite à long terme chez les survivants de cancers traités par radiothérapie thoracique. Une étude portant sur des enfants ayant été traité par irradiation pour une maladie de Hodgkin démontre notamment que ceux-ci ont un risque accru d'accident vasculaire cérébral, probablement associé à une atteinte des valves cardiaques ou des coronaires<sup>137</sup>. En préclinique, une irradiation hémithoracique du poumon droit via l'utilisation de plaques de plomb, comme réalisée par Vujaskovic et al.<sup>96</sup>, permet cependant de protéger le cœur et ainsi de contourner ce problème.

La seconde limite correspond à l'incapacité d'étudier les effets à distance d'une irradiation pulmonaire. Le fait d'exposer la totalité des poumons aux rayonnements ionisants ne permet en effet pas de s'intéresser à l'impact d'une irradiation sur des tissus pulmonaires (ou cardiaques) situés hors-champ. Or, à la vue de l'inflammation importante et du recrutement massif de cellules immunitaires observés au sein de la zone irradiée chez nos modèles murins, il paraît fort probable qu'une irradiation pulmonaire localisée puisse avoir des conséquences délétères sur le reste du poumon ipsilatéral, voir contralatéral. Avec une méthode d'irradiation différente (protonthérapie) Ghobadi et al. ont par exemple démontré une altération des vaisseaux sanguins pulmonaires situés en dehors de leurs champs d'irradiations, avec notamment une protrusion des noyaux des cellules endothéliales<sup>133</sup>. Outre son impact sur les tissus non-irradiés de l'organe cible, il semblerait qu'une irradiation localisée puisse de plus avoir des répercussions sur d'autres tissus de l'organisme. Siva et al. ont en particulier retrouvé des dommages à l'ADN au niveau de follicules pileux de sourcils non-irradiés chez des patients traités par radiothérapie thoracique (30 x 2 Gy) pour des NSCLC<sup>138</sup>. Les auteurs supposent ici une corrélation entre ce phénomène et les taux plasmatiques de certains médiateurs de l'inflammation. Que ce soit au sein de l'organe cible ou de tissus plus éloignés, ces travaux démontrent que des altérations, induites par l'irradiation, de tissus sains situés à distance de la zone lésée sont possibles. On parle alors d'effet Abscopal<sup>139</sup>.

Comme évoqué en introduction, la radiosensibilité du poumon dépend non-seulement de la dose administrée mais également du volume pulmonaire affecté. Plus le volume est important, plus la dose utilisable doit être faible pour permettre la survie des animaux. Il

convient donc de faire un choix de dose judicieux en prenant en compte les spécificités du modèle animal et de la source d'irradiation. C'est pourquoi les études s'intéressant aux pneumopathies radiques utilisent généralement en thorax entier des doses fibrogéniques uniques de 13 Gy à 20 Gy. Notre choix d'administrer une dose unique de 17 Gy a été basé sur ces ressources, puis affiné par la réalisation d'une gamme de doses (11 Gy, 13 Gy, 15 Gy et 17 Gy). Un reproche qui pourrait être fait à cette méthode est qu'elle est fortement différente des protocoles utilisés en clinique pour soigner les patients. De par les différences de radiosensibilité existantes entre l'Homme et la souris, nous ne pouvons cependant pas faire une transposition directe de ceux-ci. L'application de protocoles normofractionnés chez la souris de type 60 à 70 Gy en fractions de 2 Gy ne provoquerait que très peu de dommages tissulaires. Notre objectif ici est de provoquer chez la souris l'apparition de lésions radiques pulmonaires similaires à celles observées chez certains patients traités par radiothérapie, à savoir une inflammation du parenchyme pulmonaire et le développement d'une cicatrisation pathologique de type fibrose. Cela nous permet ainsi d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de leur développement. Les analyses histologiques réalisées *a posteriori* nous ont permis de confirmer la bonne adéquation de la dose choisie avec cet objectif.

L'acquisition récente d'un SARRP nous a permis de passer outre certaines limites évoquées précédemment pour le modèle thorax entier. En effet, de par l'association d'un système d'imagerie à un collimateur délivrant des minifaisceaux, il nous est ainsi possible d'irradier de très faibles volumes avec une grande précision. Il est cependant à noter que l'utilisation d'un tel appareil requiert des compétences spécifiques. Pour le choix de la dose (90 Gy) et du collimateur (3 mm x 3 mm) nous nous sommes basés sur une publication de Choi et al s'intéressant au rôle de l'endoMT dans le développement de la fibrose radique pulmonaire<sup>140</sup>. Contrairement à eux, nous avons utilisé un protocole d'arc-thérapie plutôt qu'un faisceau unique, de façon à ne pas induire de nécrose au niveau de la peau. De telles conditions permettent d'induire une lésion sévère au niveau du parenchyme pulmonaire sans provoquer de mortalité précoce de l'animal. Les paramètres de cette arc-thérapie ont été déterminés après plusieurs essais de façon à limiter au maximum l'exposition du cœur aux rayonnements ionisants. L'isocentre est ainsi placé dans la région centrale du poumon droit et l'irradiation est réalisée selon un angle de 240° environ, optimisé pour chaque souris grâce à l'image scanner. La dose moyenne reçue par le cœur est ainsi d'approximativement 4 Gy.

Cette méthode est donc idéale pour minimiser l'impact d'une irradiation cardiaque sur les mesures effectuées lors des tests à l'effort.

Chez la souris, le volume pulmonaire que nous avons mesuré grâce à la reconstruction 3D de l'animal avec le logiciel Muriplan<sup>®</sup>, est en moyenne de  $0.5 \text{ cm}^3$ . Le volume irradié avec un tel protocole est de  $0.021 \text{ cm}^3$ , ce qui représente par conséquent approximativement 4 % du volume pulmonaire total. Chez l'Homme le volume des tumeurs traitées pas radiothérapie varie entre 5 cm à 7 cm pour les plus grosses d'entre elles, ce qui correspond à des volumes (assimilés à des sphères) de  $65 \text{ cm}^3$  à  $180 \text{ cm}^3$ . Le volume pulmonaire étant chez l'Homme de l'ordre de  $4500 \text{ cm}^3$ , ces tumeurs représentent donc entre 1.5 % à 4 % du volume. Nous sommes ainsi proche des ratios observés en clinique. Pour aller plus loin, il est également possible d'utiliser des collimateurs de différents calibres ainsi que réaliser des protocoles fractionnés. Le système d'imagerie permet en effet de replacer correctement l'animal dans ce cas. Des travaux dans le cadre d'un projet de thèse au laboratoire portent actuellement sur l'effet volume et l'effet fractionnement, avec la caractérisation des lésions induites par des collimateurs de 1 mm x 1 mm, 6.8 mm x 6.8 mm et 10 mm x 10 mm. Le second objectif de ce travail est d'étudier les effets de plusieurs protocoles de fractionnement. Un protocole de 3 x 20 Gy a d'ailleurs d'ores et déjà été utilisé au sein du laboratoire, en parallèle des premières expérimentations à 90 Gy dose unique. Bien que ce protocole soit le plus sévère parmi ceux utilisés en clinique (utilisant les plus fortes doses par fraction), celui-ci provoque certes de l'inflammation chez la souris mais n'est pas suffisant pour induire l'apparition d'une fibrose radique pulmonaire. Cette observation met en évidence les différences de radiosensibilité précédemment évoquées entre l'Homme et la souris. C'est pourquoi nous avons ainsi décidé de concentrer dans un premier temps nos efforts sur l'utilisation d'une dose unique. De prochaines expérimentations réalisées au sein du laboratoire s'intéresseront cependant à nouveau à la réalisation d'irradiations fractionnées. Une augmentation du nombre de fractions (cinq dans un premier temps) et possiblement de la dose par fraction sont ainsi prévues.

Bien que permettant l'étude des effets à distance induits par une irradiation pulmonaire à forte dose, cette technique n'est toutefois pas parfaite. En effet, les poumons ipsilatéral et contralatéral reçoivent respectivement des doses moyennes de 11.7 Gy et 5.9 Gy. Pour étudier l'effet Abscopal sur le poumon contralatéral, il aurait fallu que celui-ci ne soit pas exposé. Ce biais doit par conséquent être pris en compte dans nos interprétations. Pour protéger ce poumon, une irradiation hémithoracique serait plus appropriée. Pour étudier plus rigoureusement l'effet à distance de l'irradiation sur le poumon ipsilatéral, une technique

déposant encore moins de dose aux tissus hors-champs devrait être utilisée. On peut ainsi notamment penser au cas de la protonthérapie de par ses propriétés liées au Pic de Bragg. Cette technique, utilisée par exemple par Ghobadi et al.<sup>133</sup>, est cependant beaucoup plus difficile d'accès à l'heure actuelle. Néanmoins, le cas de la stéréotaxie pulmonaire chez la souris grâce au SARRP permet de retrouver des situations typiques observées chez l'homme. Le recul clinique acquis aujourd'hui permet certes de mettre en évidence l'importance des volumes (minimes) recevant de fortes doses cumulées et de fortes doses par fraction, mais également des volumes (plus importants) recevant des doses beaucoup plus faibles. Ces grands volumes recevant des doses faibles (moins de 5 Gy) pourraient avoir un impact important sur la morbidité post-radiothérapie.

Hormis la valeur de la dose, son étalement et la taille du volume irradié, d'autres données sont également à prendre en compte lors d'études précliniques en radiobiologie et radiopathologie. En effet, les caractéristiques physiques de chaque irradiateur sont également importantes. Dans le cas des irradiations thorax entier l'appareil utilisé fonctionne à une tension de 4 MV et délivre des faisceaux ayant une énergie moyenne de 1.2 MeV. Ces caractéristiques sont ainsi du même ordre de grandeur que celles des irradiateurs utilisés en clinique chez l'Homme. Le SARRP utilise pour sa part des énergies plus basses, de l'ordre de 70 keV, pour une tension de 220 kV. Au sein du laboratoire des travaux *in vitro* dans le cadre d'un projet de thèse portent justement actuellement sur la comparaison des effets provoqués (à dose égale) par ces deux valeurs d'énergie sur des cultures d'HUVECs. Les potentielles différences sont ainsi recherchées via l'étude du cycle cellulaire, de la viabilité des cellules et de l'étude de la sénescence radio-induite. A terme, ce projet se poursuivra par des expérimentations *in vivo* via des irradiations pulmonaires en conditions stéréotaxiques ou des irradiations digestives. L'objectif dans ce cas sera de chercher de possibles différences au niveau de la sévérité des lésions tissulaires radio-induites en fonction de l'énergie du faisceau. Nous n'avons pas d'argument bibliographique aujourd'hui qui permette de prédire l'impact de ces modifications de l'énergie sur les lésions tissulaires. Néanmoins dans l'historique du laboratoire, pour des raisons techniques, des travaux portant sur des irradiations rectales à 27 Gy chez le rat ont nécessité l'utilisation de rayons X générés à partir de tensions différentes. Des irradiations à des tensions de 220kV (équivalente au SARRP) et de 4MV au LINAC ont ainsi été réalisées sans qu'aucune modification flagrante de la sévérité des lésions tissulaires induites ne soit observée. L'objectif de ces études n'était cependant pas de comparer ces deux énergies et nous ne pouvons pas exclure que des différences puissent exister. Les futurs

travaux pourront répondre à cette question. De la même façon il est également intéressant de porter une attention particulière au débit de dose utilisé lors des irradiations. Dans notre cas celui-ci était d'environ 2.5 Gy/min pour les deux modèles d'irradiation. Cependant des expériences similaires à celles réalisées pour l'étude de l'énergie sont d'autre part menées dans notre laboratoire pour mieux comprendre les variations d'effets induits par différents débits.

## **2. Promoteur VE-Cadhérine et invalidations endothélium-spécifique**

La VE-Cadhérine (*Vascular Endothelial Cadherin*, VE-Cad) est une protéine transmembranaire localisée au niveau des jonctions serrées des cellules endothéliales. Les souris VE-Cad-Cre exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur VE-Cad ont originellement été créées par l'équipe de Maria-Luisa Iruela-Arispe<sup>141</sup>. Par une succession de croisements avec des souris PAI-1 flx/flx ou HIF-1 $\alpha$  flx/flx, les souris VE-Cad-Cre<sup>+/-</sup> PAI-1flx/flx (PAI-1 KOendo) et VE-Cad-Cre<sup>+/-</sup> HIF-1 $\alpha$  flx/flx (HIF-1 $\alpha$  KOendo) ont respectivement été générées au sein du laboratoire. Ces souris possèdent ainsi une invalidation de ces gènes spécifiquement au niveau de l'endothélium. De multiples vérifications ont été réalisées dans le laboratoire de Maria-Luisa Iruela-Arispe pour vérifier l'expression spatio-temporelle de la recombinase Cre. Pour cela les souris VE-Cad-Cre ont tout d'abord été croisées avec des souris ROSA26R. Ces expérimentations ont permis de retrouver un marquage uniforme de la  $\beta$ -gal dans l'ensemble du réseau vasculaire au stade embryonnaire E14.5. Ceux-ci ont de plus été validés par l'analyse de l'activité de l'enzyme sur des cellules endothéliales embryonnaires triées par FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*). 60% des cellules sont ainsi positives à la  $\beta$ -gal au stade E10.5, 75% à E12.5 et 96.5% à E14.5. Des analyses histologiques ont de plus permis de confirmer la co-expression de la  $\beta$ -gal avec CD31 ainsi que de démontrer que la Cre semble posséder une activité identique au niveau des artères, veines et capillaires. Son expression par les cellules endothéliales lymphatiques a pour sa part été retrouvée dès le stade E12.5. Au sein de notre laboratoire, cette spécificité d'expression a enfin également été étudiée à l'âge adulte dans de nombreux organes dont notamment les poumons, le cœur et l'intestin grêle. Il est à noter que bien que le promoteur VE-Cad ait été démontré comme très spécifique aux cellules endothéliales, une fraction de cellules hématopoïétiques ont cependant aussi présenté un marquage  $\beta$ -gal.

