



HAL
open science

Lésions pulmonaires après irradiation stéréotaxique : modélisation préclinique et aspects radiopathologiques

Annaig Bertho

► **To cite this version:**

Annaig Bertho. Lésions pulmonaires après irradiation stéréotaxique : modélisation préclinique et aspects radiopathologiques. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS504 . tel-03139819

HAL Id: tel-03139819

<https://theses.hal.science/tel-03139819>

Submitted on 12 Feb 2021

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

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

Sorbonne Université

Ecole doctorale 394 : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire

PSE-SANTE/SERAMED/ Laboratoire de Radiobiologie des Expositions Médicales (LRMed)

Lésions pulmonaires après irradiation stéréotaxique : modélisation préclinique et aspects radiopathologiques

Présentée par

Annaïg BERTHO

Thèse de doctorat de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Dirigée par le Dr. Agnès FRANCOIS

Présentée et soutenue publiquement le 27 novembre 2019

Devant un jury composé de :

Pr. Isabelle PETROPOULOS

Dr. François PARIS

Pr. Cyrus CHARGARI

Dr. Michele MONDINI

Pr. Serge ADNOT

Dr. Anne VAN DER MEEREN

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examinatrice

You can only make as well as you can measure

Joseph Whitworth

Remerciements

Je voudrais commencer par remercier les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer le travail réalisé pendant ces trois années de thèses. Merci **Professeure Isabelle Petropoulos** pour avoir accepté de présider ce jury. Merci au **Docteur François Paris** et au **Professeur Cyrus Chargari** d'avoir accepté d'en être les rapporteurs. Merci au **Docteur Michele Mondini** et au **Professeur Serge Adnot** d'en être les examinateurs. Un merci particulier au **Docteur Anne Van Der Meeren** qui a accepté d'être examinatrice en plus d'avoir suivi ce travail de thèse depuis la première année.

Un immense merci à **Agnès** qui a dirigé ce travail de thèse. Merci de m'avoir donné ma chance, malgré une candidature tardive. Ce fut un immense plaisir de travailler avec toi pendant ces trois années. Merci pour ta disponibilité (même quand on se chamaillait avec Jérémy et Nicolas pour savoir lequel d'entre nous aller entrer dans le bureau en premier), ta bonne humeur quotidienne, tes conseils, ta gentillesse et tes « panique pas ! » qui ont beaucoup aidé ! Merci pour ton soutien et ta confiance. Merci de m'avoir encouragé en congrès, au concours 3 minutes pour une thèse, ce qui m'a permis de surmonter une partie de mon stress. J'ai beaucoup appris à tes côtés, je ne te remercierai jamais assez pour ça !

Un énorme merci également à **Fabien**, notre chef de laboratoire, pour m'avoir accueilli au sein du L3R puis du LRMed. Merci pour tes conseils et ta gentillesse mais aussi ta disponibilité, tes expressions qui m'ont bien fait rire et tes « oh putain » devant certains de mes résultats ou de mes questions. Merci pour les discussions qu'on a pu avoir en staff ou dans les couloirs. Merci pour ta confiance et ta bienveillance que tu as su étendre au sein du laboratoire.

Un merci tout spécial à **Morgane** ! L'indispensable Morgane, la topissime ! Morgane, merci pour ton implication dans ces travaux de thèse, que ce soit pour les irradiations au SARRP, la conception de lit et de collimateur ou le contouring des images scanner. 472 souris irradiées (12,744 kg de souris, merci Delphine pour l'idée de cette conversion !), soit approximativement 354 heures passées ensemble, sans oublier la fois où on a failli faire cramer le SARRP ou les moments discoboite ! Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité

malgré un planning plus que chargé. Le placard sous l'escalier me manque déjà, ce petit havre de paix où je pouvais faire mon cahier de labo ou travailler tranquillement entre deux irradiations. Merci aussi d'avoir répondu à toutes questions de curieuse sur le SARRP ou la dosimétrie. Merci pour toutes ces discussions, quel que soit le sujet, et ces moments que je n'oublierai pas !

Un grand merci aux autres membres du LRMed : **Olivier** à qui j'ai beaucoup, beaucoup demandé où était Agnès pendant 3 ans, **Vincent** pour ses conseils en culture cellulaire et son humour, **Christine** pour son humour, **Noëlle** et **Alexandra** pour leur sympathie. Pour finir, merci **Alain** pour les diverses odeurs de nourriture et pour avoir placé (même temporairement) le micro-onde à côté de la porte de mon bureau ! Je n'oublierai bien sûr pas **Valérie**, **Georges**, **Christelle** et **Claire** pour leur aide précieuse et quotidienne à la paillasse, leur disponibilité et leur gentillesse ! Merci à tous pour votre bonne humeur, votre accueil au sein du laboratoire et les nombreuses discussions en staff ou dans les couloirs et les rires à la pause-café ! Merci pour tous les bons moments partagés au cours de ces trois années. Que de bons souvenirs grâce à vous tous.

Un gigantesque merci à mes deux co-thésardes, **Alexia** et **Mariam**, sans qui ces 3 années n'auraient pas été les mêmes. J'ai eu beaucoup de chance d'avoir deux co-thésardes comme vous et je suis heureuse d'avoir partagé le bureau avec vous. Je n'oublierai pas tous les bons moments passés ensemble : au bureau, les pauses goûter, aux journées des thèses, en congrès ou en dehors et les fous rires. Nous avons survécu au 02, nous pouvons survivre à tout ! Alexia, notre experte microbiote & police d'écriture (j'espère que ça ne te fera pas mal aux yeux de lire ce texte en Times New Roman !). J'espère de tout mon cœur que tu auras un jour un four pour nous faire de bonnes tartes au maroilles. Mariam, l'experte EBR & trésorerie ! Merci pour m'avoir accueilli le premier jour, je nous revois sans nos ordinateurs, à essayer de faire de la biblio quand même. Merci aussi pour les rappels pause goûter quand j'ai trop le nez dans ce que je fais. On s'est bien amusé toutes les trois, je suis très heureuse de vous avoir rencontré et d'avoir partagé cette expérience avec vous. Bon courage pour la fin de la rédaction, mais je ne me fais pas de soucis pour vous ! Je vous souhaite le meilleur.

Merci également à **Ségo** (Sego ON FIIIIIRE/ mini prout-prout, oui, oui je n'oublie pas !) et à **Clément**. Ségo, je te lègue la lourde tâche de mettre le FIRE sur le dance floor des journées des thèses ! Je compte sur toi ! Ne stress pas trop (et c'est moi qui dit ça

...) et tout se passera bien. J'en suis sûre. Clément, j'espère qu'on se retrouvera au Hellfest en juin ! Bon courage à tous les deux pour les deux prochaines années, il n'y a pas de raison que ça se passe bien, après tout ... ;) Je pense aussi fort à mes anciens co-thésards qui m'ont accueilli à mon arrivé au laboratoire : merci à **Cyprien**, **Jérémy** et **Fred**, la team L3R ! Un merci particulier à Fred, notre grand frère de thèse, qui a supporté les trois mousquetairettes (ou les trois chipies), qui a partagé son expérience à la paillasse (encore merci pour les protocoles), qui a changé nos fonds d'écran dès qu'on avait le dos tourné et qui a aussi bien caché nos écrans, claviers, souris etc ... Merci pour ton aide, ta gentillesse, ton espièglerie, ton humour, ta bonne humeur et ton compte à rebours dès la fin de la deuxième année ! Merci aussi à Jérémy pour ses attaques de balles anti-stress (d'ailleurs, je l'ai toujours, a qui vais-je la transmettre ?!) et son accent toulousain, il faut que tu m'apprennes à prononcer bronches souches ! Merci aussi à **Amélie**, bicheeette, avec qui je partage maintenant une date de soutenance. Merci pour tous les moments partagés, les discussions et les éclats de rire. Merci aussi pour tes conseils, ils résonnent encore dans ma tête à chaque présentation. Mention spéciale à **Sandra**, notre Beyoncé, notre licorne, pour sa bonne humeur rayonnante, sa disponibilité, et tous les bons moments qu'on a pu passer à l'IRSN ou en dehors. Merci aussi pour tous les feutres et stylos de couleur (passion couleurs !). Je pense aussi aux petites nouvelles : **Lydia**, **Mallia** et **Sarah** qui débutent tout juste leur thèse. Bon courage les filles !

Je n'oublie pas tous les stagiaires passés par ici avec qui on a beaucoup partagé et ri, surtout ri, merci à tous pour votre bonne humeur : **Nicolas V** (Poussiiiiin !), **Nicolas P**, **Cyrielle** (Petit poney), **Cory** (encore merci pour les viennoiseries !), **Maxime** (encore merci pour la lyse des cellules ;)), **Fazia** (pour ses délicieuses pâtisseries maison), **Lisa** (de l'autre côté du couloir maintenant), **Anne-Charlotte** (bébé prout-prout qui va revenir, mais je ne serai plus là ☺), **Mariem** (pour toutes les discussions très intéressantes que nous avons pu avoir autour d'un café et pour tes explications mathématiques ! Bon courage pour ton master 2 !), **Edmond** (à qui je souhaite bon courage pour sa thèse !), **Cloé**, **Khadi** et **Clémence**. Je vous souhaite à tous et à toutes le meilleur pour la suite et j'espère que nos chemins se recroiseront !

Je voudrais également remercier l'ensemble des membres du **service SERAMED et SESANE (ex-SRBE)** pour leur accueil et leur bonne humeur.

Merci aussi à la team AD'i[N], AD'i[N] 2.0 et AD'i[N] 3.0 : **Nadia, Tiffany, Fred, Jacques, Ekeo, Alexia** et **Mariam** bien sûr mais aussi **Céline S., Ségo, Kossi** et **Hugues**. Je suis très contente de tout ce qu'on a pu faire avec l'AD'i[N] et d'avoir partagé ça avec vous ! Merci également à tous les doctorants qui ont participé à nos événements. J'en profite pour remercier **Gauzelin** et **Céline D.** pour leur implication auprès des thésards et de l'AD'i[N].

Merci également à **Yoann** pour les irradiations à ALPHEE et toutes les discussions qu'on a pu avoir, à la cantine ou autour d'un café. Merci aussi au **GSEA** : **Delphine, Amandine, Romain, Sébastien** et aux autres pour leur soutien, leur disponibilité et leurs conseils précieux sur les animaux. Mention spéciale à **Romain** qui a supporté mes petites souris, pas tous les jours faciles, pendant deux ans. Merci aussi à **Mélanie** pour son aide au début de ma thèse.

Merci également à **Chloé** pour les croissants, m&m's, les carambars et autres petits gâteaux portugais. Merci également pour la verrerie et les instruments toujours impeccables. Merci **Véronique** pour ta disponibilité et ton aide dans toutes les démarches administratives. Merci également à **Stéphanie** pour sa bonne humeur et son soutien en congrès. Merci à vous deux ainsi qu'à Sandra pour tout ce que vous apportez (ou avez apporté) au service. J'en profite pour remercier **Marc** pour m'avoir accueilli au sein de son service.

Je voudrais également remercier tous les copains thésards de l'IRSN : **Tiffany, Nadia, Lucie, Ekoe, Jacques, Manon J., Manon B., Alexis, Benjamin, Valentin, Marion, Kossi, Hugues, Lucie, Alice, Céline S., Nicolas R., Rémi, Sophia, Flomin** ... etc. Désolée si j'en oublie.

Un grand merci à **mes parents et à ma sœur** qui m'ont toujours soutenu, encouragé et qui m'ont appris à me battre pour atteindre mes objectifs. Merci. Je vous aime.

Pour finir, merci à **mon chéri** qui a supporté les hauts et les bas de ces trois années de thèse, qui m'a soutenu et calmé quand il le fallait. Merci d'être là pour moi.

Merci à vous tous, vous avez fait de ces trois années de thèses une aventure inoubliable.

Sommaire

Remerciements	3
Sommaire	7
Publications & communications	10
Table des abréviations	12
Table des illustrations & tableaux	15
Avant-propos	17
Etat de l'art	20
Chapitre I : Anatomie & histologie pulmonaire	21
1. Divisions morphologiques des poumons	22
2. L'arbre bronchique	23
3. L'alvéole pulmonaire & la barrière alvéolo-capillaire	26
a. Les pneumocytes	28
b. Le surfactant	30
c. Les échanges gazeux	31
d. Les cellules endothéliales	32
e. Les macrophages	33
Chapitre II : Pathologies pulmonaires	36
1. Les pathologies bronchiques	37
a. La bronchopneumopathie chronique obstructive	37
b. L'asthme	39
2. Les pathologies interstitielles	40
a. La fibrose pulmonaire idiopathique	41
b. La sarcoïdose	43
3. Les cancers broncho-pulmonaires	43
a. Les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules	44
b. Les cancers broncho-pulmonaires à petites cellules	45
Chapitre III : Histoire de la prise en charge des cancers broncho-pulmonaires	47
1. La chirurgie	48
2. La radiothérapie normofractionnée : des débuts à aujourd'hui	50

3. La radiothérapie stéréotaxique	56
Chapitre IV : Le poumon & la radiothérapie stéréotaxique	63
1. Le poumon : un bon candidat pour la radiothérapie stéréotaxique	64
2. Les organes à risques en radiothérapie stéréotaxique thoracique	65
3. Les contraintes dosimétriques aux organes à risque	68
4. Le cas particulier des tumeurs broncho-pulmonaires centrales	70
5. Les volumes cibles en radiothérapie stéréotaxique	73
6. Les séquelles cliniques : pneumopathie radique & fibrose pulmonaire radio-induite	76
Chapitre V : Outils diagnostiques, pronostiques & prise en charge thérapeutique de la pneumopathie radique	87
1. Diagnostic de la pneumopathie radique	88
2. Marqueurs sériques des lésions pulmonaires radio-induites	92
3. Facteurs de prédisposition à la pneumopathie radique après radiothérapie stéréotaxique	94
4. Prise en charge thérapeutique des lésions pulmonaires radio-induites	99
Chapitre VI : Radiobiologie des doses ablatives	105
1. Les 5Rs de la radiobiologie	106
a. Réparation des dommages à l'ADN	106
b. Réoxygénation	107
c. Redistribution dans le cycle cellulaire	109
d. Régénération	110
2. Le fractionnement en radiothérapie	112
3. Les modèles prédictifs en radiobiologie	115
4. Réponse à l'hypofractionnement sévère	124
Problématique et objectifs	131
Résultats	133
Preclinical model of arc therapy stereotactic ablative lung irradiation in the mouse: volume and dose effects	134
Etude de l'effet du fractionnement de la dose en conditions stéréotaxiques en arc thérapie chez la souris : une étude <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	165
Discussion & perspectives	185
Avant-propos	186
1. Pertinence de notre modèle préclinique d'irradiation stéréotaxique pulmonaire en arc- thérapie chez la souris	190
2. Effet du volume d'irradiation	197
3. Effet de la dose totale	207

4. Effet du fractionnement de la dose	213
5. Modèle d'irradiation stéréotaxique pulmonaire avec tumeur	219
6. Effet de la dose par fraction sur différentes lignées cellulaires pulmonaires	222
7. Perspective directe au laboratoire : implication des macrophages dans le développement des lésions pulmonaires radio-induites	230
Conclusion générale	233
Annexe	236
1. Modélisation préclinique de l'irradiation stéréotaxique pulmonaire en arc-thérapie, guidée par l'image, associée à un logiciel de planification du traitement chez la souris C57bl/6	237
a. Etude de l'effet du volume d'irradiation	239
b. Etude de l'effet de la dose totale	242
c. Etude de l'effet du fractionnement de la dose	245
2. Liste des gènes mesurés in vivo	247
3. Liste des gènes mesurés in vitro	248
Bibliographie	250

Publications & Communications

Publications

Bertho A, Dos Santos M, Buard V, Paget V, Guipaud O, Tarlet G, Milliat F, François A. Preclinical model of arc therapy stereotactic ablative lung irradiation in the mouse : volume and dose effects. Soumis

Soysouvanh F, Benadjaoud M, Dos Santos M, Mondini M, Lavigne J, **Bertho A**, Buard V, Tarlet G, Adnot S, Deutsch E, Guipaud O, Paget V, François A, Milliat F. Stereotactic lung irradiation in mice promotes long-term senescence and lung injury. Soumis.

Communications orales

Bertho A, Dos Santos M, Buard V, Paget V, Guipaud O, Tarlet G, Milliat F, François A. Lésions pulmonaires après irradiation stéréotaxique : modélisation préclinique et aspects radiopathologiques. 13^{ème} Colloque International de Radiobiologie Fondamentale et Appliquée, Lyon, France, 2017.

Bertho A, Dos Santos M, Buard V, Paget V, Guipaud O, Tarlet G, Milliat F, François A. Lésions pulmonaires après irradiation stéréotaxique : modélisation préclinique et aspects radiopathologiques. Journées des Thèses de l'IRSN, Annecy, France, 2018

Bertho A, Dos Santos M, Buard V, Paget V, Guipaud O, Tarlet G, Milliat F, François A. Lésions pulmonaires après irradiation stéréotaxique : modélisation préclinique et aspects radiopathologiques. Journées des Thèses de l'IRSN, La Grande Motte, France, 2019

Bertho A, Dos Santos M, Buard V, Paget V, Guipaud O, Tarlet G, Milliat F, François A. Lésions pulmonaires après irradiation stéréotaxique : modélisation préclinique et aspects radiopathologiques. 12^{ème} congrès national de radioprotection, La Rochelle, France, 2019

Bertho A, Dos Santos M, Buard V, Paget V, Guipaud O, Tarlet G, Milliat F, François A. Lung injuries after stereotactic irradiation : preclinical modelling and radiopathological aspects. 15th congress of International Radiation Protection Association, Seoul, Corée du Sud, 2020

Communications affichées

Bertho A, Dos Santos M, Buard V, Paget V, Guipaud O, Tarlet G, Milliat F, François A. Lésions pulmonaires après irradiation stéréotaxique : modélisation préclinique et aspects radiopathologiques. Journées des Thèses de l'IRSN, Carry-Le-Rouet, France, 2017

Bertho A, Dos Santos M, Buard V, Paget V, Guipaud O, Tarlet G, Milliat F, François A. Lung injuries after stereotactic irradiation : preclinical modelling and radiopathological aspects. Doctoral School Days, Paris, France, 2017

Bertho A, Dos Santos M, Buard V, Paget V, Guipaud O, Tarlet G, Milliat F, François A. Lésions pulmonaires après irradiation stéréotaxique : modélisation préclinique et aspects radiopathologiques. Journée du Club des Jeunes de la Société Française de Radioprotection, Paris, France, 2018

Bertho A, Dos Santos M, Buard V, Paget V, Guipaud O, Tarlet G, Milliat F, François A. Lung injuries after stereotactic irradiation : preclinical modelling and radiopathological aspects. Doctoral School Days, Paris, France, 2018

Bertho A, Dos Santos M, Buard V, Paget V, Guipaud O, Tarlet G, Milliat F, François A. Lésions pulmonaires après irradiation stéréotaxique : modélisation préclinique et aspects radiopathologiques. 29^{ème} congrès de la société française de radiothérapie oncologique, Paris, France, 2018

Bertho A, Dos Santos M, Buard V, Paget V, Guipaud O, Tarlet G, Milliat F, François A. Lung injuries after stereotactic irradiation : preclinical modelling and radiopathological aspects. Doctoral School Days, Paris, France, 2019

Bertho A, Dos Santos M, Buard V, Paget V, Guipaud O, Tarlet G, Milliat F, François A. Lung injuries after stereotactic irradiation : preclinical modelling and radiopathological aspects. International Congress of Radiation Research, Manchester, United Kingdom, 2019

Prix & Distinctions

Prix Jeune Chercheur Henri Jammet de la Société Française de Radioprotection : Bertho A, Dos Santos M, Buard V, Paget V, Guipaud O, Tarlet G, Milliat F, François A. Lésions pulmonaires après irradiation stéréotaxique : modélisation préclinique et aspects radiopathologiques. 12^{ème} congrès national de radioprotection, La Rochelle, France, 2019