### **3. Invalidation endothélium-spécifique de PAI-1 et irradiation thoracique**

La première partie de ce sujet consistait en l'étude du rôle du *pool* endothélial de PAI-1 dans l'apparition des lésions radiques pulmonaires induites par une irradiation forte dose du thorax. Pour réaliser cela, des souris invalidées spécifiquement pour PAI-1 dans l'endothélium, créées au sein du laboratoire, ont été utilisées. Des travaux précédemment menés par Emilie Rannou ont démontré un potentiel protecteur de cette invalidation vis-à-vis du développement de l'entérite radique. Ce bénéfice peut-être expliqué via une apoptose radio-induite moins sévère au niveau des cellules épithéliales progénitrices des cryptes intestinales<sup>11</sup>. L'un des objectifs de cette thèse était donc de déterminer si ce rôle délétère joué par PAI-1 pouvait ou non être un mécanisme de réponse globale des tissus face à une irradiation forte dose. Le poumon a été choisi comme nouvel organe d'intérêt de par son organisation et son fonctionnement strictement différents de l'intestin grêle. En effet, le poumon ne possède pas de compartiment souche clairement défini. Seuls les pneumocytes de type II peuvent jouer ce rôle via leur capacité à proliférer et à se différencier en pneumocytes de type I après une agression. La seconde particularité des poumons est qu'ils sont organisés en parallèle et non en série. Effectivement, au sein des poumons, chaque sous-unité (sac alvéolaire) fonctionne indépendamment des autres. Ainsi, à la différence de l'intestin où une lésion localisée (occlusion par exemple) peut compromettre le fonctionnement global de l'organe, celle-ci n'altérera que la zone affectée dans le cas du poumon. Une exception à ce dernier point concerne cependant les bronches de gros calibre où la section peut au contraire être considérée comme étant en série.

Nous avons premièrement démontré qu'une irradiation thoracique de 17 Gy provoque chez la souris une inflammation précoce sévère puis une fibrose pulmonaire, lésions typiques retrouvées après une irradiation thorax entier dans cette gamme de dose. Il est à noter qu'une augmentation de l'expression du TGF- $\beta$  est observée tout au long de la période post-radique. L'expression de ce facteur est d'ailleurs particulièrement élevée en phase précoce, période au cours de laquelle le phénomène d'endoMT est également mis en évidence. L'invalidation de PAI-1 tend à réduire l'apparition de cette transition, bien que cette observation ne soit pas significative. Contrairement à cela, une étude de Ghosh et al. a mis en évidence qu'une déficience en PAI-1 au sein de cellules endothéliales cardiaques favorise l'induction de l'endoMT médiée par le TGF- $\beta$ 2 *in vitro*<sup>142</sup>. Les cellules endothéliales étant exposées à un environnement particulièrement complexe *in vivo*, la suppression du *pool* endothélial de PAI-1 pourrait donc être insuffisante pour favoriser efficacement ce processus. D'un point de vue

méthodologique la principale limite dans l'étude de l'endoMT est le facteur temporel. En effet, la quantification de ce phénomène à un temps  $t$  n'est que le reflet de son déroulement à ce moment précis. Ces cellules perdant leurs marqueurs endothéliaux au cours du temps, ce modèle ne permet pas d'identifier celles ayant déjà terminé leur transition. De même, il est également impossible de prédire quelle proportion de cellules est susceptible de la réaliser à un temps plus tardif. La seule solution ici est donc de multiplier les temps de prélèvements. L'utilisation de souris Tie2-GFP dans les travaux d'Elodie Mintet sur l'EndoMT<sup>10</sup> et la rectite radique avait pour objectif de pallier à ce problème. De nombreuses études utilisent ce modèle, partant du principe que l'expression génique de Tie2 (et donc de la GFP) ne varie pas au cours du processus d'EndoMT. Les cellules mésenchymateuses d'origine endothéliale sont ainsi GFP-positives et facilement identifiables au sein du tissu fibrosé. Nous avons observé *in vitro* chez les HIMECs que l'irradiation diminue l'expression du gène Tie2. *In vivo*, aucune cellule doublement marquée signant l'EndoMT n'est visible au sein des lésions rectales tardives. Très peu de cellules GFP-positives sont également retrouvées au sein des zones fibreuses. Le suivi des marqueurs endothéliaux est ainsi rendu difficile par l'influence du contexte tissulaire. Cela pourrait par conséquent expliquer la disparité des résultats obtenus dans la littérature par rapport au nombre de cellules concernées par l'EndoMT et à la proportion de cellules mésenchymateuses d'origine endothéliale dans les différents contextes étudiés. Ainsi, seuls deux points démontrés par le laboratoire sont certains à l'heure actuelle. L'EndoMT existe dans les tissus irradiés (rectum et poumon), et la modulation d'expression endothéliale de l'un de ses acteurs majeurs (Hey2) influence la sévérité des lésions rectales (Mintet et al., 2017, voir Résultats - Article 3). D'autres études pourraient être envisagées pour déterminer si l'inactivation de Hey2 dans l'endothélium peut également influencer la sévérité des lésions pulmonaires radio-induites.

Comme évoqué en introduction, les pneumocytes de type II sont capables de proliférer et de se transdifférencier en type I pour la régénération des tissus pulmonaires lésés<sup>92</sup>. Dans notre cas nous avons noté une augmentation du nombre de cellules pro-SFPC<sup>+</sup> (marqueur spécifique des pneumocytes de type II) après irradiation. Ce constat étant valable quel que soit le génotype des souris cela traduit une indépendance de ce phénomène vis-à-vis de PAI-1. Comme énoncé page 34, Senoo et al. ont mis en lumière un effet bénéfique de l'utilisation d'un siRNA spécifique de PAI-1 contre la fibrose induite par la Bléomycine *in vivo*. Ils ont de plus montré une réduction de l'EMT induite par le TGF- $\beta$  *in vitro* sur des cellules épithéliales d'adénocarcinome pulmonaire<sup>68</sup>. Compte tenu des augmentations des marquages pro-SFPC et

TGF- $\beta$  que nous avons observés, nous avons décidé de nous intéresser cette fois-ci à la transition épithélio-mésenchymateuse. Cependant de très rares cas ont été observés dans nos conditions par rapport à la fréquence obtenue par Almeida et al après une irradiation thorax entier à 12 Gy<sup>92</sup>. Ainsi bien qu'à J14 l'état inflammatoire permette l'induction de l'endoMT dans nos conditions, cela n'est pas le cas pour l'EMT. D'autres mesures à des temps supplémentaires seraient nécessaires pour éclaircir ce point.

De façon plus globale les lésions observées à 23 semaines après irradiation sont similaires quel que soit l'expression de PAI-1. Alors qu'une radioprotection de l'intestin avait été mise en évidence par sa délétion au sein du laboratoire, la situation semble différente au niveau pulmonaire. L'implication de PAI-1 dans la fibrose pulmonaire, y compris radique, a pourtant été décrite par d'autres équipes par des approches pharmacologique et génétique. Il y a cependant plusieurs types cellulaires intervenant dans la sécrétion de cette molécule. Bien que le *pool* endothélial ne semble pas ici jouer un rôle fondamental, il n'est pas à exclure que des effets puissent être associés à d'autres types cellulaires. Les pneumocytes de type II et les macrophages en particulier pourraient être impliqués<sup>143</sup>. L'augmentation des marquages pro-SFPC et CD68 que nous avons constatée en immunohistologie va d'ailleurs dans ce sens. Un biais possible à cette étude concerne le système de *scoring*. C'est en effet une méthode d'analyse semi-quantitative dont une partie des mesures peut varier en fonction de l'appréciation de l'expérimentateur. Concernant le pourcentage de poumon impacté par la lésion notamment, une étude précise via Histolab® aurait peut-être permis de faire ressortir des différences sensibles, ici masquées par l'attribution d'un score. D'autre part, bien que nous ayons essayé de prendre en compte les paramètres importants relatifs au développement de la fibrose, il est possible que celui-ci ne soit pas parfait. Néanmoins, une mesure plus quantitative de la fibrose tissulaire par l'intensité de la coloration au trichrome de Masson via Histolab® sur les échantillons 23 semaines n'a pas démontré de différence significative sur le degré de fibrose entre les souris PAI-1flx/flx et les souris PAI-1 KOendo, confirmant les résultats obtenus par le score semi-quantitatif. Globalement, l'utilisation d'un plus grand nombre de paramètres, l'attribution d'un poids plus important à certains d'entre eux ou encore la mesure de paramètres plus précis pourrait peut-être permettre de mettre en évidence des différences que nous n'avons pas pu voir au cours de nos travaux.

En conclusion de cette première étude il semblerait que le rôle joué par PAI-1 vis-à-vis du développement des lésions radiques soit non-seulement dépendant de l'organe étudié mais également de plusieurs compartiments cellulaires. Au niveau pulmonaire les cellules

endothéliales ne sont pas en contact avec un compartiment souche clairement défini comme pour l'intestin, il est possible que ce point ait une importance non négligeable. Ainsi, comme il a été démontré au sein du laboratoire, l'inactivation de PAI-1 dans l'endothélium protège en particulier les cellules épithéliales intestinales progénitrices et limite la perte des cryptes<sup>11</sup>. De même, l'inactivation similaire de Hey2 protège le compartiment souche lors d'une exposition corps entier à 12 Gy via la réduction de l'apoptose des cellules épithéliales progénitrices et l'augmentation du nombre de cryptes survivantes à 3 jours (Mintet et al., 2017, voir Annexe). On voit ainsi qu'il semble exister un lien fort entre les compartiments endothélial et souche au niveau des cryptes intestinales. Dans le poumon l'absence de compartiment souche a proprement parlé pourrait donc être un frein à la protection de l'organe par la modulation de la réponse endothéliale. D'autre part, il est à noter qu'au niveau pulmonaire les cellules endothéliales sont en contact direct avec les pneumocytes de type I au sein de la barrière alvéolo-capillaire. Or, ces derniers sont connus pour être particulièrement radiosensibles<sup>98</sup>. La perte de ces cellules pourrait donc possiblement perturber les cellules endothéliales et bloquer un éventuel effet de celles-ci. Cependant, certaines études parviennent tout de même à démontrer un effet bénéfique de la protection des cellules endothéliales vis-à-vis du développement des lésions radiques pulmonaires. Une injection intraveineuse précoce de bFGF chez des souris C3H/HeJ, dont le thorax a été irradié à 16 Gy, inhibe ainsi presque totalement l'apoptose endothéliale au niveau des capillaires sanguins et réduit la perméabilité de ces derniers. L'aspect majeur de cette étude est que cette protection de l'endothélium est corrélée avec une diminution importante des lésions radiques. Il semblerait donc que l'injection intraveineuse de bFGF bloque un événement précoce fondamentalement impliqué dans la mise en place des lésions pulmonaires radio-induites<sup>107</sup>. Une autre étude met pour sa part en avant le potentiel du 2-méthoxyestradiol, un inhibiteur de HIF-1 $\alpha$ . Cette molécule a démontré la capacité à bloquer *in vivo* la transition endothélio-mésenchymateuse radio-induite ainsi qu'à limiter l'accumulation de collagène, luttant par conséquent contre le développement de la fibrose radique pulmonaire<sup>80</sup>. A la vue de ces travaux, l'endothélium semble donc jouer un rôle important dans le développement des lésions radiques pulmonaires, bien que celui-ci se semble par impliquer PAI-1.

#### **4. Caractérisation des lésions après irradiation pulmonaire en conditions stéréotaxiques**

Depuis plusieurs années l'irradiation en conditions stéréotaxiques connaît un véritable gain d'intérêt en clinique. Cette démocratisation se traduit ainsi également au sein des activités des laboratoires de recherche s'intéressant aux effets secondaires des radiothérapies. Des changements drastiques dans la taille des volumes de tissus sains irradiés, des doses totales et des doses par fraction utilisées sont en particulier observables. Pour illustrer cela, cinq appareils permettant l'irradiation des rongeurs en conditions stéréotaxiques ont récemment été acquis en France, dont un à l'IRSN. Nous sommes cependant les premiers à nous intéresser à l'utilisation d'un modèle d'irradiation pulmonaire en arc-thérapie chez la souris. Nous avons ainsi observé l'apparition d'une lésion sévère (patch) dès deux semaines après irradiation avec présence d'une forte altération du parenchyme pulmonaire (avec perte des structures alvéolaires) et d'un important infiltrat de cellules immunitaires (neutrophiles et macrophages). Un œdème alvéolaire affectant la majorité du poumon ipsilatéral a également été mis en évidence. Que ce soit au sein du poumon ipsilatéral ou contralatéral, un épaississement des septa alvéolaires est mis en évidence. Au cours du temps, une réduction du patch est observable par scanner dès le premier mois après irradiation. De façon concomitante, on note de plus une résorption de l'œdème. Le parenchyme pulmonaire reste cependant fortement altéré que ce soit dans le patch lésionnel ou en dehors. Des dépôts de collagènes importants sont d'autre part observés par la coloration au Trichrome de Masson. La dose et le volume d'irradiation choisis permettent donc comme souhaité l'induction d'une fibrose. L'ensemble de ces analyses valident par conséquent la bonne adéquation de notre modèle avec l'étude des pathologies radiques pulmonaires.