Table des abréviations

μCT	Micro computed tomography	CTC	Common Toxicity Criteria
3D-CRT	Three-dimensional conformal radiation therapy	CTCAE	Common terminology Criteria for Adverse Events
4D-CT	Four-dimensional computed tomography	CTLA4	Antigène 4 des lymphocytes cytotoxiques
ACE	Angiotensin Converting Enzyme	CTV	Clinical Target Volume
ACOS	Asthma and chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome	CVF	capacité vitale forcée
ACTH	Adrenocorticotrophic Hormone	CXCL2	CXC-Chemokine Ligand 2
ADH	Antidiuretic Hormone	DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
ADN	Acide Désoxyribonucléique	D_{max}	Dose maximale
ALF	Alveolar Lining Fluid	D_{moy}	Dose moyenne
ALK	Anaplastic lymphoma kinase	EGF	Epidermal Growth Factor
α-SMA	Alpha Smooth Muscle Actin	EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
Arg-1	Arginase 1	EMR1	EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1
ARN	Acide Ribonucléique	EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
aSMase	Acid Sphingomyelinase	ENaC	Epithelial Sodium Channel
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated	EndoMT	Endothelial to mesenchymal transition
ATR	Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related Protein	ENG	Endoglin
BED	Biological Effective Dose	eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
BNC1	Basonuclin1	EORTC	European Organism for Reasearch and Treatment of Cancer
BPCO	Bronchopneumopathie Chronique Obstructive	EPB4.2	Erythrocyte Membrane Associated Protein Band 2.4
BSMC	Bronchial Smooth Muscle Cells	EQD2	Dose équivalente à 2 Gy
CBCT	Cone Beam Computed Tomography	ERMAP	Erythroblast Membrane Associated Protein
CBNPC	Cancer Bronchopulmonaire Non à Petites Cellules	FDG	Fluorodésoxyglucose
CBPC	Cancer Bronchopulmonaire à Petites Cellules	FGF	Fibroblast growth factor
CCSP	Club Cell Secretory Protein	FPI	Fibrose Pulmonaire Idiopathique
CD200	Cluster of Differentiation 200	GDF2	Growth Differentiation Factor 2
CD200R3	Cluster of Differentiation 200 Receptor 3	GFP	Green Fluorescent Protein
CD35	Cluster of Differentiation 35	GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
CD47	Cluster of Differentiation 47	GPx	Glutathione Peroxidase
CDK	Cyclin-Dependent Kinase	GSH	Glutathion réduit
CDKI	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor	GS-SG	Glutathion oxydé
CIDEC	Cell Death Inducing DFFA like Effector C	GTV	Gross Tumor Volume
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité	Gy	Gray
CO₂	Dioxyde de carbone	H₂O	Monoxyde de dihydrogène
CSF-1	Colony Stimulating Factor 1	H₂O₂	Dioxyde de dihydrogène
CSFR1	Colony Stimulating Factor Receptor 1	HLA	Human Leukocyte Antigen
CSM	Cellule Souche Mésoenchymateuse	HMVEC-L	Human Lung Microvascular Endothelial Cells

HOXC4	Homeobox4	O₂	Dioxygène
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule	OAR	Organes à risque
ICRU	International Commission on Radiation Units & Measurements	OMS	Organisation Mondiale de la Santé
IgE	Immunoglobine E	ORL	Oto-Rhino-Laryngologie
IGRT	Image Guided Radiation Therapy	PACO₂	Pression Partielle de CO ₂
IL-1	Interleukine 1	PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor type 1
IL-10	Interleukine 10	PAO₂	Pression Partielle en O ₂
IL-13	Interleukine 13	PD1	Programmed Death 1
IL-33	Interleukine 33	PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
IL-4	Interleukine 4	PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
IL-5	Interleukine 5	PET-scan	Positon Emission Tomography
IL-6	Interleukine 6	PPAR-γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ
IL-8	Interleukine 8	PR	Pneumopathie Radique
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique	PRV	Planning Organ At Risk Volume
ITV	Internal Target Volume	PTV	Planning Target Volume
kV	Kilo Volt	RCMI	Radiothérapie Conformationnelle avec Modulation d'Intensité
LINAC	Linear Accelerator	RH	Recombinaison Homologue
LMNB1	Lamin B1	ROS	Reactive Oxygen Species
LPS	Lipopolysaccharide	RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
Lth2	Lymphocyte T Helper de type 2	SAEC	Small Airway Epithelial Cells
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1	SARRP	Small Animal Radiation Research Platform
MEC	Matrice Extracellulaire	SASP	Senescence Associated Secretory Phenotype
Med-DRA	Medical Dictionnary for Regulatory Activities	SERPINE	Serine Proteinase Inhibitor
miR-21	Micro ARN 21	SERPINE1	Serine Proteinase Inhibitor 1
miR-34a	Micro ARN 34a	SFED	Dose équivalente à une seule fraction
MLC	Multi Leaf Collimator	SFRO	Société Française de Radiothérapie Oncologique
MLQ	Modèle Linéaire Quadratique	Sft-PA	Surfactant Protein A
MLQg	Modèle Linéaire Quadratique généralisé	Sft-PB	Surfactant Protein B
MLQL	Modèle Linéaire Quadratique Linéaire	Sft-PC	Surfactant Protein C
MMP	Matrix MetalloProteinases	Sft-PD	Surfactant Protein D
MMP-9	Matix MetalloProteinase 9	Sft-PG	Surfactant associated protein 2
MMT	Mesenchymal to Mesenchymal Transition	Sft-PH	Surfactant associated protein 3
MIP-1α	Macrophage Inflammatory Protein 1α	SIRP-α	Signal Regulatory Protein Alpha
MV	Méga Volt	SNP	Single Nucleotide Polymorphism
N₂	Diazote	SPACE	Stereotactic Precision And Conventional radio-therapy Evaluation
NFκB	Nuclear Factor Kappa B	TGF-β	Transforming Growth Factor Bêta
NHBE	Normal Human Bronchial Epithelial Cells	TGF-β1	Transforming Growth Factor Bêta sous unité 1
NHEJ	Non-Homologous End-Joining	TGFβR	Transforming Growth Factor Bêta Receptor
NHLF	Normal Human Lung Fibroblast	TIMP	Tissue Inhibitor of MetalloProteinase
NO	Monoxyde d'azote	TLR	Toll Like Receptor
NOS	Nitric Oxyde Synthase	TNF	Tumor Necrosis Factor
NSD	Nominal Single Dose	Treg	Lymphocyte T régulateurs

USA	United States of America
USC	Universal Survival Curve
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
Ve-Cad	Vascular Endothelial Cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VMAT	Radiothérapie avec Modulation d'intensité Volumétrique par Arc-Thérapie
vWF	Von Willebrand Factor
V_{XGy}	Volume ayant reçu X Gy

Table des illustrations et tableaux

Figure 1 : L'arbre bronchique	24
Figure 2 : Schéma des différentes tuniques des voies aériennes	24
Figure 3 : L'alvéole pulmonaire	27
Figure 4 : Remodelage de l'épithélium respiratoire dans la bronchopneumopathie chronique obstructive	38
Figure 5 : Modèle de pathogénèse proposé pour la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI)	42
Figure 6 : Classification des cancers broncho-pulmonaires	45
Figure 7 : Evarts Ambrose Graham, chirurgien thoracique américain, pionnier des résections pulmonaires	49
Figure 8 : Article de Victor Despeigne publié dans le Lyon Médical le 26 juillet 1896	51
Figure 9 : Note manuscrite de Claudius Regaud où il explique que la loi de Bergonié et Tribondeau est inexacte	52
Figure 10 : Les différents volumes définis lors de la planification du traitement en radiothérapie conventionnelle	54
Figure 11 : Dispositif d'asservissement respiratoire lors de radiothérapie pulmonaire : la respiration bloquée	56
Figure 12 : Appareils de radiothérapie stéréotaxique	58
Figure 13 : Positionnement et technique d'asservissement respiratoire (compression abdominale) en radiothérapie stéréotaxique pulmonaire	61
Figure 14 : La « No fly zone » en radiothérapie stéréotaxique pulmonaire : une zone de 2 cm autour de l'arbre trachéobronchique	71
Figure 15 : Plan de traitement en radiothérapie stéréotaxique	75
Figure 16 : Mécanismes physiopathologiques des lésions pulmonaires radio-induites : la pneumopathie radique et la fibrose pulmonaire radio-induite	86
Figure 17 : Les différents motifs de modifications précoces du parenchyme pulmonaire après irradiation stéréotaxique	89
Figure 18 : Les différents motifs de modifications tardives du parenchyme pulmonaire après irradiation en conditions stéréotaxiques	90
Figure 19 : Les facteurs de risque de la pneumopathie radique	96
Figure 20 : Ré-oxygénation de la fraction de cellules tumorales hypoxiques après irradiation	108
Figure 21 : Redistribution des cellules dans le cycle cellulaire	110
Figure 22 : Les 5 R de la radiobiologie	111

Figure 23 : Survie de la capacité de reproduction des cellules HeLa en fonction de la dose de rayons X	117
Figure 24 : Le Modèle linéaire-Quadratique, un modèle de prédiction des effets et des risques d'une modification du fractionnement de la dose	119
Figure 25 : Implication de l'endothélium dans la régression tumorale après irradiation	126
Figure 26 : Illustration de l'effet abscopal chez la souris	127
Figure 27 : Mise en place de l'immunité anti-tumorale aux fortes doses par fraction	129
Figure 28 : Le SARRP en configuration (A) d'imagerie, avec le détecteur sur la gauche et la source à droite, (B) d'irradiation avec le collimateur	238
Figure 29 : Courbes isodoses calculées par le logiciel Muriplan® lors de la planification du traitement pour une dose unique de 90 Gy	239
Figure 30 : Contourage des différents volumes et histogrammes dose-volume obtenus pour des irradiations en dose unique de 90 Gy avec les collimateurs 1 mm de diamètre (A), 3x3 mm ² (B) et 10x10 mm ² (C)	240
Figure 31 : Courbes isodose, contourage des différents volumes d'intérêt et histogrammes dose-volume de l'étude de l'effet de la dose	242
Figure 32 : Dose prescrite, dose à l'isocentre et aux différents volumes d'intérêt de l'étude de l'effet de la dose totale	243
Figure 33 : Lit de repositionnement mis au point par Morgane Dos Santos pour l'étude du fractionnement de la dose	245
Figure 34 : Images CBCT acquises au SARRP permettant le repositionnement des animaux	246
Tableau 1 : Limites anatomiques des principaux organes à risques en radiothérapie stéréotaxique pulmonaire	67
Tableau 2 : Recommandations de contraintes de dose utilisées en radiothérapie stéréotaxique thoracique selon le fractionne	70
Tableau 3 : Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 5 pour la pneumopathie radique et la fibrose pulmonaire radio-induite	77
Tableau 4 : Facteurs dosimétriques prédictifs de la pneumopathie radique après traitement par radiothérapie stéréotaxique thoracique	98
Tableau 5 : Doses moyennes délivrées dans les différents volumes thoraciques	239
Tableau 6 : Volume irradié par les différents collimateurs	241
Tableau 7 : Doses moyennes délivrées dans les différents volumes thoraciques lors de l'étude de l'effet de la dose	243
Tableau 8 : Temps d'irradiation pour les différentes doses d'intérêt de l'étude de l'effet de la dose totale	244
Tableau 9 : Gènes sélectionnés pour les études in vivo de l'effet du volume d'irradiation, de la dose totale et du fractionnement de la dose	247
Tableau 10 : Gènes sélectionnés pour l'étude in vitro de l'effet de la dose par fraction	248