L'œdème ipsilatéral se caractérise par le comblement des alvéoles par un exsudat de liquide séreux en flaque, contenant quelques bulles d'air, macrophages et parfois polynucléaires. Ces troubles pulmonaires peuvent avoir deux origines différentes. Les œdèmes pulmonaires cardiogéniques (ou hémodynamiques) sont la conséquence d'une augmentation de la pression sanguine dans la circulation pulmonaire en cas d'insuffisance du ventricule gauche. Dans nos conditions, la dose moyenne au cœur est de 4 Gy, soit une dose très inférieure à celles délivrées dans les études s'intéressant aux conséquences cardiaques des irradiations thoraciques (12 à 20 Gy)<sup>144</sup>. Néanmoins, la dose moyenne au cœur calculée par le logiciel de plan de traitement ne donne pas d'idée sur les volumes cardiaques recevant de fortes doses, et leur localisation (coronaires, aorte, ventricules, valves). Des calculs sont en

cours pour avoir une idée de ces paramètres. Une étude fonctionnelle pourrait aussi nous éclairer sur les possibles conséquences de notre modèle sur la physiologie cardiaque. Enfin, la résorption totale de l'œdème huit semaines après irradiation nous laisse à penser que l'œdème n'est probablement pas d'origine hémodynamique. En effet, une insuffisance ventriculaire gauche suffisamment sévère pour créer un œdème pulmonaire a vraisemblablement peu de chances de se résoudre spontanément. L'autre possibilité est que l'œdème soit d'origine lésionnelle, notamment via la rupture de la barrière alvéolo-capillaire. Le poumon droit reçoit en effet dans notre cas une dose moyenne de 14.62 Gy (après exclusion du patch lésionnel dans les calculs). Or, une irradiation thoracique de 15 Gy est suffisante pour induire l'apoptose de 28% des pneumocytes de type I et 11% des cellules endothéliales<sup>98</sup>. Une implication des aquaporines est également envisageable. Il a effectivement été démontré qu'une dose de 17 Gy sur l'ensemble du thorax provoque la diminution d'expression de l'aquaporine 1 (exprimé par les cellules endothéliales) et une fluctuation d'expression de l'aquaporine 5 (spécifique des pneumocytes de type I)<sup>145</sup>. Il est toutefois à noter qu'aucun œdème n'a pour autant été observé lors de nos irradiations thorax entier, ni rapporté dans les différents travaux publiés dans la littérature. Seuls Sharplin et al. ont relaté la présence d'œdème en flaque dans les poumons de leurs animaux irradiés à 16 Gy<sup>146</sup>. Outre la dose reçue sur le poumon ipsilatéral, la présence de la lésion focale pourrait créer une réaction sur le reste du poumon, en dehors du volume irradié à forte dose. Cependant, aucune autre étude s'intéressant à des irradiations pulmonaires en conditions stéréotaxiques chez la souris ne semble avoir encore décrit ce phénomène. Un article de Furuuchi a évoqué la présence d'un œdème cérébral chez un patients de 55 ans traité par radiochirurgie intracrânienne<sup>147</sup>. Une augmentation de la perméabilité vasculaire, de l'hypoxie, la sécrétion de molécules pro-inflammatoires et de VEGF, induits par des dommages au niveau des cellules endothéliales, semblent en être la cause. D'autres travaux sont nécessaires dans notre modèle pour comprendre les causes de cet œdème ipsilatéral. Aucune donnée clinique sur un tel phénomène n'a été publiée à ce jour après traitement d'une tumeur pulmonaire en conditions stéréotaxiques. En revanche les radiographies pulmonaires chez l'Homme peuvent montrer des opacifications en verre dépoli en dehors du PTV. On peut enfin se poser la question de l'impact que pourrait avoir un œdème ipsilatéral, même transitoire, sur le fonctionnement pulmonaire immédiat mais également sur la sensibilité du poumon face à diverses agressions bactériennes ou virales a posteriori. Ceci serait un sujet intéressant à développer en recherche préclinique.

A la vue de la sévérité de ces lésions tissulaires, nous avons émis l'hypothèse que la fonction pulmonaire devait en être impactée. Pour évaluer cette déficience potentielle nous avons décidé de mettre en place un protocole d'activité forcée via l'utilisation d'un tapis de course. Comme attendu les performances réalisées par les animaux deux semaines après exposition aux rayonnements ionisants sont significativement réduites. Cependant, alors qu'une diminution du volume lésionnel suivi par scanner et une résorption de l'œdème sont constatés pour les temps plus tardifs, les performances physiques n'en restent pas moins altérées. Nous avons par conséquent décidé de réaliser également des analyses histologiques des poumons de certaines souris ayant participé à ce test. Après l'étude des colorations hématoxyline-éosine-safran, nous avons tenté d'établir une possible corrélation entre différents paramètres et les performances réalisées par les animaux. Aucune corrélation directe n'a pu être mise en évidence quant à l'impact de la taille du patch lésionnel ou de l'œdème. Nos mesures mettent cependant en exergue un impact majeur de l'épaisseur des septa alvéolaires. Il semblerait ainsi que la diminution des performances physiques mesurée après irradiation soient principalement due à la restructuration globale du parenchyme pulmonaire et notamment à l'épaississement des septa alvéolaires. Ce test présente toutefois plusieurs limites. Il faut tout d'abord veiller à ne pas entraîner les animaux lors des tests d'habituation. Le protocole doit ainsi être suffisamment représentatif de l'exercice pour que les animaux réalisent correctement les tests par la suite, sans qu'un effet d'entraînement puisse pour autant biaiser les mesures. Il faut donc que cette phase soit répétée deux fois, sans que les séances soient trop longues et ni trop intenses. Le second inconvénient dans notre cas est que ce test n'est pas directement dédié à l'étude des capacités pulmonaires. La perte de performance peut ainsi être liée à une altération directe, certes des poumons, mais également des fonctions cardiaque et/ou musculaire. Bien que les muscles moteurs ne soient pas irradiés, une perturbation du système cardio-vasculaire à cause de l'irradiation n'est par contre pas à exclure. L'irradiation cardiaque est connue pour être à l'origine d'altérations anatomiques de celui-ci et de troubles de sa fonction. Une dose au cœur de 16 Gy induit ainsi une hypertrophie cardiaque à l'origine d'une réduction de la fraction d'éjection<sup>148</sup>. Ces troubles ont été démontrés comme étant dose-dépendants<sup>149</sup>. Le cœur recevant une dose moyenne d'environ 4 Gy dans notre étude, il paraît peu probable que de telles altérations puissent entrer en jeu. Néanmoins et comme évoqué plus haut, nous n'avons pas de données sur les volumes ni la localisation recevant les plus fortes doses, de telles informations pourraient apporter des précisions sur les possibles conséquences cardiaques de notre modèle d'irradiation. Pour avoir

des données pulmonaires plus précises, un dispositif optionnel de calorimétrie peut être ajouté au tapis pour suivre en temps réel l'évolution de la consommation d'O<sub>2</sub> et de la production de CO<sub>2</sub>. Cette possibilité a été testée au cours de cette thèse mais les résultats préliminaires obtenus n'étant pas satisfaisants, nous avons décidé de ne pas acquérir un tel dispositif, le coût supplémentaire étant important. Enfin, la troisième limite de cette expérimentation est sa sensibilité. Bien qu'elle nous ait permis de mettre en évidence une corrélation entre l'irradiation des poumons et une diminution des capacités pulmonaires, le test peut cependant manquer de précision pour obtenir des informations plus nuancées.

Pour aller plus loin et préciser ces observations, l'utilisation de la pléthysmographie est envisageable. Comme décrit au Chapitre III.2, cette technique permet de mesurer les variations d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> au sein d'une enceinte étanche dans laquelle est placé l'animal. Cela nous permettrait de nous intéresser aux capacités pulmonaires de nos souris au repos avant et après irradiation. Une collaboration a récemment été envisagée dans cette optique mais n'a pu être réalisée pour des raisons pratiques. Il est cependant prévu de nous intéresser très prochainement à l'étude des mitochondries comme reflet indirect de l'oxygénation du sang par les poumons. En effet, les muscles gastrocnémiens de nos animaux ont été prélevés et congelés de façon à permettre la quantification des mitochondries par immunohistologie. Les mesures seront faites prochainement. Si la fonction pulmonaire au repos est suffisamment perturbée pour induire une mauvaise oxygénation du sang, des différences en termes de nombre et de taille des mitochondries devraient être détectées. Ces organites correspondent en effet au composant cellulaire où se déroule la chaîne respiratoire qui permet la production de l'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule à partir d'O<sub>2</sub>. De façon similaire, nous avons d'ores et déjà réalisé des dosages du lactate sanguin avant et après chaque test à l'effort, de façon à étudier le métabolisme anaérobie des animaux. Ces tests se sont toutefois révélés décevants en terme de fiabilité, les résultats étant très variables et peu reproductibles. Dans la littérature, une étude porte sur l'utilisation de la technique d'oscillations forcées pour investiguer l'effet d'une irradiation dose unique de 90 Gy via un collimateur 3 mm x 3 mm (faisceau unique au lieu d'une arc-thérapie) sur la fonction pulmonaire. Leurs résultats mettent comme nous en évidence une détérioration de celle-ci. Cela est la preuve qu'une dose ablative délivrée par radiothérapie en conditions stéréotaxiques peut avoir des conséquences importantes à la fois d'un point de vue histologiques mais également fonctionnel<sup>150</sup>.

Hormis les analyses histologiques et fonctionnelles, des profils d'expression génique ont été réalisés sur les patch irradiés et les poumons ipsilatéraux de souris HIF-1 $\alpha$  KOendo et HIF-1 $\alpha^{\text{flx/flx}}$ . Des souris HIF-1 $\alpha^{\text{flx/flx}}$  non-irradiées ont servi de contrôles. Le *clustering* hiérarchique permet de mettre en évidence trois groupes. Le premier rassemble les patchs et poumons ipsilatéraux au temps J14, le second est similaire au premier mais pour le temps 20 semaines après irradiation et le dernier correspond aux souris non-irradiées. On note que les patchs lésionnels sont à chaque fois groupés avec le reste du poumon droit. Cela démontre que bien que notre modèle permette de cibler un volume restreint, l'irradiation impacte l'ensemble du poumon sur le plan de l'expression génique. Cela n'est cependant pas surprenant à la vue de l'inflammation et de l'altération globale du poumon ipsilatéral en histologie. Il pourrait ainsi être possible que l'inflammation, l'hypoxie et le stress oxydatif mis en jeu par cette agression sévère du poumon puisse déclencher un profil d'expression génique global. Il est à noter que même si les patchs et poumons ipsilatéraux ont tendance à être regroupés ensemble sur la *heat map* aux deux temps (2 et 20 semaines), des différences apparaissent cependant entre eux lorsqu'on s'intéresse aux gènes individuellement. Nous sommes toutefois freinés par une limite de notre modèle évoquée plus tôt dans cette discussion. Bien que ne recevant pas la dose maximale, l'ensemble du poumon ipsilatéral est tout de même exposé à des doses plus ou moins fortes. En effet, nous avons déterminé que 14.5% et 25.7% du poumon ipsilatéral (hors patch) reçoivent respectivement des doses supérieures ou égales à 30 Gy et 20 Gy. De la même façon 43.5% de ce poumon est exposé à au moins 5 Gy. La dose moyenne reçue dans ce cas est donc de 11.72 Gy. Il est ainsi difficile de discriminer l'influence du patch sur les tissus proches par rapport à la diversité des doses reçues sur l'ensemble du volume pulmonaire. Il sera malgré tout intéressant d'analyser prochainement les profils d'expression géniques du poumon gauche dans chacune de ces conditions. Le poumon contralatéral recevant des doses beaucoup moins importantes (0.3% du volume exposé à 30 Gy, 4.6% à 20 Gy, 42.7% à 5 Gy et MLD égale à 5.91 Gy), cela nous permettra de mieux comprendre les mécanismes à l'œuvre dans nos conditions. Pour rappel, il est à noter que l'ensemble de ces paramètres sont utilisés en clinique pour prédire les risques des patients à développer des pathologies pulmonaires radio-induites. Dans nos conditions, les V30, V20 et V5 sont respectivement 7.4%, 15.2% et 43.1%. La MLD est de 8.82 Gy. Cette répartition de dose en dehors du CTV est un réel problème en clinique. Comme vu en introduction, des analyses concernant le V20 et le V30 déconseillent des valeurs supérieures ou égales à respectivement 35% et 20% (tableau 2, page 39). De même une MLD supérieure à

9.5 Gy a été démontrée comme étant corrélée à une augmentation des risques de pathologies radiques<sup>113</sup>. Dans le cadre d'une irradiation en conditions stéréotaxiques, des études montrent qu'une MLD et un V20 respectivement supérieurs à 4 Gy et 4 % sont associés avec un risque accru de pneumonite radique<sup>114</sup>. Le meilleur facteur prédictif dans ce cas serait de plus le V5 du poumon contralatéral. Celui-ci ne devrait en effet pas être supérieur à 26 %<sup>151</sup>. De manière intéressante, une étude propose de définir la notion de « *Red Shell* », avec comme objectif d'unifier les principes radiobiologiques dans le contexte des irradiations en conditions stéréotaxiques. Les auteurs tentent ainsi de mettre en relation le risque de dommages aux tissus sains avec la dose totale, la dose par fraction et le volume de tissus sains concerné. Le « *Red Shell* » correspond à la zone où les tissus sains sont exposés à des doses variables inférieures à la dose clinique mais supérieures à la dose tolérée de l'organe en question, considérant l'utilisation de fortes doses par fraction<sup>152</sup>. Ce concept n'a pas eu d'échos depuis 2010 dans la bibliographie mais semble intéressant dans le cadre de notre modélisation préclinique, où nous devons être particulièrement attentifs aux volumes de tissus irradiés. En particulier, même si la décroissance de dose est rapide, des volumes importants reçoivent un certain pourcentage de la dose prescrite, et peuvent avoir un impact sur le développement des lésions pulmonaires. Des calculs sont en cours pour avoir une idée des volumes concernés pour chaque gamme de dose dans notre modèle. Enfin, le projet de thèse portant sur l'étude de l'effet du fractionnement inclut le calcul de ces différents volumes ainsi que l'établissement de courbes « iso-BED » en fonction de la dose reçue à chaque fraction. Ceci permettra ainsi d'avoir une idée des conséquences des différents protocoles sur les tissus sains.

## **5. Invalidation endothélium-spécifique de HIF-1 $\alpha$ et lésions radiques pulmonaires**

Comme abordé en introduction, HIF-1 $\alpha$  est un des acteurs moléculaires d'intérêt de notre laboratoire. De précédents travaux menés au laboratoire sur l'intestin ont effectivement démontré un effet radioprotecteur de son invalidation dans l'endothélium vis-à-vis des lésions intestinales radio-induites (Toullec et al., soumis juin 2017). Les auteurs ont tout d'abord mis en évidence une expression majoritaire de HIF-1 $\alpha$  au sein des cellules endothéliales et épithéliales intestinales chez la souris. Alors que l'invalidation spécifique de HIF-1 $\alpha$  dans le compartiment épithélial n'induit pas de protection après une irradiation localisée d'une anse intestinale à 19 Gy, une survie augmentée et des lésions réduites sont retrouvées chez les animaux invalidés pour HIF-1 $\alpha$  dans l'endothélium. De façon surprenante aucun bénéfice n'est retrouvé dans les deux cas lors d'une exposition corps entier à 13 Gy permettant de

provoquer un syndrome gastro-intestinal. Les effets radioprotecteurs observés dans le cas de l'irradiation intestinale ont été démontrés comme corrélés à une inhibition de la réponse inflammatoire, de l'hypoxie tissulaire et des dommages vasculaires. Des expérimentations *in vitro* sur des HIMECS irradiés à 10 Gy ont par la suite permis de confirmer l'impact de l'inactivation de HIF-1 $\alpha$  sur le profil pro-inflammatoire des cellules via une réduction d'expression de IL1 $\beta$ , IL8, CD44 et E-sélectine.

Au niveau pulmonaire, quelques études se sont intéressées au rôle potentiel joué par HIF-1 $\alpha$  dans le développement des fibroses radique et (majoritairement) idiopathique. Ainsi, son implication a notamment été mise en évidence via l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cadre de l'IPF<sup>74,75</sup>. La cyclosporine A a de plus démontré la capacité de permettre, via l'inhibition de HIF-1, la dédifférenciation de myofibroblastes dérivés de patients atteints d'IPF<sup>76</sup>. Dans un contexte radio-induit une expression importante de HIF-1 $\alpha$  a été retrouvée au niveau des zones lésées de poumons de rats ainsi que dans les cellules inflammatoires<sup>78</sup>. Cette hypoxie a de plus été montrée comme concomitante à de l'inflammation et du stress oxydatif, mettant ainsi en lumière un lien entre ces trois paramètres. L'utilisation d'un antioxydant (AEOL 10150) a d'ailleurs prouvé cela en démontrant un effet radioprotecteur impliquant une diminution du stress oxydatif, de HIF-1 et de ses cibles<sup>77</sup>.

Durant cette thèse nous nous sommes donc intéressés à étudier le rôle d'une inactivation de HIF-1 $\alpha$  dans l'endothélium vis-à-vis du développement de pneumopathies radiques, dans un contexte d'irradiation pulmonaire en conditions stéréotaxiques. L'objectif étant ici comme pour PAI-1 de vérifier si les connaissances acquise au niveau abdomino-pelvien sont transposables à des organes possédant une organisation et un fonctionnement totalement différents. Dans un modèle similaire d'irradiation en conditions stéréotaxiques chez la souris, bien qu'utilisant un faisceau unique au lieu d'une arc-thérapie, HIF-1 $\alpha$  a été démontré comme impliqué dans l'induction de l'endoMT et participant ainsi à la fibrose pulmonaire<sup>80</sup>. Il semblerait donc que cibler l'hypoxie soit une piste à envisager dans l'optique de lutter contre le développement de la fibrose radique pulmonaire. Peu d'effets ont cependant été mis en évidence dans notre cas via une inactivation de HIF-1 $\alpha$  dans l'endothélium (article 2). En effet, aucune différence n'a premièrement été observée concernant la sévérité des lésions, déterminée via notre méthode de *scoring*. Le volume du patch lésionnel suivi par scanner n'est pas non plus modulé par cette inactivation. Le *pool* endothélial de HIF-1 $\alpha$  ne semble donc pas être impliqué dans le développement du patch lésionnel. La dose de 90 Gy à

l'isocentre induisant des lésions très sévères, celles-ci pourraient être trop importantes pour permettre de voir des différences entre les deux lignées. Concernant le reste des poumons, peu de différences significatives sont cependant notables, bien qu'une tendance à un infiltrat neutrophilaire plus faible se dessine chez les animaux invalidés pour HIF-1 $\alpha$ . Concernant l'expression génique, aucun *clustering* différenciant les deux populations de souris n'existe. Alors qu'à deux semaines après irradiation les modulations géniques observées sont surtout la signature de l'effet de l'irradiation, des divergences sont toutefois notables lorsqu'on réalise une analyse gène par gène au temps tardif. En effet, chez les animaux HIF-1 $\alpha$  KOendo seuls deux gènes (*Avian erythroblastosis virus E26 homolog-1*, ETS1 et *Serpin Family E Member 1*, SERPINE1, gène codant pour PAI-1) ont leur expression modifiée au temps tardif par rapport aux contrôles. Au contraire, trente gènes (dont les deux évoqués précédemment) ont une expression modulée dans le cas des souris floxées. Il semblerait donc que bien qu'aucune différence ne soit observée via une comparaison directe des deux lignées, certains gènes soient modulés différemment aux temps tardifs par rapport à leurs conditions basales. Peu d'étude portant sur des expérimentations similaires sont disponibles à ce jour. L'une d'entre elles s'intéresse cependant aux variations de près de 40 000 gènes après une irradiation pulmonaire de souris en conditions stéréotaxiques (90 Gy, faisceau unique, collimateur 3 mm x 3 mm). Dans leurs conditions seuls neuf gènes ont présenté une modulation d'expression au moins égale à 2 (positivement ou négativement)<sup>153</sup>. Il aurait été intéressant de suivre ces gènes dans nos expériences mais cela n'a pu être rendu possible par la taille (et le coût) des cartes TLDA (*TaqMan Low Density Arrays*).

Globalement, l'inactivation de HIF-1 $\alpha$  spécifiquement dans l'endothélium n'a pas induit d'effet suffisamment important pour réduire la sévérité des lésions pulmonaires induites dans nos conditions. Des arguments forts sont pourtant présents dans la bibliographie sur le rôle de HIF-1 $\alpha$  dans les lésions radiques pulmonaires. De précédents travaux menés au sein du laboratoire sur les lésions radiques digestives avaient de plus donné des résultats prometteurs. De futurs travaux sont par conséquent prévus au laboratoire afin d'exploiter les échantillons prélevés qui n'ont pas été traités au cours de ce projet de thèse faute de temps, comme par exemple le poumon contralatéral. Ces expérimentations supplémentaires permettront peut-être pour leur part de mettre en évidence un effet plus important. L'avenir nous dira donc si l'hypothèse du rôle de HIF-1 $\alpha$  était valable ou non.

## **6. Perspective directe en cours au laboratoire : La sénescence endothéliale pulmonaire radio-induite**

Le rôle de l'endothélium dans l'initiation et le développement des lésions radiques aux tissus sains est bien décrit. En revanche, les mécanismes précis et les acteurs moléculaires susceptibles de représenter de nouvelles opportunités thérapeutiques ou préventives restent flous. Une des caractéristiques de la réponse des cellules endothéliales aux rayonnements ionisants est la sénescence, décrite en particulier dans le poumon irradié.

La sénescence correspond à une perte des capacités prolifératives des cellules. Bien que ne pouvant plus se diviser, les cellules sénescents restent cependant viables et métaboliquement actives. Cet état est notamment caractérisé par une morphologie altérée, la surexpression de la  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) ainsi que d'inhibiteurs du cycle cellulaire (p21<sup>Waf1</sup>, p16<sup>Ink4a</sup> et p53). Ces cellules acquièrent de plus un phénotype sécrétoire pro-inflammatoire appelé *Senescence-Associated Secretory Phenotype* (SASP). Ce sécrétome est essentiellement composé de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6), de chimiokines (IL-8), de facteurs de croissance (G-SCF, bFGF) et de protéases (MMP et PAI-1)<sup>154</sup>. La sénescence est un mécanisme physiologique associé au vieillissement des cellules. Au fur et à mesure des divisions cellulaires, les télomères présents aux extrémités des chromosomes se raccourcissent. Quand ceux-ci deviennent trop courts, la cellule arrête de se diviser. On parle dans ce cas de sénescence réplivative. Ce mécanisme permet ainsi d'éviter la perte d'informations génétiques et de prévenir le développement de cancers. La sénescence est contrôlée par deux voies de signalisation : l'axe p53-p21 qui arrête le cycle cellulaire et l'axe p16-Rb qui instaure et maintient le phénotype sénescents. Ces deux voies mettent en jeu les inhibiteurs des complexes Cycline/CDK (*Cyclin Dependent Kinase*), p21 et p16. Une fois ces complexes inactivés, le facteur de transcription Rb passe sous une forme hypo-phosphorylée activée permettant l'expression de ses gènes cibles. En condition physiologique, la voie p21 est celle jouant un rôle prédominant. Les cellules sénescents sont éliminées par les macrophages et les cellules NK (*Natural Killer*) recrutés via les molécules pro-inflammatoires du SASP.

La sénescence peut cependant également être induite par divers facteurs externes et environnementaux, dont l'exposition aux rayonnements ionisants. On parle de sénescence liée au stress. Igarashi et al ont par exemple montré que 80 à 90% des cellules endothéliales (*Bovine aortic endothelial cells*, BAECs et HUVECs) deviennent sénescents trois à cinq

jours après avoir été irradiées à une dose de 8 Gy<sup>155</sup>. D'autres études menées *in vitro* démontrent que les cellules endothéliales présentant un phénotype sénescence radio-induit possèdent des défaillances au niveau de leur capacité à réaliser l'angiogenèse. Elles ont ainsi une aptitude réduite à bourgeonner, à migrer et à envahir le Matrigel®<sup>156</sup>. Elles sont de plus à l'origine d'une importante production d'espèces réactives de l'oxygène, probablement via une stimulation des NADPH oxydases<sup>157</sup>.

D'un point de vue pathologique, l'implication de la sénescence dans l'apparition de maladies cardio-vasculaires a fait l'objet de diverses études. Ce mécanisme a ainsi en particulier été démontré comme lié au développement de l'athérosclérose et de l'hypertension artérielle<sup>158</sup>. Certaines équipes se sont alors posé la question de savoir si la sénescence pouvait également être impliquée dans l'apparition de pathologies cardio-vasculaires radio-induites. L'incapacité des cellules endothéliales sénescences à proliférer pose tout d'abord un problème vis-à-vis de l'homéostasie vasculaire et la réparation des vaisseaux endommagés. Cela pourrait ainsi induire une diminution de la densité des réseaux vasculaires au niveau des capillaires ou des artères coronaires<sup>159</sup>. Les cellules endothéliales sénescences présentent d'autre part une dérégulation de la eNOS, conduisant ainsi à une diminution de la sécrétion de monoxyde d'azote<sup>160</sup>. Ce phénomène, couplé à l'importante production d'espèces réactives de l'oxygène, peut par conséquent être à l'origine d'une altération de la biodisponibilité du NO. Cette situation a un impact délétère sur la vasodilatation et favorise l'hypertension. L'ensemble de ces événements, associés au phénotype pro-inflammatoire des cellules endothéliales sénescences, mettent en valeur le potentiel rôle délétère joué par ces cellules dans l'apparition des pathologies radiques vasculaires. Actuellement très peu de travaux sont consacrés à l'étude de la sénescence endothéliale dans les poumons irradiés. Il reste ainsi encore beaucoup de choses à découvrir concernant ce phénomène, et notamment vis-à-vis de son implication dans le développement des lésions radiques, notamment pulmonaires. Pour pallier à ce manque, un projet de thèse est actuellement en cours au sein de notre laboratoire. L'objectif de celui-ci est d'établir le rôle de la sénescence des cellules endothéliales vasculaires dans le processus physiopathologique radio-induit. Ce projet est en particulier axé sur un modèle préclinique d'irradiation pulmonaire en conditions stéréotaxiques, via l'utilisation d'un modèle transgénique KO endothélium-spécifique pour un marqueur et acteur de la sénescence.

## 7. Conclusion générale

Ce projet a démontré une notion importante en radiobiologie, à savoir que chaque organe, de par son organisation propre, répond de manière spécifique aux rayonnements ionisants. Ainsi, des acteurs moléculaires potentiels impliqués dans le développement des lésions radiques digestives ne sont pas directement transposables aux autres organes. La radiobiologie est un domaine de recherche complexe, où chaque organe doit être étudié de manière spécifique.

La difficulté majeure réside dans la modélisation préclinique des lésions tissulaires. L'application des protocoles cliniques de radiothérapie génère très peu d'effets secondaires. Les modèles précliniques de lésions radiques aux tissus sains associées aux radiothérapies en champ large de type 3D-CRT ou IMRT sont bien validés. En revanche, l'évolution constante des techniques de radiothérapie et de la précision balistique, avec en particulier l'émergence de la radiothérapie en conditions stéréotaxiques, force les laboratoires de recherche en radiobiologie à revoir les concepts de base de la radioprotection des tissus sains. Les volumes de tissus sains irradiés sont très réduits, mais les protocoles hypofractionnés utilisant des doses ablatives exposent les tissus sains en dehors du PTV à des irradiations pour lesquelles nous n'avons pas ou peu de recul clinique. Même si la décroissance de dose est rapide en dehors du PTV, des volumes non-négligeables de tissus sains sont exposés à plusieurs fractions dépassant largement 2 Gy, et donc à une BED qui peut dépasser leur seuil de tolérance. Il est ainsi impératif dans les prochains projets de considérer non seulement la lésion radio-induite proprement dite mais également tous les volumes pulmonaires recevant des fractionnements à BED élevée, et également les volumes pulmonaires exposés à des doses totales faibles.

Enfin, la question que l'on peut se poser pour les futurs travaux sur ces modèles d'irradiation stéréotaxique est de savoir ce que représente vraiment la zone lésée. Contrairement à la radiothérapie qui a pour volume cible une tumeur, la zone cible dans nos modèles et dans tous les travaux utilisant ce genre de modèles est du tissu sain. On peut ainsi légitimement se poser la question sur les différences lésionnelles au niveau des tissus sains pulmonaires que l'on observerait si on ciblait par stéréotaxie une tumeur *in situ* en arc-thérapie. Une seule étude a pour l'instant utilisé un modèle de tumeur pulmonaire chez la souris (avec de multiples foyers tumoraux) comme cible pour des irradiations en conditions stéréotaxiques délivrant 3 x 20 Gy. L'objectif de cette étude était de valider le ciblage et le

contrôle des foyers tumoraux grâce au SARRP. Les auteurs ne se sont par conséquent pas du tout intéressés aux conséquences sur les tissus sains. Il serait intéressant pour nous de disposer d'un modèle de tumeur pulmonaire chez la souris (si possible présentant un seul foyer tumoral) et de suivre les conséquences sur les tissus sains pulmonaires de différents protocoles d'irradiation.