Avant-propos

Le laboratoire de Radiobiologie des Expositions Médicales a pour but l'étude des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'initiation et le développement des lésions aux tissus sains résultantes de l'exposition aux rayonnements ionisants dans un contexte médical. Dès la découverte des rayons X par Roentgen en 1895, leurs propriétés biologiques ont ouvert de nouvelles perspectives en médecine. D'une part en diagnostic : les rayons X permettent de visualiser l'intérieur du corps, et d'autre part en thérapeutique, avec en juillet 1896 la première utilisation des rayonnements ionisants dans le but de traiter un cancer par Victor Despeigne. La radiothérapie venait de voir le jour. Mais rapidement, les effets biologiques néfastes des rayonnements ionisants se font connaître et les premiers radiobiologistes s'affairent à les décrire et les étudier. La radiothérapie, telle qu'on la connaît aujourd'hui, normofractionnée à 2 Gy par fraction et 5 fractions par semaine est finalement née dans les années 1920, à l'Institut du Radium (ancien nom de l'Institut Curie) des discussions entre Claudius Regaud et Henri Coutard. Quasiment un siècle plus tard, la radiothérapie est un incontournable de l'arsenal thérapeutique contre le cancer puisqu'elle est utilisée dans près de 50% des cas, seule ou en association avec d'autres thérapies. Si les machines et la prise en charge des patients ont beaucoup évolué en un siècle, les protocoles, eux, n'ont que très peu évolué.

Depuis une vingtaine d'années, nous vivons une (r)évolution de la radiothérapie avec le développement d'une balistique beaucoup plus précise et l'apparition de nouvelles techniques. Ces améliorations ont mené à un bouleversement profond des protocoles de radiothérapie. Ainsi aujourd'hui, l'utilisation de doses dites ablatives, allant de 6 à 20 Gy par fraction, prend une place particulière dans la pratique clinique de routine. L'utilisation de telles doses est possible grâce à la réduction des volumes de tissus sains irradiés. Cette réduction est possible grâce à une décroissance de dose rapide en dehors du volume cible. Ce nouveau genre de radiothérapie, c'est la radiothérapie en conditions stéréotaxiques (ou radiothérapie stéréotaxique) extracrânienne. Rapidement, la radiothérapie stéréotaxique a fait ses preuves avec une efficacité anti-tumorale indéniable. Cependant, l'exposition aux rayonnements ionisants des tissus sains, même sur de petits volumes, est susceptible de déclencher le développement d'effets secondaires. Et même s'il commence à y avoir un certain recul clinique sur cette technique de radiothérapie, il y a un manque crucial de données radiobiologiques sur la réponse des petits volumes de tissus sains irradiés à forte dose. Les résultats cliniques de la radiothérapie stéréotaxique nous apprennent également l'importance des grands volumes de tissus sains recevant des doses plus faibles dans le développement des

effets secondaires. Actuellement, les indications pour la radiothérapie stéréotaxique augmentent et de plus en plus de centres s'équipent de machines dédiées résultant en un nombre croissant de patients traités. Il est donc primordial de pouvoir mieux comprendre la réaction des tissus sains aux fortes doses par fraction en mettant en lumière les mécanismes radiopathologiques impliqués dans cette réponse. Mieux comprendre les conséquences radiobiologiques et radiopathologiques des fortes doses par fraction passe par le développement de modèles radiobiologiques *in vitro* et *in vivo*. C'est pourquoi le laboratoire de Radiobiologie des Expositions Médicales a mis en place un modèle pertinent cliniquement et unique au monde d'irradiation stéréotaxique pulmonaire en arc-thérapie chez la souris. Le développement de modèles précliniques pertinents faisait face, jusqu'à peu, à un verrou technologique qui a sauté avec la mise sur le marché du *Small Animal Radiation Research Platform* (SARRP). Le SARRP rend possible l'étude de la réponse des tissus sains exposés à de fortes doses sur de petits volumes.

Ainsi, l'objectif de ces travaux de thèse est d'explorer l'impact du volume d'irradiation, de la dose totale et du fractionnement de la dose en conditions stéréotaxiques sur le développement des lésions pulmonaires radio-induites chez la souris. Ce modèle préclinique d'irradiation stéréotaxique pulmonaire en arc-thérapie permettra également d'explorer la radiobiologie des doses ablatives, qui est une toute nouvelle radiobiologie.

Etat de l'art

Chapitre I : Anatomie & histologie pulmonaire

Les poumons sont les organes de la respiration. Ils appartiennent à l'appareil respiratoire, dont la fonction est d'apporter le dioxygène (O₂) nécessaire à l'organisme et d'éliminer le dioxyde de carbone (CO₂) produit. L'appareil respiratoire est composé des voies aériennes et de la zone respiratoire. Les voies aériennes acheminent l'air jusqu'aux poumons. L'air y est réchauffé, humidifié et purifié des poussières et micro-organismes aériens. La zone respiratoire, composée des bronchioles et des alvéoles pulmonaires, est le siège des échanges gazeux.

1. Divisions morphologiques

Au nombre de deux, les poumons, droit et gauche, se situent dans la cage thoracique. Le poumon droit est séparé du poumon gauche par le médiastin. Le médiastin est composé du cœur et des gros vaisseaux, de la trachée, de l'œsophage et des deux bronches souches. Les poumons sont entourés des plèvres, des membranes séreuses. Les plèvres sont composées de deux feuillets : la plèvre viscérale et la plèvre pariétale. La plèvre viscérale recouvre les deux poumons. La plèvre pariétale, elle, recouvre l'ensemble de la paroi thoracique, y compris le diaphragme et le médiastin. L'espace entre ces deux feuillets est appelé cavité pleurale et est rempli d'une mince couche de liquide pleural, permettant aux feuillets de glisser l'un sur l'autre au cours des mouvements respiratoires.

Les poumons se composent de lobes pulmonaires séparés par des scissures lobaires. Le poumon droit est constitué de 3 lobes : les lobes supérieur, moyen et inférieur. Ces lobes sont séparés par une scissure oblique et une scissure horizontale. Le poumon gauche est séparé en 2 lobes, supérieur et inférieur, délimités par une scissure oblique. Les scissures sont des sillons visibles à la surface des poumons dans lesquels s'insère la plèvre viscérale. A gauche, la lingula, partie homologue du lobe moyen du poumon droit, est attachée au lobe supérieur. Chaque lobe est divisé en segments par des cloisons conjonctives. Ces segments suivent la segmentation bronchique et en portent le nom. Les lobes supérieurs sont divisés en 3 segments : S1 ou segment apical, S2 ou segment postérieur et S3 ou segment antérieur. A gauche, le segment apical et le segment postérieur ne forment qu'un seul segment appelé segment apico-postérieur. Le lobe moyen du poumon droit est divisé en 2 segments : S4 ou latéral et S5 ou médial. La lingula est également divisée en 2 segments : S4 ou linguale supérieur et S5 ou linguale inférieur. Les lobes inférieurs droit et gauche sont divisés en 5 segments : S6 ou segment apical, S7 ou segment basal médial, S8 ou segment basal antérieur,

S9 ou segment basal latéral et S10 ou segment basal postérieur. Chacun de ces segments est ventilé par une bronche segmentaire et irrigué par une branche de l'artère pulmonaire.

Chaque segment est composé de lobules pulmonaires, unités fonctionnelles du poumon. Chaque lobule est ventilé par une bronchiole terminale qui se divise en bronchioles respiratoires puis en conduits alvéolaires avant d'arriver aux saccules alvéolaires et alvéoles pulmonaires. Les lobules sont irrigués par les branches de l'artère pulmonaire qui suivent la segmentation des bronches. La partie ventilée par la bronchiole terminale est appelée acinus.

2. L'arbre bronchique

Avant d'arriver dans les lobules, l'air doit passer par les voies aériennes composées des cavités nasales, du pharynx, du larynx, de la trachée, des bronches et de leurs ramifications. Les ramifications des bronches sont appelées arbre bronchique. La trachée donne naissance aux bronches principales (ou bronches souches) droite et gauche au niveau du hile pulmonaire. Les bronches principales se divisent en bronches lobaires, supérieures et inférieures, en bronches intermédiaires puis en bronches segmentaires à l'intérieur des poumons. A droite, la bronche lobaire supérieure se divise en 3 bronches segmentaires : B1 ou bronche apicale, B2 ou bronche postérieure, B3 ou bronche antérieure. La bronche lobaire inférieure se divise en bronches segmentaires B4 ou bronche latérale, B5 ou bronche médiale, B6 ou bronche segmentaire apicale, B7 ou bronche basale médiale, B8 ou bronche basale antérieure, B9 ou bronche basale latérale et B10 ou bronche basale postérieure. A gauche, la bronche lobaire supérieure donne la bronche apico-postérieure correspondant à B1+2, puis la B3 ou bronche antérieure. La bronche linguale donne les bronches B4 et B5, respectivement bronches linguales supérieure et inférieure. La bronche inférieure se divise en bronche segmentaire apicale, correspondant à B6, en bronche basale antéro-médiale, correspondant à B7+8, en bronche basale latérale (B9) et basale postérieure (B10) (**Figure 1**). Les bronches se divisent ensuite en bronchioles. Les bronchioles donnent les bronchioles terminales puis les bronchioles respiratoires : les alvéoles pulmonaires apparaissent à ce niveau.