## Annexe 1 : Réponse aux rayonnements ionisants des souris déficientes en PAI-1

---

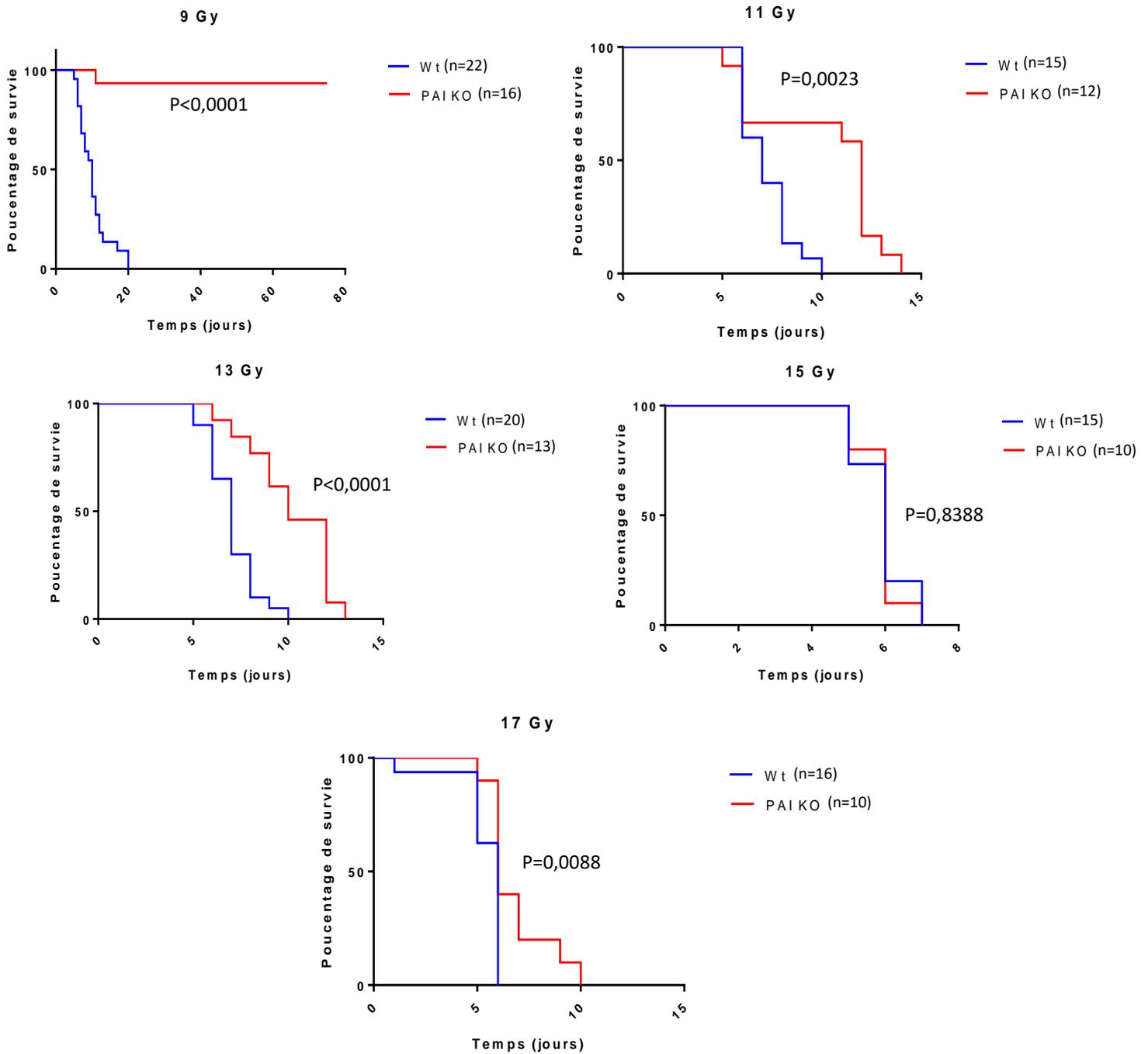
Ces résultats sont issus d'expérimentations préliminaires du laboratoire. Des souris sauvages (Wt, C57BL/6J, PAI-1<sup>+/+</sup>) et knock-out pour PAI-1 (PAI-1<sup>-/-</sup>) issues des Laboratoires Charles River sont exposées corps entier à différentes doses de rayonnements ionisants : 9, 11, 13, 15 et 17 Gy, administrées en une fraction unique, grâce à une source de Cobalt 60 (ICO4000, <sup>60</sup>Co 4000 Ci ; 1,4 Gy/min ; IRSN). Ces doses d'exposition génèrent un syndrome aigu d'irradiation, essentiellement par l'atteinte des compartiments hématopoïétique et digestif. La participation du compartiment digestif est de plus en plus forte, et la mort des animaux de plus en plus rapide, au fur et à mesure que la dose augmente. L'irradiation corps entier et l'établissement de courbes de survie permet de mettre rapidement en évidence une différence de radiosensibilité entre deux souches d'animaux ou un effet radioprotecteur ou radiosensibilisant d'un agent pharmacologique par le décalage des courbes vers la gauche (effet néfaste) ou vers la droite (effet protecteur).

Les graphiques de la figure 26 représentent les courbes de survie des souris PAI-1<sup>+/+</sup> et PAI-1<sup>-/-</sup> après les différentes doses d'exposition et montrent globalement que la déficience en PAI-1 protège les souris du syndrome aigu d'irradiation, de manière certaine pour les doses de 9, 11 et 13 Gy (données non publiées).

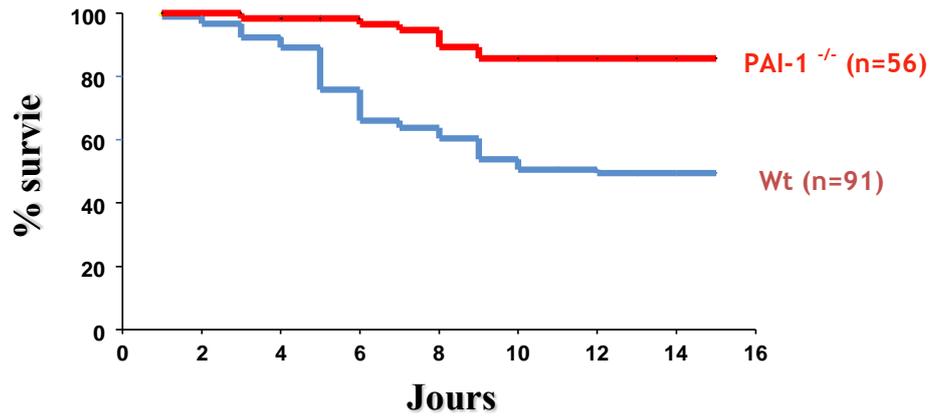
Suite à ces observations, le laboratoire a utilisé un modèle d'irradiation localisée de l'intestin grêle. Une anse digestive est extériorisée par chirurgie puis exposée à une dose unique de 19 Gy (<sup>60</sup>Co, 1.4 Gy/min). Ce modèle est connu pour générer une inflammation aiguë (1 à 2 semaines) puis le développement d'une fibrose en 6 semaines. Ce modèle est associé à une mortalité aiguë des animaux de l'ordre de 50% dans les 10 premiers jours après exposition. La figure 27 reprend toutes les données de survie des animaux utilisés au laboratoire, et montre que les souris PAI-1<sup>-/-</sup> sont protégées des lésions radio-induites dans ce modèle d'irradiation localisée du grêle<sup>161-163</sup>.

Pour aller plus loin, le laboratoire a mis en place un modèle de souris déficientes en PAI-1 spécifiquement au niveau du compartiment endothélial, grâce au système CreLoxP (souris PAI-1 KOendo, voir annexe 2). Ces souris ont été irradiées localement au niveau de l'intestin grêle. La courbe de survie figure 28 montre que l'inactivation de PAI-1

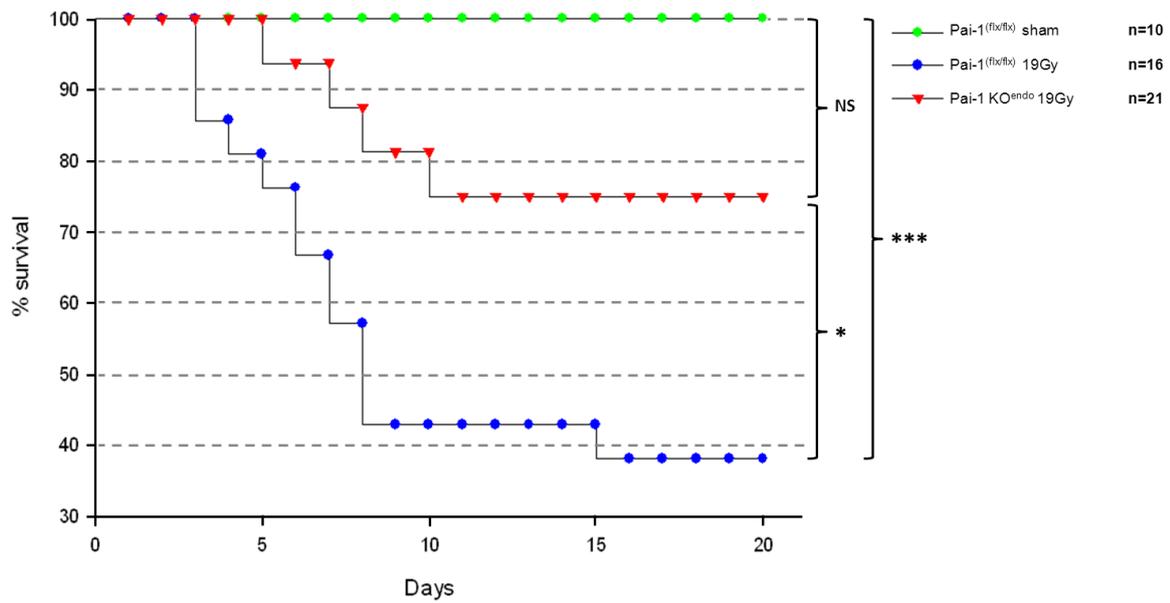
spécifiquement dans le compartiment endothélial suffit à protéger les souris des dommages intestinaux radio-induits en améliorant de manière significative leur survie<sup>11</sup>.



**Figure 26 :** Courbes de survie des animaux contrôle et PAI-1 KO après des irradiations corps entier à 9, 11, 13, 15 et 17 Gy



**Figure 27 :** Courbes de survie des animaux contrôle et PAI-1 KO après une irradiation localisée d'une anse intestinale à 19 Gy

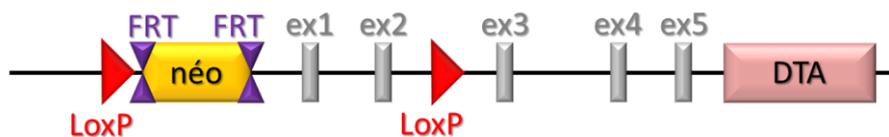


**Figure 28 :** Courbes de survie des souris PAI-1flx/flx et PAI-1 KOendo après une irradiation localisée d'une anse intestinale à 19 Gy

## Annexe 2 : Génération des souris déficientes en PAI-1 spécifiquement dans le compartiment endothélial : Système CreLoxP

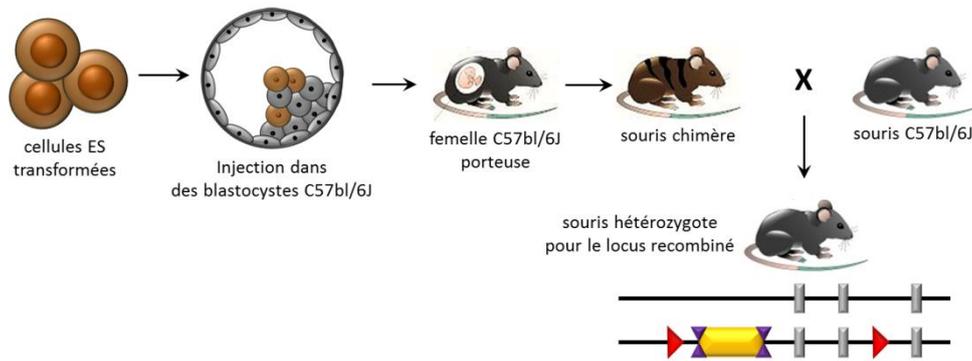
### 1. Génération des souris PAI-1flx/flx

La première étape nécessaire à la génération de souris invalidées spécifiquement pour PAI-1 au niveau de l'endothélium fut de générer des souris floxées pour le gène SERPINE1 en collaboration avec la société genOway. Suite à des études *in silico* il fut décidé par notre laboratoire d'insérer les sites LoxP en 5' de l'exon 1 pour le premier, et entre les exons 2 et 3 pour le second (figure 29).