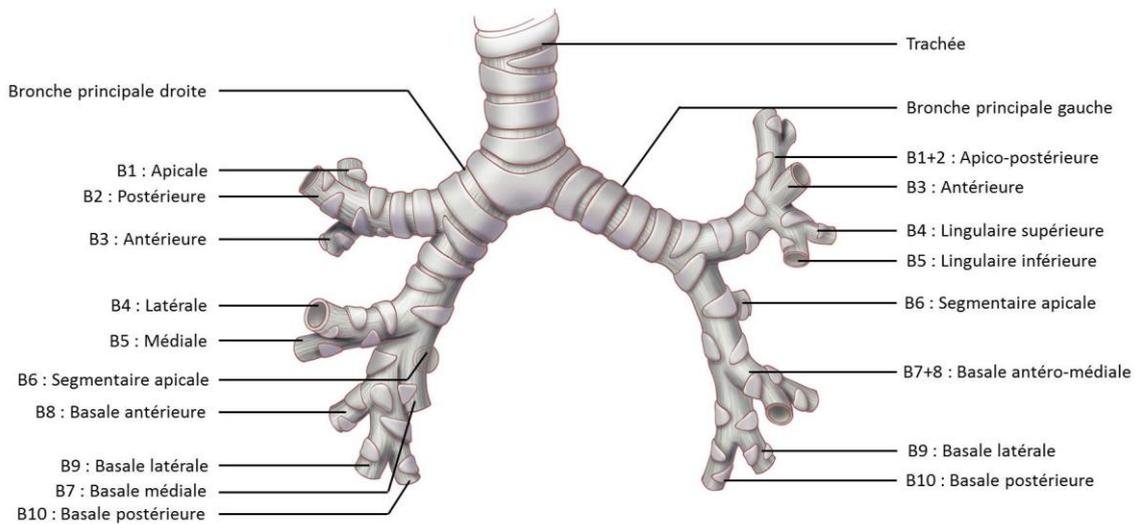


Figure 1 : L'arbre bronchique

(Source : Minnich & Mathisen, 2007¹)

D'un point de vue histologique, les voies aériennes sont composées de 3 tuniques (**Figure 2**) :

- La muqueuse, constituée de l'épithélium respiratoire dont la composition cellulaire varie le long des voies aériennes, du chorion et de la sous-muqueuse, dont les compositions varient également lors de la progression dans l'arbre bronchique.
- L'armature ou tunique moyenne constituée d'une composante fibro-musculaire plus ou moins cartilagineuse.
- L'adventis, un tissu conjonctif de soutien où circulent les nerfs et les vaisseaux.

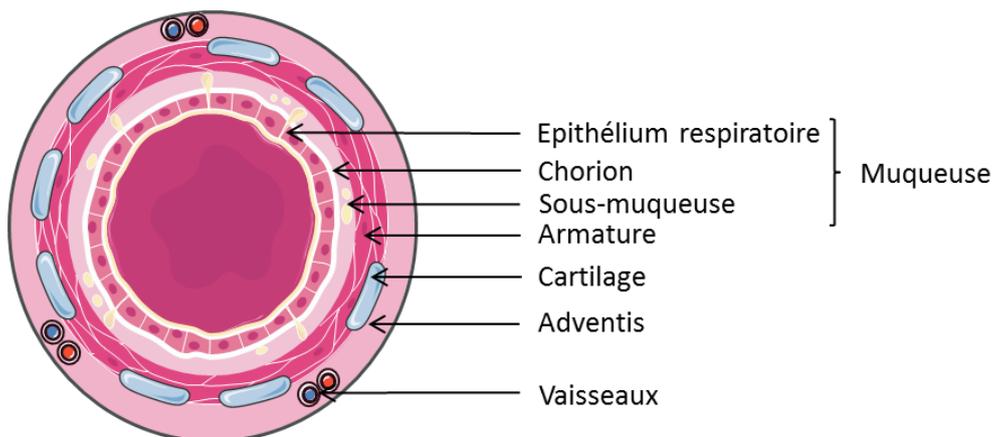


Figure 2 : Schéma des différentes tuniques des voies aériennes

L'épithélium respiratoire de la trachée est un épithélium cylindrique pseudo-stratifié composé de différents types cellulaires :

- Les cellules ciliées, responsables de la clairance muco-ciliaire, c'est-à-dire de l'élimination des poussières et pathogènes grâce au mucus et aux mouvements des cils.
- Les cellules caliciformes qui sécrètent le mucus
- Les cellules séreuses sécrétrices de protéines
- Les cellules basales neuro-endocrines capables de détecter les variations d'O₂ et de CO₂
- Les cellules souches basales, capables de se diviser et de se différencier afin d'assurer le renouvellement de l'épithélium.

Ces différents types cellulaires reposent sur la membrane basale qui sépare l'épithélium du chorion. Le chorion de la trachée est un tissu de soutien lâche vascularisé et innervé. La sous-muqueuse, située sous le chorion, est constituée de glandes mixtes séromuqueuses. La sous-muqueuse se confond avec le cartilage ou le tissu conjonctif fibro-élastique de l'armature, situé entre les anneaux de cartilage. Le muscle trachéal (muscle lisse), joint les bords libres des anneaux trachéaux. Les anneaux trachéaux sont des anneaux de cartilage en fer à cheval. Ils sont liés entre eux par des ligaments et des fibres musculaires. L'adventis englobe l'armature d'un tissu conjonctivo-adipeux où passent les vaisseaux et les nerfs.

Au niveau des bronches souches, la muqueuse est constituée d'un épithélium respiratoire pseudo-stratifié moins haut et contenant moins de cellules caliciformes que l'épithélium respiratoire de la trachée. Le chorion est riche en fibres élastiques et repose sur une couche de cellules musculaires lisses qui le sépare de la sous-muqueuse. Les glandes séromuqueuses sont moins abondantes dans la sous-muqueuse. L'armature cartilagineuse se fragmente, les îlots de cartilage sont reliés entre eux par du tissu conjonctif fibreux et des fibres musculaires lisses. L'adventis, lieu de passage des vaisseaux et des nerfs, est composé d'un tissu conjonctivo-élastique. Les bronches segmentaires et intra-segmentaires possèdent un chorion encore plus riche en fibres élastiques, la couche musculaire lisse spiralée séparant le chorion et la sous-muqueuse forme le muscle de Reissessen. La sous-muqueuse, constituée d'une majorité de glandes séreuses, se confond avec l'armature et ses structures cartilagineuses. L'adventis est alors relié au parenchyme pulmonaire.

Les bronchioles, voies aériennes de moins de 1 mm de diamètre, se caractérisent par l'absence de cartilage au niveau de la tunique moyenne et l'absence de glandes dans la sous-muqueuse. L'épithélium des bronchioles est un épithélium cylindrique cilié plissé avec de très rares cellules caliciformes. Au niveau des bronchioles terminales, l'épithélium respiratoire devient cubique simple. Les cellules ciliées y sont très rares et les cellules caliciformes y sont absentes. Les cellules club constituent le type cellulaire majoritaire de l'épithélium des bronchioles terminales. Elles ont pour rôle de protéger l'épithélium bronchiolaire en sécrétant de l'utéréglobine (*Club Cell Secretory Protein* ou CCSP) et en détoxifiant les substances nocives inhalées grâce aux cytochromes P450 présents dans leur réticulum endoplasmique rugueux. Les cellules club sont aussi capables de se diviser et de se différencier pour réparer l'épithélium bronchiolaire. L'épithélium repose sur le muscle de Reissessen (1 à 2 assises de fibres musculaires) dont l'épaisseur diminue au fur et à mesure de la progression dans l'arbre bronchique.

La bronchiole terminale se transforme en bronchiole respiratoire, dont la structure est semblable aux bronchioles terminales, interrompue par l'apparition des alvéoles. L'épithélium des bronchioles respiratoires est essentiellement constitué de cellules club. La bronchiole respiratoire s'ouvre sur les conduits alvéolaires : l'air arrive dans l'alvéole pulmonaire.

3. L'alvéole pulmonaire et la barrière alvéolo-capillaire

Les alvéoles pulmonaires sont de petits sacs de 0,1 mm de diamètre, aux parois très fines (0,2 μm), appelées septa, constituant la surface des échanges gazeux. Il y a environ 500 millions d'alvéoles dans le poumon humain adulte². Ce qui correspond à une surface d'échange gazeux estimée entre 100 et 200 m². La paroi des alvéoles est en contact avec le réseau de capillaires de la circulation pulmonaire (provenant de l'artère pulmonaire et repartant par la veine pulmonaire), ce qui permet les échanges gazeux. Les septa alvéolaires sont composés de (**Figure 3**) :

- L'épithélium alvéolaire, un épithélium aplati constitué de 2 types cellulaires : les pneumocytes de type I et les pneumocytes de type II. L'épithélium alvéolaire est recouvert d'une fine couche de liquide alvéolaire (essentiel aux échanges gazeux) et du surfactant, ce qui évite aux alvéoles de collaber. Le surfactant est composé à 90% de lipides et 10% de protéines³.
- Une fine couche de fibres de réticuline, de collagènes et de fibres élastiques.
- Un réseau de capillaires

- Des macrophages

La barrière très fine que constituent les septa alvéolaires permet l'hématose : la réoxygénation du sang grâce au passage de l'O₂ des alvéoles aux capillaires et du CO₂ des capillaires aux alvéoles. Cet échange gazeux se fait grâce à la différence de pression partielle entre les deux compartiments, permettant une diffusion passive de l'O₂ et du CO₂. Les principales fonctions de l'épithélium alvéolaire sont : les échanges gazeux, la fonction de barrière physique entre l'air et le parenchyme pulmonaire ainsi que la fonction d'immunorégulation.

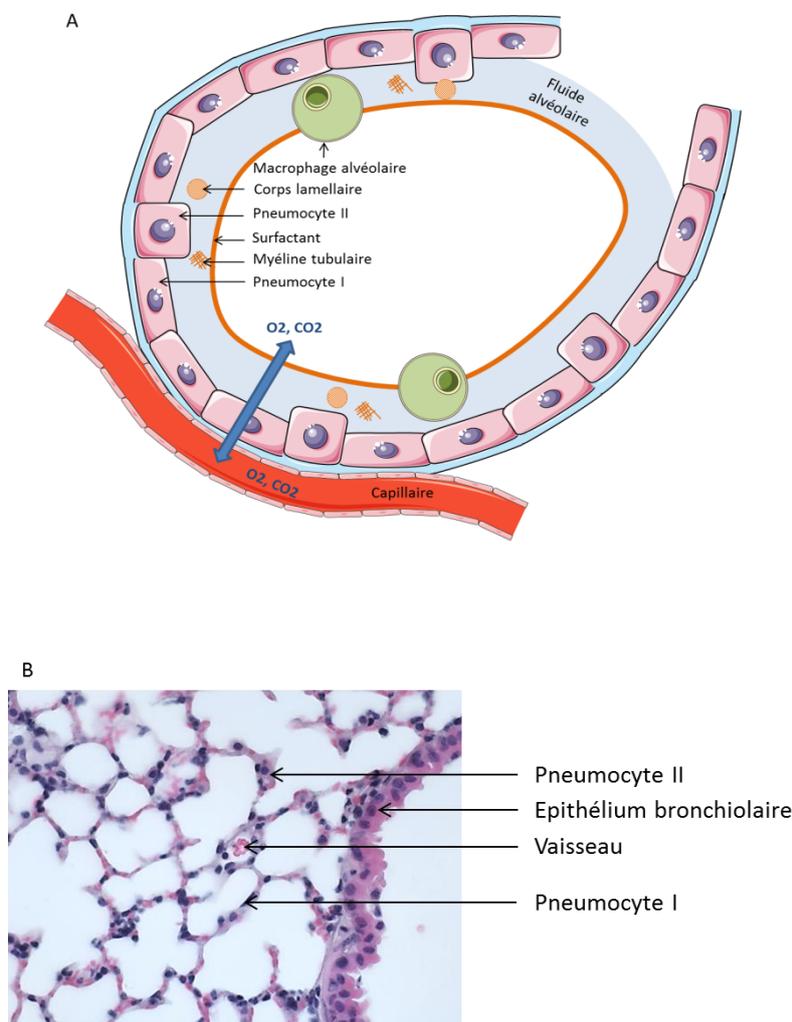


Figure 3 : L'alvéole pulmonaire

A/ Schéma d'une alvéole pulmonaire B/ Coupe histologique de poumon, grossissement X40, coloration HES
(source : Jérémy Lavigne, LRMed)