**Figure 29 :** Structure du transgène inséré dans le vecteur cible

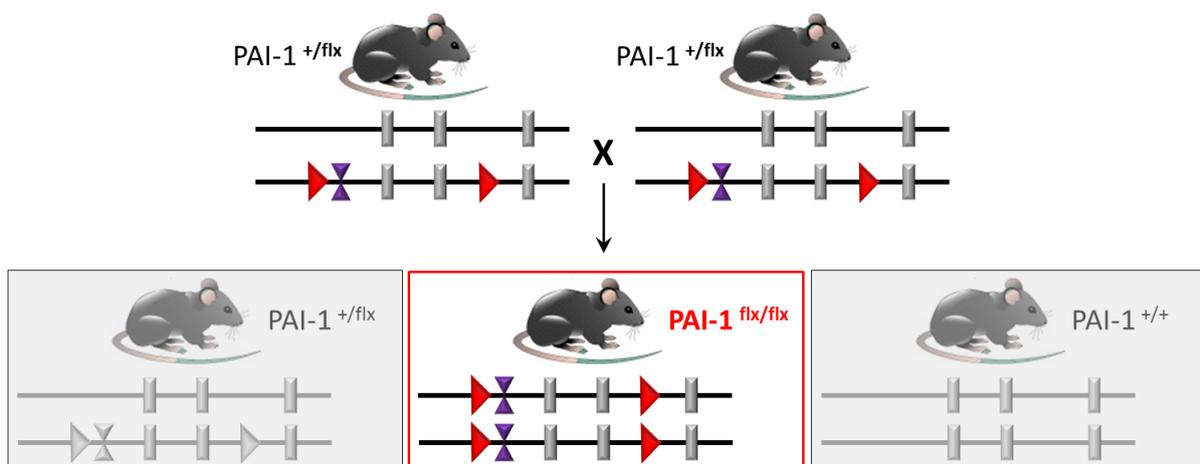
La seconde étape fut ensuite de créer le vecteur nécessaire à la recombinaison homologue dans les cellules Embryonnaires Souches (ES). Ce plasmide contenait plusieurs éléments. On retrouvait ainsi à l'intérieur les deux séquences LoxP encadrant les exons 1 et 2 ainsi qu'une cassette de résistance à la néomycine nécessaire à la sélection des cellules ES ayant intégré le vecteur. La présence de deux séquences FRT (Flippase Recognition Target) entourant cette cassette permet par la suite l'élimination de celle-ci lors des croisements avec des souris exprimant l'enzyme Flp (Flippase). Enfin, une cassette de sensibilité à la toxine diphtérique A (DTA, Diphtheria Toxin), située en 3' de l'exon 5, permet pour sa part une sélection négative des cellules ES ayant intégré le transgène par insertion aléatoire.



**Figure 30 : Obtention des souris chimères puis hétérozygotes pour le locus recombiné SERPINE1**

Les étapes suivantes consistent en la transfection du plasmide dans les cellules ES par électrolocation puis la sélection des clones d'intérêt grâce à la présence des cassettes évoquées précédemment. Les clones ainsi sélectionnés furent injectés dans des blastocystes de souris C57bl/6J, eux-mêmes implantés dans des femelles porteuses pseudo-gestantes (figure 30). Parmi les descendants présentant un phénotype chimère noir/agouti, les deux ayant un chimérisme de 80% furent ensuite croisés avec des souris C57bl/6J pour obtenir des animaux hétérozygotes pour le locus recombiné de SERPINE1. La présence du transgène a été confirmée par PCR chez quatre d'entre eux.

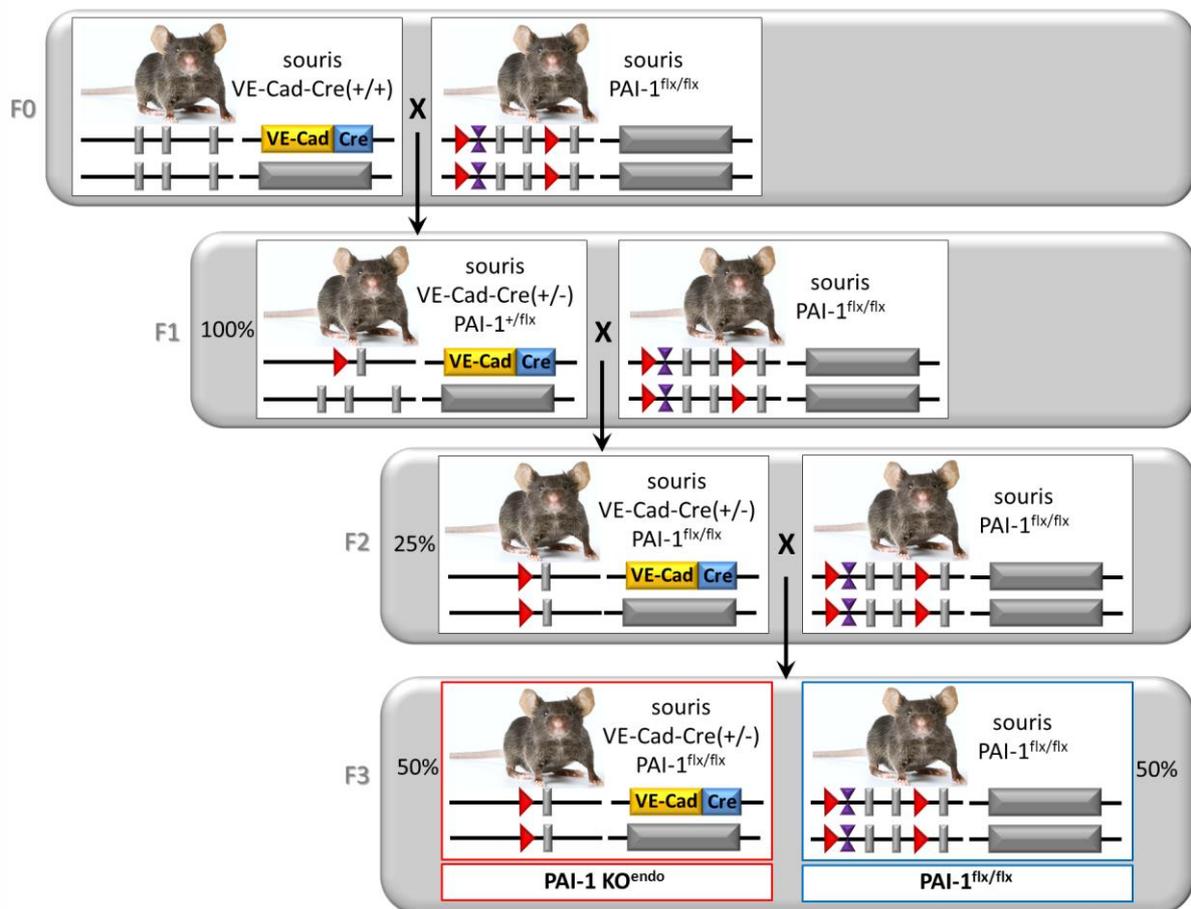
Enfin, la cassette de sélection à la néomycine fut excisée afin d'obtenir des souris hétérozygotes pour le locus floxé de SERPINE1 qui furent elles-mêmes croisées entre elles pour donner naissance aux individus homozygotes PAI-1<sup>flx/flx</sup> (figure 31)



**Figure 31 : Obtention des souris PAI-1flx/flx**

## 2. Génération des souris PAI-1 KOendo

Les souris déficientes pour le gène SERPINE1 spécifiquement dans l'endothélium sont issues du croisement des animaux PAI-1<sup>flx/flx</sup> avec des animaux VE-Cad-Cre<sup>+/-</sup>. Plusieurs générations ont cependant été nécessaires avant d'en arriver là. Les souris VE-Cad-Cre<sup>+/+</sup> ont tout d'abord été croisées avec les souris PAI-1<sup>flx/flx</sup> précédemment générés. En F1, des individus hétérozygotes pour la recombinase Cre et PAI-1 ont ainsi été obtenus avant d'être eux-mêmes à nouveau croisés avec des souris PAI-1<sup>flx/flx</sup>. Ce croisement a ainsi permis d'obtenir les souris PAI-1 KOendo selon un ratio de 1/4. Ces animaux sont désormais régulièrement mis en couples avec des souris PAI-1<sup>flx/flx</sup> afin d'augmenter ce ratio et ainsi obtenir dans leurs descendance 50% d'individus PAI-1 KOendo et 50% de PAI-1<sup>flx/flx</sup> (figure 32)



**Figure 32 :** Stratégie de croisement permettant l'obtention des souris PAI-1 KOendo

Cette stratégie de reproduction présente certains avantages. D'une part, le transgène Cre est présent à l'état hétérozygote chez les souris PAI-1 KOendo, ce qui est suffisant pour induire les événements de recombinaison au niveau du gène SERPINE1 tout en limitant le risque d'anomalies phénotypiques liées à l'insertion aléatoire du transgène. D'autre part, les animaux PAI-1 KOendo et leur contrôle PAI-1flx/flx qui sont obtenus en génération F3 proviennent de la même portée, et sont tous utilisables en expérimentation.

Il est à noter que les souris invalidées spécifiquement pour HIF-1 $\alpha$  au sein de l'endothélium sont obtenues selon la même stratégie à partir d'individus HIF-1 $\alpha$ <sup>flx/flx</sup> déjà existant chez Jackson.

## Bibliographie

---

1. Stone, H. B., Coleman, C. N., Anscher, M. S. & McBride, W. H. Effects of radiation on normal tissue: Consequences and mechanisms. *Lancet Oncol.* **4**, 529–536 (2003).
2. Yun, Z. & Sweasy, J. B. *Biomolecular action of ionizing radiation.* *Radiation research* **171**, (2009).
3. Poli, G. & Parola, M. Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 287–305 (1997).
4. Xu, B. & Kastan, M. B. Analyzing cell cycle checkpoints after ionizing radiation. *Methods Mol. Biol.* **281**, 283–92 (2004).
5. Turesson, I. *et al.* Biological Response to Radiation Therapy. *Acta Oncol. (Madr).* **42**, 92–106 (2003).
6. Prise, K. M., Schettino, G., Folkard, M. & Held, K. D. New insights on cell death from radiation exposure. *Lancet Oncol.* **6**, 520–528 (2005).
7. Gulbins, E. & Kolesnick, R. Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene* **22**, 7070–7 (2003).
8. Thames & Hendry. *Fractionation in Radiotherapy.* (1987).
9. Bentzen, S. M. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 702–713 (2006).
10. Mintet, E. *et al.* Identification of Endothelial-to-Mesenchymal Transition as a Potential Participant in Radiation Proctitis. *Am. J. Pathol.* **185**, 2550–2562 (2015).
11. Rannou, E. *et al.* In vivo evidence for an endothelium-dependent mechanism in radiation-induced normal tissue injury. *Sci Rep* **5**, 15738 (2015).
12. Rubin, P., Johnston, C. J., Williams, J. P., McDonald, S. & Finkelstein, J. N. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **33**, 99–109 (1995).
13. Okunieff, P. *et al.* Mechanism and modification of gastrointestinal soft tissue response to radiation: Role of growth factors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **62**, 273–278 (2005).
14. Ong, Z. Y. *et al.* Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis. *Radiat. Oncol.* **5**, 22 (2010).
15. Mollà, M. & Panés, J. Radiation-induced intestinal inflammation. **13**, 3043–3046 (2007).
16. Panés, J., Anderson, D. C., Miyasaka, M. & Neil Granger, D. Role of leukocyte-endothelial cell adhesion in radiation-induced microvascular dysfunction in rats. *Gastroenterology* **108**, 1761–1769 (1995).
17. Schaeue, D. & McBride, W. H. Links between Innate Immunity and Normal Tissue Radiobiology. *Radiat. Res.* **173**, 406–417 (2010).
18. François, A., Milliat, F., Guipaud, O. & Benderitter, M. Inflammation and immunity in radiation damage to the gut mucosa. *Biomed Res. Int.* **2013**, (2013).

19. McBride, D. S. and W. H. Links between Innate Immunity and Normal Tissue Radiobiology. **173**, 406–417 (2011).
20. Italiani, P. & Boraschi, D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Front. Immunol.* **5**, 1–22 (2014).
21. Chiang, C. S. *et al.* Compartmental responses after thoracic irradiation of mice: Strain differences. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **62**, 862–871 (2005).
22. Tiemessen, M. M. *et al.* CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *PNAS* **104**, 19446–19451 (2007).
23. Dörthe Schaeue, Evelyn L. Kachikwu, and W. H. M. Dörthe Schaeue<sup>1</sup>, Evelyn L. Kachikwu, and William H. McBride. **100**, 130–134 (2012).
24. Liauw, S. L., Connell, P. P. & Weichselbaum, R. R. New paradigms and future challenges in radiation oncology: an update of biological targets and technology. *Sci. Transl. Med.* **5**, 173sr2 (2013).
25. Hill, R. P., Rodemann, H. P., Hendry, J. H., Roberts, S. A. & Anscher, M. S. Normal tissue radiobiology: From the laboratory to the clinic. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **49**, 353–365 (2001).
26. Hennequin, C. & Dubray, B. Le rapport alpha/bêta revisité à l'heure de l'hypofractionnement. *Cancer/Radiothérapie* **17**, 344–348 (2013).
27. Joiner, M. C. *et al.* Hypersensitivity to very-low single radiation doses : Its relationship to the adaptive response and induced radioresistance. **358**, 171–183 (1996).
28. Dutreix, J., Cosset, J. M. & Girinsky, T. [Biological equivalency of high single doses used in intraoperative irradiation]. *Bull. Cancer Radiother.* **77**, 125–134 (1990).
29. Ritter, M. Rationale, conduct, and outcome using hypofractionated radiotherapy in prostate cancer. *Semin. Radiat. Oncol.* **18**, 249–256 (2008).
30. Fowler, J. & King, C. R. Don't squeeze hypofractionated schedules into too-short overall times. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **75**, 323–325 (2009).
31. Bentzen, S. M. *et al.* Bioeffect modeling and equieffective dose concepts in radiation oncology--terminology, quantities and units. *Radiother. Oncol.* **105**, 266–268 (2012).
32. Dale, R. G. The application of the linear-quadratic dose-effect equation to fractionated and protracted radiotherapy. *Br. J. Radiol.* **58**, 515–528 (1985).
33. Toledano, A. *et al.* La chimiothérapie concomitante de la radiothérapie augmente la toxicité tardive après chirurgie conservatrice du cancer du sein Concurrent administration of adjuvant chemotherapy and radiotherapy after breast-conservative surgery enhances late toxicities. *Cancer/Radiothérapie* **10**, 158–167 (2006).
34. Bentzen, S. M. & Overgaard, J. Patient-to-patient variability in the expression of radiation-induced normal tissue injury. *Semin. Radiat. Oncol.* **4**, 68–80 (1994).
35. Guide des procédures de radiothérapie externe 2007.
36. Noël, G., Antoni, D., Barillot, I. & Chauvet, B. Délinéation des organes à risque et contraintes dosimétriques Delineation of organs at risk and dose constraints. *Cancer / Radiother.* **20**, S36–

S60 (2016).