a. Les pneumocytes ou cellules épithéliales alvéolaires

L'épithélium alvéolaire, représentant 99% de la surface des poumons, est composé des cellules épithéliales alvéolaires de type I et de type II, également appelées pneumocytes de type I et de type II. Leur plasticité et leur capacité de renouvellement assurent le maintien et la régénération de l'épithélium alvéolaire. Leur morphologie permet un contact maximal entre l'air et le sang pour des échanges gazeux efficaces. Les cellules épithéliales alvéolaires jouent aussi un rôle important de barrière physique contre les bactéries, virus, allergènes et autres substances nocives. Elles sont également impliquées dans l'immunomodulation.

Les pneumocytes de type I sont des cellules squameuses, fines et plates. Les pneumocytes de type I recouvrent 95% de la surface des alvéoles⁴. Ils forment, avec le réseau de capillaires, la barrière alvéolo-capillaire et sont impliqués dans les échanges gazeux avec le sang. L'organisation anatomique des alvéoles pulmonaires permet la maximisation de cette surface d'échange grâce au réseau de capillaires circulant entre les septa alvéolaires : chaque capillaire est en contact avec deux parois alvéolaires. La barrière alvéolo-capillaire doit être extrêmement fine, moins de 1 μm , pour permettre les échanges gazeux par diffusion passive : ceci est possible grâce à la morphologie aplatie des pneumocytes de type I. La pression exercée au niveau de la barrière alvéolo-capillaire ferait se collaber les alvéoles au moment de l'expiration : pour prévenir ce phénomène, l'épithélium est recouvert de surfactant. Le surfactant permet la stabilité de la structure alvéolaire. L'homéostasie pulmonaire est également assurée par le fluide alvéolaire (*alveolar lining fluid* ou ALF), une fine couche de liquide reposant sur l'épithélium alvéolaire, recouverte par le surfactant. En quantité appropriée, il est essentiel aux échanges gazeux. Un excès de fluide alvéolaire va conduire à l'œdème alvéolaire et perturber les échanges gazeux. Le fluide alvéolaire est également une barrière supplémentaire contre les micro-organismes et les substances nocives². Les pneumocytes de type I régulent la quantité de fluide alvéolaire et son équilibre ionique. En effet, les pneumocytes de type I expriment l'aquaporine 5, protéine membranaire formant un pore perméable aux molécules d'eau ; la pompe Na^+/K^+ ATPase⁵, protéine permettant le transport actif (contre leur gradient de concentration) du sodium et du potassium ; ainsi que le canal épithélial sodique (ou ENaC pour *Epithelial Na Channel*)⁵. Ces pores, canaux et pompes permettent le transport du fluide alvéolaire de l'alvéole vers le poumon interstitiel et la circulation sanguine pulmonaire, pour conserver son volume physiologique ainsi que sa composition en électrolytes. Les pneumocytes de type I participent à la réponse immunitaire innée : ils expriment les récepteurs *Toll-like* (TLR) et sécrètent des cytokines pro-

inflammatoires telles que le *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), l'Interleukine-6 (IL-6) et l'Interleukine-1 β (IL-1 β) suite à une exposition au Lipopolysaccharide (LPS), protéine membranaire des bactéries^{6,7}. Les contacts cellules-cellules entre les pneumocytes de type I et les macrophages régulent cette immunomodulation de façon puissante, notamment par la libération du TNF- α et de l'IL-6⁸.

Les pneumocytes de type II ont également une fonction immunomodulatrice mais différente de celle des pneumocytes de type I. Les pneumocytes de type II sécrètent différents types de molécules anti-inflammatoires. Parmi ces molécules, les protéines du surfactant Sft-PA et Sft-PD, sont capables d'agglutiner divers micro-organismes afin de les éliminer. Ces protéines peuvent inhiber l'activation des cellules inflammatoires et atténuer la réponse inflammatoire. Les pneumocytes de type II sécrètent des cytokines et des chemokines telles que le TNF- α , l'IL-6, l'IL-1 β (en moindre proportion que les pneumocytes de type I), le *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP-1), le *Macrophage Inflammatory Protein 1 α* (MIP-1 α) et le *Granulocyte-macrophage Colony Stimulating factor* (GM-CSF) en réponse à différentes formes d'agression⁸. Les pneumocytes de type II diffèrent également des pneumocytes de type I par leur morphologie et leurs fonctions. En effet, les pneumocytes de type II sont des grandes cellules cuboïdes situées dans les coins des alvéoles, dont ils occupent 4% de la surface. Ils ont pour caractéristique morphologique de posséder des corps lamellaires et des microvillosités. Ces caractéristiques morphologiques sont liées à leur fonction principale : la production, la sécrétion et le recyclage du surfactant. Ce sont les seules cellules à sécréter les 4 protéines du surfactant : Sft-PA, Sft-PB, Sft-PC et Sft-PD (les cellules club sécrètent les protéines Sft-PA, Sft-PB et Sft-PD). Une autre fonction des pneumocytes de type II est la régénération de l'épithélium alvéolaire : ce sont les progéniteurs de l'épithélium alvéolaire et les cellules souches adultes du poumon⁹. Ils sont capables de se multiplier, de se dédifférencier et de se redifférencier en pneumocytes de type I, que ce soit pour la régénération basale de l'épithélium ou en cas de lésion. De base, le renouvellement de l'épithélium alvéolaire se fait en quatre à six semaines². En cas de lésion, une hyperplasie des pneumocytes de type II est observée avant leur différenciation en pneumocytes de type I. Comme les pneumocytes de type I, les pneumocytes de type II possèdent les aquaporines, les canaux sodiques et la pompe Na⁺/K⁺ ATPase leur permettant de participer à la régulation du fluide alvéolaire et ainsi participer à l'homéostasie pulmonaire.

b. Le surfactant

Le surfactant est un agent tensioactif qui évite aux alvéoles de s'affaisser sur elles-mêmes au moment de l'expiration et qui joue un rôle dans la défense contre les micro-organismes. Il est synthétisé par les pneumocytes de type II. Le surfactant est composé d'environ 90% de phospholipides et de 10% de protéines. Les phospholipides du surfactant sont la phosphatidylcholine, le phosphatidylglycerol et le cholestérol. La phosphatidylcholine représente 80% des phospholipides du surfactant, le phosphatidylglycérol 10% et le cholestérol 10%¹⁰. Le surfactant est composé des 4 protéines du surfactant : Sft-PA, Sft-PB, Sft-PC et Sft-PD ; mais également d'autres protéines dérivées du sérum. En 2003, suite au séquençage du génome des chromosomes 4 et 6 deux nouveaux ARN pouvant correspondre à des protéines interagissant avec les lipides du surfactant ont été identifiés : *Surfactant associated protein 2* ou Sft-PG et *Surfactant associated protein 3* ou Sft-PH¹¹. Sft-PH ou SFTA3 pourrait avoir un rôle immunorégulateur¹².

Les protéines Sft-PA et Sft-PD sont des glycoprotéines calcium-dépendantes capables de se lier aux lipides et aux pneumocytes de type II. Ce sont des collectines exprimées par les pneumocytes de type II, les cellules club et les glandes de la sous-muqueuse des voies aériennes. Elles accélèrent l'adsorption des phospholipides du surfactant au niveau de la barrière alvéolo-capillaire. Elles inhibent la sécrétion et augmentent l'absorption du surfactant par les pneumocytes de type II¹³. Elles ont un rôle dans l'opsonisation : elles possèdent des sites de reconnaissance des micro-organismes, sont capables de les agglutiner et de les présenter aux macrophages. La protéine Sft-PB est une protéine hydrophobe intra-alvéolaire, présente essentiellement sous forme de dimère. Sft-PB accélère la formation du surfactant en accélérant l'adsorption : elle participe à la bonne répartition du surfactant à la surface de la barrière alvéolo-capillaire. Associée à Sft-PA et aux ions calcium, Sft-PB est impliquée dans la formation de myéline tubulaire (étape de synthèse du surfactant). Elle intervient également dans le recyclage du surfactant. La protéine Sft-PC est la plus hydrophobe des protéines du surfactant et est spécifique des pneumocytes de type II. Elle stabilise le surfactant pendant les phases d'inspiration et d'expiration et permet sa bonne répartition.

Le surfactant est synthétisé par les pneumocytes de type II, bien que les protéines Sft-PA, Sft-PB et Sft-PD puissent également être synthétisées par les cellules club. La synthèse des lipides et des protéines suit la voie classique à travers le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les corps multivésiculaires et les corps lamellaires, sauf pour Sft-PD qui

suit la voie constitutive³. Le corps lamellaire est sécrété dans l'alvéole par exocytose. Une fois dans le fluide alvéolaire, le corps lamellaire est transformé en myéline tubulaire grâce à Sft-PA, Sft-PB et aux ions Ca^{2+} , et le surfactant se répartit sur le fluide alvéolaire. La majorité du surfactant, jusqu'à 85%, est réabsorbée, métabolisée et re-sécrétée par les pneumocytes de type II. Le recyclage concerne les lipides et les protéines du surfactant. La dégradation du surfactant est prise en charge par les macrophages alvéolaires.

La composition du surfactant pulmonaire est altérée dans diverses pathologies pulmonaires comme les maladies pulmonaires obstructives (asthme, bronchiolite, bronchopneumopathie chronique obstructive), les infections (pneumonie), les œdèmes pulmonaires, les maladies pulmonaires interstitielles et d'autres pathologies¹³. Un déficit de surfactant à la naissance entraîne la maladie des membranes hyalines ou syndrome de détresse respiratoire idiopathique du nouveau-né chez les prématurés. Un déficit en protéine Sft-PB est létal (mutation à l'état homozygote du gène *SFTPB*)¹⁴. Au contraire, un excès de surfactant dans les alvéoles pulmonaires conduit à une protéinose alvéolaire primitive (PAP) et une insuffisance respiratoire.

c. Les échanges gazeux

La respiration correspond à l'ensemble des processus physiologiques impliqués dans les échanges gazeux entre le milieu extérieur et l'organisme afin d'oxygéner les tissus et d'éliminer le CO_2 produit. Elle se déroule en 5 étapes :

- La ventilation pulmonaire, correspondant à la quantité d'air arrivant dans les alvéoles
- L'hématose : la transformation du sang riche en CO_2 en sang riche en O_2
- Le transport des gaz dissous dans le sang
- Les échanges gazeux tissulaires
- La respiration cellulaire impliquant la chaîne respiratoire des mitochondries

Ici, nous nous focaliserons sur l'hématose qui a lieu dans l'alvéole pulmonaire.

Après avoir traversé les voies aériennes, l'air arrive dans l'alvéole pulmonaire. L'air est alors composé de 78% de N_2 , 21% d' O_2 et de 0,04% de CO_2 . A ce moment les gaz doivent franchir la barrière alvéolo-capillaire : le surfactant, le fluide alvéolaire, le cytoplasme des pneumocytes de type I, la membrane basale et la cellule endothéliale composant le capillaire. L'hématose se fait par diffusion passive à travers la barrière alvéolo-capillaire. Cette diffusion passive est possible grâce à la différence de pressions partielles entre l'alvéole et le sang. En

effet, les gaz diffusent toujours du compartiment à la pression partielle la plus élevée vers le compartiment à la pression partielle la moins élevée et ce, jusqu'à l'équilibre entre les deux compartiments. Quand les gaz sont dissous dans le sang, on ne parle pas de pression mais de tension. Quand le sang arrive à l'alvéole, celui-ci est pauvre en O₂ et riche en CO₂ : il est dit carbonaté. Le sang carbonaté a une tension en O₂ équivalant à une pression partielle de 40 mmHg et une tension en CO₂ équivalant à une pression partielle de 46 mmHg. Dans l'alvéole, la pression partielle en O₂ (PAO₂) est de 105 mmHg et la pression partielle en CO₂ (PACO₂) est de 40 mmHg. Les gaz diffusent donc dans l'alvéole jusqu'à ce que les pressions partielles s'équilibrent. L'équilibre est atteint rapidement, en environ 0,4 seconde. Mais cet équilibre n'est pas parfait, puisque le sang hématosé (riche en O₂ et pauvre en CO₂, repartant de l'alvéole) a une tension en O₂ équivalente à une pression partielle en O₂ de 100 mmHg et une tension en CO₂ équivalente à 40 mmHg. Le CO₂ diffuse aussi rapidement que l'O₂ malgré une différence de pression partielle beaucoup plus petite grâce à sa constante de diffusion beaucoup plus élevée que celle de l'O₂.

En plus des gradients de pression, d'autres facteurs influent le passage des gaz à travers la barrière alvéolo-capillaire :

- la surface d'échange : plus la surface d'échange est grande, plus les échanges sont efficaces. La surface d'échange des poumons est d'environ 100 m² comme mentionné précédemment.
- L'épaisseur de la barrière alvéolo-capillaire : plus elle est fine, mieux les gaz passent. En situation pathologique, l'épaississement de la barrière alvéolo-capillaire diminue l'efficacité des échanges gazeux (cas de la fibrose pulmonaire par exemple)
- Le temps de contact entre le sang et l'alvéole, inférieur à 1 seconde
- La constante de diffusion des gaz

Après les échanges gazeux au niveau de l'alvéole, l'air expiré est composé de 79% de N₂, 16% d'O₂ et 5% de CO₂.

d. Les cellules endothéliales

L'un des composants de la barrière alvéolo-capillaire sont les capillaires. Les capillaires sont les vaisseaux les plus petits de la circulation sanguine et irriguent les tissus. Les capillaires sont composés d'une monocouche de cellules endothéliales, appelée endothélium, qui repose sur une membrane basale. L'endothélium, dont le rôle principal est

l'hémostase, est perméable, ce qui permet les échanges gazeux, les échanges de nutriments et l'infiltration des cellules immunitaires. L'endothélium régule sa perméabilité grâce aux jonctions intercellulaires, avec notamment les jonctions adhérentes composées des *Vascular Endothelial Cadherine* (VE-Cad). Les cellules endothéliales jouent également un rôle dans la réponse immunitaire et inflammatoire. Elles régulent le passage des leucocytes entre le sang et le tissu et sécrètent des chimiokines capables de recruter les cellules inflammatoires via des molécules d'adhésion présentes à leur surface : *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1), *InterCellular Adhesion Molecule* (ICAM), *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* (PECAM-1) et les Sélectines E et P. Elles sécrètent aussi des cytokines pro et anti-inflammatoires, telles que le TNF- α , l'*Interferon- γ* (IFN- γ) et IL-6, qui participent au statut inflammatoire du tissu. Pour maintenir l'hémostase, les cellules endothéliales expriment à leur surface des molécules anticoagulantes et antiagrégantes. Si l'intégrité de l'endothélium est compromise, l'exposition des tissus sous-jacents déclenche les processus d'agrégation plaquettaire et de coagulation. Les cellules endothéliales expriment des marqueurs spécifiques : le *von Willebrand Factor* (vWF) et PECAM-1. Les cellules microvasculaires endothéliales pulmonaires expriment de manière spécifique des canaux à ions calcium, impliqués dans l'œdème alvéolaire et la translocation des sélectines P¹⁵.

e. Les macrophages

Les macrophages pulmonaires sont essentiels pour conserver un environnement inflammatoire optimal pour les échanges gazeux, malgré l'exposition continue des poumons au milieu extérieur. Les macrophages pulmonaires ont différentes localisations : la lumière des alvéoles (dans le fluide alvéolaire), l'interstitium alvéolaire, la sous-muqueuse bronchiolique et l'adventis des artères et des veines pulmonaires. Les macrophages présents dans l'alvéole sont appelés macrophages alvéolaires. Les autres sont référencés comme les macrophages pulmonaires interstitiels¹⁶. Des cellules dendritiques, dont la fonction est la présentation des antigènes aux lymphocytes T et B, sont également présentes dans le poumon.

Les macrophages alvéolaires sont les seuls macrophages de l'organisme à être exposés en permanence à l'air environnant et aux micro-organismes, particules et substances xénobiotiques qu'il contient. Ils expriment de ce fait un transcriptome qui leur est spécifique. Ils sont, en effet, la 1^{ère} ligne de défense du poumon. Les macrophages interstitiels eux, sont

en contact avec les cellules endothéliales microvasculaires et les cellules épithéliales alvéolaires. Mais leur fonction précise reste à élucider.

Le renouvellement du pool de macrophages pulmonaires diffère en fonction de leur origine embryonnaire. En effet, une partie des macrophages interstitiels, dits primitifs, proviennent du sac vitellin et sont remplacés par les macrophages interstitiels, dits définitifs, lors de la 1^{ère} semaine de vie post-natale. Le pool de macrophages interstitiels définitifs est maintenu par les progéniteurs provenant de la moelle osseuse. Les macrophages alvéolaires, quant à eux, dérivent du foie fœtal et colonisent les alvéoles lors de la 1^{ère} semaine post-natale. Leur pool est maintenu par auto-renouvellement *in situ*¹⁷. Les macrophages alvéolaires sont renouvelés en 5 à 8 mois¹⁸. Les macrophages possèdent des récepteurs aux facteurs de croissance *Colony Stimulating Factor* (CSF-1) et *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) sécrétés par les cellules endothéliales, les fibroblastes pulmonaires¹⁹ et les cellules épithéliales alvéolaires de type II en situation inflammatoire¹⁶. En cas d'inflammation, les monocytes circulant dans le sang sont recrutés par chimiotactisme. Ils se différencient alors en macrophages, en cellules dendritiques ou restent à l'état de monocytes.

L'un des rôles des macrophages alvéolaires est l'internalisation et la catabolisation du surfactant¹⁶. Ils possèdent toute la machinerie métabolique pour l'absorption, le tri et le métabolisme des lipides et des lipoprotéines. Ils expriment notamment, de façon constitutive, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ* (PPAR- γ), un récepteur essentiel au métabolisme des lipides qui est régulé de manière positive par le GM-CSF. Les macrophages alvéolaires catabolisent environ 40% du surfactant. La protéinose alvéolaire primitive, mentionnée plus haut, peut être causée par la production d'anticorps anti-GM-CSF ou une mutation dans la séquence des récepteurs au GM-CSF perturbant le métabolisme du surfactant et le fonctionnement des macrophages, exposant les patients à des infections opportunistes. Les macrophages alvéolaires jouent également un rôle dans la tolérance immunitaire¹⁶ : en effet, leur contact permanent avec le milieu extérieur rend la régulation de la réponse immunitaire extrêmement importante, notamment la diminution de la réaction aux particules inhalées. Ils atténuent la réponse immunitaire aux antigènes inhalés en sécrétant du *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), de l'*Oxide Nitrique* (NO), de l'Interleukine 10 (IL-10) et des prostaglandines. Les macrophages interstitiels participent également à cette atténuation de la réponse immunitaire : ils inhibent l'activation des Lymphocytes T en activant les cellules T régulatrices (cellules Treg). Les macrophages pulmonaires expriment

également des récepteurs impliqués dans la tolérance immunitaire : le récepteur au TGF- β , le *Signal Regulatory Protein- α* (*SIRP- α*) dont le ligand est le CD47 qui inhibe la phagocytose, le récepteur à l'IL-10 qui inhibe le signal pro-inflammatoire et le récepteur au CD₂₀₀ qui inhibe la réponse immunitaire. Mais l'un des rôles principaux des macrophages alvéolaires reste la phagocytose des micro-organismes présents dans les alvéoles. Pour cela l'opsonisation, processus de recouvrement de la membrane des cellules cibles par une molécule favorisant la phagocytose, est essentielle. Les macrophages alvéolaires possèdent donc des récepteurs membranaires importants pour l'opsonisation: le récepteur Fc, les récepteurs du complément (CD35 notamment) et les récepteurs aux lectines¹⁹. La phagocytose engendre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) : l'anion superoxide (O₂⁻), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le radical hydroxyl (OH[.]). Ces ROS sont impliqués dans la défense anti-infectieuse non spécifique et dans les lésions pulmonaires de par leur cytotoxicité pour les fibroblastes pulmonaires¹⁹.