37. Grills, I. S. *et al.* Potential for reduced toxicity and dose escalation in the treatment of inoperable non-small-cell lung cancer: A comparison of intensity-modulated radiation therapy (IMRT), 3D conformal radiation, and elective nodal irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **57**, 875–890 (2003).
38. Karlsson, B., Kihlstrom, L., Lindquist, C., Ericson, K. & Steiner, L. Radiosurgery for cavernous malformations. *J. Neurosurg.* **88**, 293–297 (1998).
39. Lippitz, B. *et al.* Stereotactic radiosurgery in the treatment of brain metastases: The current evidence. *Cancer Treat. Rev.* **40**, 48–59 (2014).
40. Observatoire national de la radiothérapie - Situation fin 2013 et évolution depuis 2009 - 2015.
41. Onishi, H. *et al.* Stereotactic hypofractionated high-dose irradiation for stage I nonsmall cell lung carcinoma: clinical outcomes in 245 subjects in a Japanese multiinstitutional study. *Cancer* **101**, 1623–1631 (2004).
42. Lefebvre, L., Dore, M. & Giraud, P. [New techniques and potential benefits for radiotherapy of lung cancer]. *Cancer Radiother.* **18**, 473–479 (2014).
43. Heal, C. *et al.* Definitive Treatment of Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer with Stereotactic Ablative Body Radiotherapy in a Community Cancer Center Setting. *Front. Oncol.* **5**, 146 (2015).
44. Kelley, K. D. *et al.* Medically inoperable peripheral lung cancer treated with stereotactic body radiation therapy. *Radiat. Oncol.* **10**, 120 (2015).
45. Lagerwaard, F. J. *et al.* Outcomes of stereotactic ablative radiotherapy in patients with potentially operable stage I non-small cell lung cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **83**, 348–353 (2012).
46. Kang, K. H., Okoye, C. C., Patel, R. B., Siva, S. & Biswas, T. Complications from Stereotactic Body Radiotherapy for Lung Cancer. 981–1004 (2015). doi:10.3390/cancers7020820
47. Chang, J. Y. *et al.* Significant reduction of normal tissue dose by proton radiotherapy compared with three-dimensional conformal or intensity-modulated radiation therapy in Stage I or Stage III non-small-cell lung cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **65**, 1087–1096 (2006).
48. Philip I. Aaronson, Jeremy P. T. Ward, M. J. C. *The Cardiovascular System at a Glance. John Wiley & Sons* (2012). doi:10.1097/00005768-200004000-00025
49. Claesson-Welsh, L. Vascular permeability—the essentials. *Ups. J. Med. Sci.* **120**, 135–143 (2015).
50. Wang, J., Boerma, M., Fu, Q. & Hauer-Jensen, M. Significance of endothelial dysfunction in the pathogenesis of early and delayed radiation enteropathy. *World J. Gastroenterol.* **13**, 3047–3055 (2007).
51. Abdel Gader, A. G. M. Tissue Factor Pathway Inhibitor [Tfpi]: A Natural Coagulation Inhibitor and Potential Therapeutic Agent – A Review. *J. Taibah Univ. Med. Sci.* **4**, 1–15 (2009).
52. van Deel, E. D. *et al.* Vasomotor control in mice overexpressing human endothelial nitric oxide

- synthase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H1144-53 (2007).
53. Rabelink, T. J. *et al.* Effects of endothelin-1 on renal function in humans: Implications for physiology and Pathophysiology. *Kidney Int.* **46**, 376–381 (1994).
  54. Gryglewski, R. J., Dembinska-Kieć, A. & Korbut, R. A possible role of thromboxane A2 (TXA2) and prostacyclin (PGI2) in circulation. *Acta Biol. Med. Ger.* **37**, 715–23 (1978).
  55. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular Mechanisms and and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298–307 (2011).
  56. Lorant, D. E. *et al.* Inflammatory roles of P-selectin. *J. Clin. Invest.* **92**, 559–570 (1993).
  57. McHale, J. F., Harari, O. A., Marshall, D. & Haskard, D. O. TNF-alpha and IL-1 sequentially induce endothelial ICAM-1 and VCAM-1 expression in MRL/lpr lupus-prone mice. *J. Immunol.* **163**, 3993–4000 (1999).
  58. Paris, F. *et al.* Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* **293**, 293–7 (2001).
  59. Schuller, B. W. *et al.* Selective irradiation of the vascular endothelium has no effect on the survival of murine intestinal crypt stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 3787–3792 (2006).
  60. Quarmby, S., Hunter, R. D. & Kumar, S. Irradiation induced expression of CD31, ICAM-1 and VCAM-1 in human microvascular endothelial cells. *Anticancer Res.* **20**, 3375–3381 (2000).
  61. Quarmby, S. *et al.* Irradiation induces upregulation of CD31 in human endothelial cells. *Arter. Thromb Vasc Biol* **19**, 588–597 (1999).
  62. Gaugler, M. H., Vereycken-Holler, V., Squiban, C. & Aigueperse, J. PECAM-1 (CD31) is required for interactions of platelets with endothelial cells after irradiation. *J. Thromb. Haemost.* **2**, 2020–2026 (2004).
  63. Heckmann, M., Douwes, K., Peter, R. & Degitz, K. Vascular Activation of Adhesion Molecule mRNA and Cell Surface Expression by Ionizing Radiation. *Exp. Cell Res.* **238**, 148–154 (1998).
  64. Hallahan, D. E. & Virudachalam, S. Intercellular adhesion molecule 1 knockout abrogates radiation induced pulmonary inflammation (ionizing radiation lung inflammation knockout mice). *Med. Sci.* **94**, 6432–6437 (1997).
  65. Sievert, W. *et al.* Late proliferating and inflammatory effects on murine microvascular heart and lung endothelial cells after irradiation. *Radiother. Oncol.* **117**, 376–381 (2015).
  66. Carmeliet, P. *et al.* Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. II. Effects on hemostasis, thrombosis, and thrombolysis. *J. Clin. Invest.* **92**, 2756–2760 (1993).
  67. Diebold, I., Kraicun, D., Bonello, S. & Görlach, A. The ‘PAI-1 paradox’ in vascular remodelling. *Thromb. Haemost.* **100**, 984–991 (2008).
  68. Senoo, T. *et al.* Suppression of plasminogen activator inhibitor-1 by RNA interference attenuates pulmonary fibrosis. *Thorax* **65**, 334–340 (2010).
  69. Citrin, D. E. *et al.* Role of type II pneumocyte senescence in radiation-induced lung fibrosis. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 1474–1484 (2013).

70. Chung, E. J. *et al.* Truncated Plasminogen Activator Inhibitor-1 Protein Protects from Pulmonary Fibrosis Mediated by Irradiation in a Murine Model. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **94**, 1163–1172 (2016).
71. Liu, B. *et al.* Genetic variants in the plasminogen activator inhibitor-1 gene are associated with an increased risk of radiation pneumonitis in lung cancer patients. *Cancer Med.* **6**, 681–688 (2017).
72. Kapitsinou, P. P. & Haase, V. H. Molecular Mechanisms of Ischemic Preconditioning in the Kidney. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* ajprenal.00224.2015 (2015). doi:10.1152/ajprenal.00224.2015
73. Ueno, M. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 mediates TGF- $\beta$ -induced PAI-1 production in alveolar macrophages in pulmonary fibrosis. *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* **300**, L740–L752 (2011).
74. Kim, K. K. *et al.* Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 13180–13185 (2006).
75. Guo, L., Xu, J. M., Liu, L., Liu, S. M. & Zhu, R. Hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition is involved in bleomycin-induced lung fibrosis. *Biomed Res. Int.* **2015**, (2015).
76. Yamazaki, R. *et al.* Antifibrotic effects of cyclosporine A on TGF- $\beta$ 1-treated lung fibroblasts and lungs from bleomycin-treated mice: role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *FASEB J.* fj.201601357R (2017). doi:10.1096/fj.201601357R
77. Rabbani, Z. N. *et al.* Low molecular weight catalytic metalloporphyrin antioxidant AEOL 10150 protects lungs from fractionated radiation. *Free Radic. Res.* **41**, 1273–1282 (2007).
78. Rabbani, Z. N. *et al.* Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  signaling in fractionated radiation-induced lung injury: role of oxidative stress and tissue hypoxia. *Radiat. Res.* **173**, 165–74 (2010).
79. Gauter-Fleckenstein, B. *et al.* Early and late administration of MnTE-2-PyP5+ in mitigation and treatment of radiation-induced lung damage. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 1034–43 (2010).
80. Choi, S. H. *et al.* A hypoxia-induced vascular endothelial-to-mesenchymal transition in development of radiation-induced pulmonary fibrosis. *Clin. Cancer Res.* **21**, 3716–3726 (2015).
81. Arciniegas, E., Frid, M. G., Douglas, I. S. & Stenmark, K. R. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* **293**, L1–L8 (2007).
82. Zeisberg, E. M. *et al.* Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat. Med.* **13**, 952–961 (2007).
83. Pohunek, P. Development, structure and function of the upper airways. *Paediatr. Respir. Rev.* **5**, 2–8 (2004).
84. Brand-Saberi, B. E. M. & Schäfer, T. Trachea: Anatomy and physiology. *Thoracic Surgery Clinics* **24**, 1–5 (2014).
85. Minnich, D. J. & Mathisen, D. J. Anatomy of the trachea, carina, and bronchi. *Thorac. Surg. Clin.* **17**, 571–585 (2007).

86. Guillot, L. *et al.* Alveolar epithelial cells: Master regulators of lung homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 2568–2573 (2013).
87. Castranova, V., Rabovsky, J., Tucker, J. H. & Miles, P. R. The alveolar type II epithelial cell: A multifunctional pneumocyte. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **93**, 472–483 (1988).
88. Hussell, T. & Bell, T. J. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 81–93 (2014).
89. Flesch, J. D. & Dine, C. J. Lung volumes: measurement, clinical use, and coding. *Chest* **142**, 506–510 (2012).
90. Bates, J. H. T. & Irvin, C. G. Measuring lung function in mice: the phenotyping uncertainty principle. *J. Appl. Physiol.* **94**, 1297–306 (2003).
91. Oostveen, E. *et al.* The forced oscillation technique in clinical practice: methodology, recommendations and future developments. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* **22**, 1026–1041 (2003).
92. Almeida, C. *et al.* The Role of Alveolar Epithelium in Radiation-Induced Lung Injury. *PLoS One* **8**, 1–9 (2013).
93. Trott, K. R., Herrmann, T. & Kasper, M. Target cells in radiation pneumopathy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **58**, 463–469 (2004).
94. Rube, C. E. *et al.* Irradiation induces a biphasic expression of pro-inflammatory cytokines in the lung. *Strahlentherapie und Onkol.* **180**, 442–448 (2004).
95. Fleckenstein, K. *et al.* Temporal Onset of Hypoxia and Oxidative Stress After Pulmonary Irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* (2007). doi:10.1016/j.ijrobp.2006.12.056
96. Vujaskovic, Z. *et al.* Radiation-induced hypoxia may perpetuate late normal tissue injury. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **50**, 851–855 (2001).
97. Carnesecchi, S. *et al.* A key role for NOX4 in epithelial cell death during development of lung fibrosis. *Antioxid Redox Signal* **15**, 607–619 (2011).
98. Yu Zhang, Xiuwu Zhang, M.D., Ph.D., Zahid N. Rabbani, M.D., Isabel L. Jackson, B.S., and Zeljko Vujaskovic, M.D., P. D. Oxidative Stress Mediates Radiation Lung Injury by Inducing Apoptosis. *Biophys. Chem.* **257**, 2432–2437 (2005).
99. Pan, J. *et al.* Inhibition of Bcl-2/xl with ABT-263 selectively kills senescent Type II pneumocytes and reverses persistent pulmonary fibrosis induced by ionizing radiation in mice. *Int. J. Radiat. Oncol.* 1–9 (2017). doi:10.1016/j.ijrobp.2017.02.216
100. Rubin, Philip ; Finkelstein, J. and S. D. Molecular biology mechanism in the radiation induction of pulmonary injury syndromes: interrelationship between the alveolar macrophage and the septal fibroblast. (1992).
101. Martin, M., Lefaix, J. L. & Delanian, S. TGF- $\beta$ 1 and radiation fibrosis: A master switch and a specific therapeutic target? *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **47**, 277–290 (2000).
102. Cufí, S. *et al.* Metformin against TGF $\beta$ -induced epithelial-to-mesenchymal transition (EMT): From cancer stem cells to aging-associated fibrosis. *Cell Cycle* **9**, 4461–4468 (2010).
103. Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. & Brown, R. a. Myofibroblasts and

- mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 349–63 (2002).
104. Panganiban, R. A. M., Mungunsukh, O. & Day, R. M. X-irradiation induces ER stress, apoptosis, and senescence in pulmonary artery endothelial cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **3002**, 1–12 (2012).
  105. Law, M. P. Vascular permeability and late radiation fibrosis in mouse lung. *Radiat. Res.* **103**, 60–76 (1985).
  106. Marks, L. B. *et al.* Radiation-induced lung injury. *Semin. Radiat. Oncol.* **13**, 333–345 (2003).
  107. Fuks, Z., Alfieri, A., Haimovitz-Friedman, A., Seddon, A. & Cordon-Cardo, C. Intravenous basic fibroblast growth factor protects the lung but not mediastinal organs against radiation-induced apoptosis in vivo. *Cancer J. Sci. Am.* **1**, 62–72 (1995).
  108. Santana, P. *et al.* Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* **86**, 189–199 (1996).
  109. Rieder, F., Brenmoehl, J., Leeb, S., Scholmerich, J. & Rogler, G. Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut* **56**, 130–139 (2007).
  110. Pinnix, C. C. *et al.* Predictors of radiation pneumonitis in patients receiving intensity modulated radiation therapy for Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **92**, 175–182 (2015).
  111. Emami, B. *et al.* Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **21**, 109–122 (1991).
  112. Graham, M. V *et al.* Clinical dose-volume histogram analysis for pneumonitis after 3D treatment for non-small cell lung cancer (NSCLC). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **45**, 323–9 (1999).
  113. Allen, A. M. *et al.* Fatal pneumonitis associated with intensity-modulated radiation therapy for mesothelioma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **65**, 640–645 (2006).
  114. Barriger, R. B. *et al.* A dose-volume analysis of radiation pneumonitis in non-small cell lung cancer patients treated with stereotactic body radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **82**, 457–462 (2012).
  115. Jin, H. *et al.* Dose-volume thresholds and smoking status for the risk of treatment-related pneumonitis in inoperable non-small cell lung cancer treated with definitive radiotherapy. *Radiother. Oncol.* **91**, 427–432 (2009).
  116. Bjermer, L., Cai, Y., Nilsson, K., Hellstrom, S. & Henriksson, R. Tobacco smoke exposure suppresses radiation-induced inflammation in the lung: a study of bronchoalveolar lavage and ultrastructural morphology in the rat. *Eur. Respir. J.* **6**, 1173–1180 (1993).
  117. Bhattathiri, V. N. Possible role of plasma GSH in modulating smoking related radiation pneumonitis. **51**, 291–292 (1999).
  118. Trevor J. Bledsoe, Sameer K. Nath, R. H. D. Radiation Pneumonitis. *Clin. Pulm. Med.* **17**, 218–222 (2010).
  119. Fine, a & Goldstein, R. H. The effect of transforming growth factor-beta on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **262**, 3897–3902 (1987).

120. Wrana, J. L. *et al.* TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* **71**, 1003–1014 (1992).
121. Roberts, A. B. *et al.* Is Smad3 a major player in signal transduction pathways leading to fibrogenesis? *Chest* **120**, 43S–47S (2001).
122. Lu, Z. *et al.* Transforming growth factor-beta1 small interfering RNA inhibits growth of human embryonic lung fibroblast HFL-I cells in vitro and defends against radiation-induced lung injury in vivo. *Mol. Med. Rep.* **11**, 2055–2061 (2015).
123. Marks, L. B. *et al.* Physical and biological predictors of changes in whole-lung function following thoracic irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **39**, 563–570 (1997).
124. Matthew H. Stenmark, MD, Xu-Wei Cai, MD, Kerby Shedden, P. *et al.* Combining Physical and Biologic Parameters to Predict Radiation-Induced Lung Toxicity in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Treated With Definitive Radiation Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2012). doi:10.3816/CLM.2009.n.003.Novel
125. Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death.Differ.* **10**, 45–65 (2003).
126. Piguet, P. F. *et al.* Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumour necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor. *Immunology* **77**, 510–4 (1992).
127. Sime, P. J. *et al.* Transfer of tumor necrosis factor-alpha to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor-beta1 and myofibroblasts. *Am. J. Pathol.* **153**, 825–32 (1998).
128. Sullivan, D. E., Ferris, M., Pociask, D. & Brody, A. R. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Induces Transforming Growth Factor- $\beta$  1 Expression in Lung Fibroblasts Through the Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **32**, 342–349 (2005).
129. Huang, X. W. *et al.* Antisense Oligonucleotide Inhibition of Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Protects the Liver from Radiation-Induced Apoptosis. *Clin. Cancer Res.* **12**, 2849–2855 (2006).
130. Brass, D. M., Hoyle, G. W., Poovey, H. G., Liu, J. Y. & Brody, a R. Reduced tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1 expression in the lungs of inbred mice that fail to develop fibroproliferative lesions consequent to asbestos exposure. *Am. J. Pathol.* **154**, 853–62 (1999).
131. Sun, Y. *et al.* Protective effects of ulinastatin and methylprednisolone against radiation-induced lung injury in mice. *J. Radiat. Res.* **57**, 505–511 (2016).
132. Travis, E. The sequence of histological changes in mouse lungs after total lung irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys* **15**, 345–347 (1980).
133. Ghobadi, G. *et al.* Lung irradiation induces pulmonary vascular remodelling resembling pulmonary arterial hypertension. *Thorax* **67**, 334–341 (2012).
134. Qiu, J., Li, J. & He, T. C. Endothelial cell damage induces a blood-alveolus barrier breakdown in the development of radiation-induced lung injury. *Asia. Pac. J. Clin. Oncol.* **7**, 392–398 (2011).
135. Klein, D. *et al.* Mesenchymal Stem Cell Therapy Protects Lungs from Radiation-Induced Endothelial Cell Loss by Restoring Superoxide Dismutase 1 Expression. *Antioxid. Redox Signal.*

- 5, ars.2016.6748 (2016).
136. Adams, M. J., Hardenbergh, P. H., Constine, L. S. & Lipshultz, S. E. Radiation-associated cardiovascular disease. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **45**, 55–75 (2003).
  137. Bowers, D. C. *et al.* Stroke as a late treatment effect of Hodgkin's Disease: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J. Clin. Oncol.* **23**, 6508–6515 (2005).
  138. Siva, S. *et al.* Radiotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer Induces DNA Damage Response in Both Irradiated and Out-of-field Normal Tissues. *Clin. Cancer Res.* **22**, 4817–4826 (2016).
  139. Siva, S., MacManus, M. P., Martin, R. F. & Martin, O. A. Abscopal effects of radiation therapy: A clinical review for the radiobiologist. *Cancer Lett.* **356**, 82–90 (2015).
  140. Choi, S. *et al.* A Hypoxia-Induced Vascular Endothelial-to- Mesenchymal Transition in Development of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis. **21**, 3716–3727 (2015).
  141. Alva, J. A. *et al.* VE-cadherin-cre-recombinase transgenic mouse: A tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells. *Dev. Dyn.* **235**, 759–767 (2006).
  142. Ghosh, A. K. *et al.* 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**, 1200–1209 (2010).
  143. Osterholzer, J. J. *et al.* PAI-1 promotes the accumulation of exudate macrophages and worsens pulmonary fibrosis following type II alveolar epithelial cell injury. *J. Pathol.* **228**, 170–180 (2012).
  144. Medhora, M. *et al.* Whole-thorax irradiation induces hypoxic respiratory failure, pleural effusions and cardiac remodeling. *J. Radiat. Res.* **56**, 248–260 (2015).
  145. Sun, C.-Y. *et al.* The expression of aquaporins 1 and 5 in rat lung after thoracic irradiation. *J. Radiat. Res.* **55**, 683–689 (2014).
  146. Sharplin, J. & Franko, A. J. A quantitative histological study of strain-dependent differences in the effects of irradiation on mouse lung during the intermediate and late phases. *Radiat. Res.* **119**, 15–31 (1989).
  147. Furuuchi, K., Nishiyama, A., Yoshioka, H., Yokoyama, T. & Ishida, T. Reenlargement of radiation necrosis after stereotactic radiotherapy for brain metastasis from lung cancer during bevacizumab treatment. *Respir. Investig.* **55**, 184–187 (2016).
  148. Monceau, V. *et al.* Epac contributes to cardiac hypertrophy and amyloidosis induced by radiotherapy but not fibrosis. *Radiother. Oncol.* **111**, 63–71 (2014).
  149. Mezzaroma, E. *et al.* Role of Interleukin-1 in Radiation-Induced Cardiomyopathy. *Mol. Med.* **21**, 210–8 (2015).
  150. Hong, Z.-Y., Song, K. H., Yoon, J.-H., Cho, J. & Story, M. D. An experimental model-based exploration of cytokines in ablative radiation-induced lung injury in vivo and in vitro. *Lung* **193**, 409–419 (2015).
  151. Ong, C. L., Palma, D., Verbakel, W. F. A. R., Slotman, B. J. & Senan, S. Treatment of large stage I-II lung tumors using stereotactic body radiotherapy (SBRT): Planning considerations and early toxicity. *Radiother. Oncol.* **97**, 431–436 (2010).

152. Yang, J. *et al.* Red Shell: Defining a High-Risk Zone of Normal Tissue Damage in Stereotactic Body Radiation Therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **77**, 903–909 (2010).
153. Jin, H. *et al.* Identification of radiation response genes and proteins from mouse pulmonary tissues after high-dose per fraction irradiation of limited lung volumes. *Int. J. Radiat. Biol.* **93**, 184–193 (2017).
154. Coppé, J.-P. *et al.* Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biol.* **6**, e301 (2008).
155. Igarashi, K., Sakimoto, I., Kataoka, K., Ohta, K. & Miura, M. Radiation-induced senescence-like phenotype in proliferating and plateau-phase vascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* **313**, 3326–3336 (2007).
156. Imaizumi, N., Monnier, Y., Hegi, M., Mirimanoff, R. O. & Rüegg, C. Radiotherapy suppresses angiogenesis in mice through TGF- $\beta$ RI/ALK5-dependent inhibition of endothelial cell sprouting. *PLoS One* **5**, (2010).
157. Muller, M. Cellular Senescence: Molecular Mechanisms, *In Vivo* Significance, and Redox Considerations. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 59–98 (2009).
158. Tian, X.-L. & Li, Y. Endothelial Cell Senescence and Age-Related Vascular Diseases. *J. Genet. Genomics* **41**, 485–495 (2014).
159. Baker, J. E. *et al.* Coronary Sclerosis, Degeneration of Heart. **85**, 1089–1100 (2010).
160. Minamino, T. & Komuro, I. Vascular cell senescence: Contribution to atherosclerosis. *Circ. Res.* **100**, 15–26 (2007).
161. Milliat, F. *et al.* Essential Role of Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 in Radiation Enteropathy. *Am. J. Pathol.* **172**, 691–701 (2008).
162. Abderrahmani, R. *et al.* PAI-1-dependent endothelial cell death determines severity of radiation-induced intestinal injury. *PLoS One* **7**, e35740 (2012).
163. Abderrahmani, R. *et al.* Effects of pharmacological inhibition and genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 in radiation-induced intestinal injury. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **74**, 942–948 (2009).

## **Résumé :**

La radiothérapie thoracique peut induire le développement de pneumonites aiguës et de fibroses pulmonaires. Actuellement, aucune solution efficace n'existe pour traiter ces lésions ou prévenir leur développement. La dysfonction du système vasculaire est connue pour participer au développement de lésions radiques au niveau des tissus sains. Dans l'intestin, un KO endothélial de PAI-1 protège les souris de la fibrose radio-induite. Le premier objectif de ce projet est d'explorer le rôle de PAI-1 dans l'apparition de la fibrose radique pulmonaire et d'étudier par conséquent l'importance de l'organisation tissulaire. L'irradiation thoracique de souris à 17 Gy altère sévèrement le parenchyme pulmonaire, avec un épaississement des septas alvéolaires, un infiltrat de neutrophiles et une accumulation de fibrine. L'analyse histologique révèle qu'un KO endothélial de PAI-1 aggrave les lésions à 2 et 13 semaines. Cette invalidation ne protège donc pas les animaux des dommages radiques pulmonaires. L'organisation tissulaire semble ainsi avoir un impact déterminant sur les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine des lésions. L'organisation en parallèle du poumon permet d'envisager une tolérance à de fortes doses d'irradiation et de très fortes doses par fraction sur des petits volumes. Ceci correspond au principe de la radiothérapie en conditions stéréotaxiques utilisée pour le traitement des tumeurs pulmonaires de stade précoce. De telles irradiations à une dose de 90 Gy avec un collimateur de 3 mm x 3 mm ont été réalisées chez la souris grâce à un SARRP. Les analyses histologiques montrent une perte totale des structures alvéolaires et un fort infiltrat inflammatoire au niveau de la zone cible. Un œdème est observable dans l'ensemble du poumon ipsilatéral deux semaines après irradiation bien que celui-ci se résorbe par la suite. Le poumon ipsilatéral est d'ailleurs également affecté par des altérations de structure, tel un épaississement des septa alvéolaires. Ces bouleversements se traduisent au niveau transcriptomique via la forte ressemblance des profils d'expression génique du poumon ipsilatéral et de la lésion focale. A la vue de l'ensemble de ces altérations, un test à l'effort a été réalisé pour évaluer l'impact potentiel sur la fonction pulmonaire. Les résultats mettent en évidence une diminution des performances des animaux, et donc de leurs capacités pulmonaires. Les analyses sont à approfondir au niveau du poumon contralatéral mais ces résultats démontrent l'importance de s'intéresser aux tissus sains situés hors du volume cible mais recevant des fractions variables de la dose de traitement. L'effet d'un KO endothélial de HIF-1 $\alpha$  a d'autre part été investigué sur ce modèle d'irradiation. Assez peu de différences ont globalement été remarquées par rapport aux animaux contrôles. Des travaux sont en cours pour poursuivre ces analyses et essayer d'élucider les effets protecteurs observés dans d'autres études.

**Mots clés :** Poumon, endothélium, lésions radiques, PAI-1, HIF-1 $\alpha$ , irradiation stéréotaxique

## **Abstract:**

Radiation-induced endothelial dysfunction is known to participate to the development of normal tissue damage. PAI-1 is implicated in the phenotypic changes of irradiated endothelial cells and KOendo mice are protected from radiation damage to the gut. Contrary to the digestive tract, lung is a flexible organ and this may have important consequences on its response to radiation exposure. Our first aim was to investigate in the lung the role previously demonstrated for PAI-1 in irradiated gut. In this way, whole thorax of PAI-1 KOendo and floxed mice were exposed to 17 Gy. Histological analyzes showed that PAI-1 KOendo induces a worsening of injuries at 2 and 13 weeks. Consequently, contrary to the gut no protection from radiation-induced lung damage is observed in PAI-1 KOendo mice. As opposed to the gut, in lung a better tolerance to high doses per fraction on a small volume is possible. Our second aim was to study the effects of a single high dose stereotactic irradiation on pulmonary tissues. Histological analyzes and scanner imaging show important injuries on the targeted volume. An ipsilateral edema can also be observed 2 weeks after irradiation but not at later times. Ipsilateral lung is moreover importantly damaged. A thickening of alveolar septa is notably observable. A transcriptomic analysis show important similarities between tissues from the ipsilateral lung and the focal lesion. As really highly damages have been observed in both scanner and histological analyzes, we decided to perform forced physical activity test on treadmill. A drastic decrease of maximal distance traveled has been observed from two weeks. These experiments highlighted a deficiency in respiratory function and all of these results show the importance of non-targeted irradiated pulmonary volume in the development of radiation-induced fibrosis. Effect of an endothelium-specific deletion of HIF-1 $\alpha$  has been investigated in this model of stereotactic irradiation. Only few differences have been observed between KOendo and control mice. Experiments are ongoing to elucidate the protective effect shown in others studies.

**Keywords:** Lung, endothelium, radiation-induced injuries, PAI-1, HIF-1 $\alpha$ , stereotactic irradiation