L'équilibre de l'organisme dépend de la qualité de l'oxygénation tissulaire. L'homéostasie pulmonaire nécessite une bonne organisation structurelle et fonctionnelle. Un déséquilibre de l'architecture tissulaire ou des acteurs cellulaires peut générer des pathologies suffisamment invalidantes pour compromettre sévèrement la qualité de vie.

Chapitre II : Pathologies pulmonaires

Les pathologies respiratoires touchent les voies aériennes, des voies nasales jusqu'aux alvéoles, en passant par les bronches. Elles constituent l'un des principaux problèmes de santé publique et sont responsables d'un décès sur 8 dans l'Union Européenne chaque année²⁰. Les maladies respiratoires rassemblent les infections aiguës comme la pneumonie, la grippe ou la tuberculose et des affections stériles comme l'asthme, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), la fibrose et le cancer. Elles englobent également les maladies vasculaires pulmonaires comme l'embolie pulmonaire ou l'hypertension pulmonaire et des maladies génétiques comme la mucoviscidose. Dans ce chapitre, nous aborderons exclusivement les affections pulmonaires stériles. Ces affections sont intéressantes à connaître car elles regroupent un certain nombre de caractéristiques anatomopathologiques et mécanistiques communes avec les lésions pulmonaires radio-induites.

1. Les pathologies bronchiques

a. La bronchopneumopathie chronique obstructive

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie caractérisée par une limitation persistante, progressive et irréversible du flux d'air, associée à une inflammation chronique des voies aériennes et du parenchyme pulmonaire en réponse à une exposition à des particules et gaz nocifs. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a recensé 251 millions de cas dans le monde en 2016. L'apparition de la BPCO est influencée par des facteurs génétiques et environnementaux. L'une des principales causes de la BPCO est environnementale : le tabagisme. Les autres facteurs environnementaux sont la pollution de l'air, l'exposition professionnelle à des poussières et gaz nocifs et la fumée générée par la biomasse (matière organique utilisable comme source d'énergie)²¹. Les symptômes de la BPCO se développent lentement : essoufflement progressif, toux chronique, expectorations et phases d'exacerbation. Ces symptômes peuvent être soulagés par une prise en charge médicamenteuse et par la kinésithérapie.

La BPCO est caractérisée par une altération de la structure des bronches et bronchioles ainsi qu'une destruction du parenchyme pulmonaire, appelée emphysème, correspondant à la rupture du lien entre bronchioles et alvéoles. L'altération des voies aériennes correspond à un remodelage de l'épithélium respiratoire et une infiltration de cellules inflammatoires. Le remodelage de l'épithélium se fait via différents mécanismes²² (**Figure 4**): hyperplasie des cellules basales et hyperplasie des cellules caliciformes : la sécrétion excessive de mucus mène à la formation de bouchons muqueux obstruant les bronches et bronchioles. Une

métaplasie malpighienne est également observée : l'épithélium respiratoire endommagé par les toxiques est remplacé par un épithélium pavimenteux. La transition épithélio-mésenchymateuse participe à ce remodelage : les cellules épithéliales perdent les contacts cellules-cellules et acquièrent un phénotype mésenchymateux, phénomène de base de la fibrose. Les cils sont altérés, affectant la clairance muco-ciliaire. La perte des cellules club impacte la régénération de l'épithélium. Pour finir, l'épithélium perd sa perméabilité par perte des jonctions apicales.

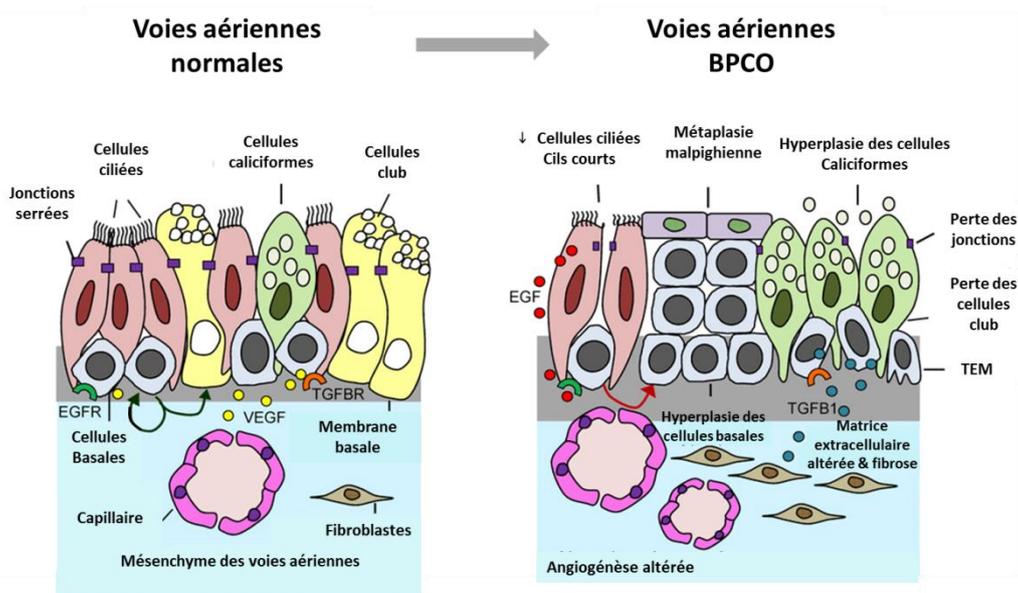


Figure 4 : Remodelage de l'épithélium respiratoire dans la bronchopneumopathie chronique obstructive (source : Shaykhiev et Cristal 2014²²)

TEM: Transition épithélio-mésenchymateuse, EGF: Epithelial Growth Factor, EGFR: Epithelial Growth Factor Receptor, VEGF: Vascular endothelial growth factor, TGFβR: Transforming Growth Factor Receptor, TGFβ1: Transforming Growth Factor beta 1.

Ce remodelage conduit à l'obstruction de la lumière des voies aériennes limitant le flux d'air. Le flux d'air est également limité par une constriction des bronchioles due à une hypertrophie des cellules musculaires lisses. Une forte infiltration des cellules inflammatoires est aussi présente. En effet, le nombre de neutrophiles, d'éosinophiles, de macrophages et de lymphocytes est fortement augmenté dans les parois des voies aériennes ainsi que dans la lumière²¹. Ces cellules sécrètent des molécules inflammatoires (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance) qui affaiblissent le parenchyme pulmonaire. Le remodelage de

l'épithélium associé à la réponse inflammatoire, la fibrose et l'hypertrophie des cellules musculaires lisses épaississent les parois des bronchioles. Cet épaississement entraîne le découplage des bronchioles et des alvéoles : l'emphysème. L'emphysème favorise la fermetures des voies aériennes²³ et diminue la surface disponible pour les échanges gazeux. La BPCO connaît des phases d'exacerbation durant quelques jours à quelques semaines : ce sont des événements aigus caractérisés par l'aggravation des symptômes respiratoires au-delà de l'évolution normale de la maladie. Lors de ces exacerbations, le nombre de cellules inflammatoires présentes dans les voies aériennes (parois et lumière) augmente²¹.

b. L'asthme

L'asthme est un trouble inflammatoire chronique des voies respiratoires dans lequel beaucoup de cellules jouent un rôle : en particulier les mastocytes, les éosinophiles, les lymphocytes T, les macrophages, les neutrophiles et les cellules de l'épithélium respiratoire. Cette inflammation entraîne des symptômes épisodiques et récurrents : une respiration sifflante, un essoufflement, une oppression thoracique et une toux, apparaissant particulièrement la nuit ou tôt le matin. Ces symptômes sont associés à une obstruction des bronches étendue et variable, souvent réversible spontanément avec ou sans traitement. Les bronches des asthmatiques sont hyper réactives : c'est l'une des caractéristiques principales de l'asthme, une bronchoconstriction exagérée en réponse à divers stimuli, due à l'inflammation sous-jacente²⁴. Selon l'OMS, 235 millions de personnes sont concernées par l'asthme dans le monde. L'interaction entre le génome et l'environnement est au cœur du développement de l'asthme. La part du facteur génétique dans le développement de la maladie peut être de 35% à 95%. Des facteurs épigénétiques interviennent également. Le microbiome pulmonaire pourrait également jouer un rôle dans le développement de la maladie²⁵. Les facteurs environnementaux sont les expositions aux allergènes intérieurs et extérieurs, aux polluants, aux vapeurs de produits chimiques. Les crises d'asthme sont caractérisées par une limitation du débit d'air due à une bronchoconstriction, un gonflement des bronches et une sécrétion excessive de mucus. Ces crises peuvent être déclenchées par des infections virales, la cigarette, les allergènes, la pollution, l'air froid, les émotions fortes, le stress, les anti-inflammatoires non stéroïdiens et l'activité physique. L'inflammation joue un rôle majeur dans l'asthme, avec différents types cellulaires impliqués : les lymphocytes T Helper de type 2 (Th2), sécrétant de l'Interleukine 4 (IL-4), de l'Interleukine 5 (IL-5) et de l'Interleukine 13 (IL-13). Ces Interleukines produisent des Immunoglobines E (IgE) qui recrutent des cellules éosinophiles, responsables de l'hyperréactivité bronchique. Les éosinophiles sont un

marqueur de sévérité de l'asthme : plus ils sont présents, plus l'asthme est sévère. Les mastocytes sécrètent des bronchoconstricteurs tels que l'Histamine, la Cystéinyl-leukotriène ou la Prostaglandine D2. Les mastocytes possèdent des récepteurs aux IgE et sont activés par les allergènes. Les macrophages sont également activés par les allergènes et sécrètent des cytokines et autres médiateurs de la réponse inflammatoire. Les cellules musculaires lisses sont également sensibles à l'inflammation, notamment celle de l'épithélium. Les facteurs de croissance et cytokines pro-inflammatoires sécrétés par l'épithélium entraînent leur prolifération, contraction et hypertrophie²⁶. L'inflammation résultant de l'exposition aux allergènes ou à d'autres substances nocives entraîne un remodelage de l'épithélium respiratoire des bronches. L'intégrité de l'épithélium est compromise par la perte des jonctions apicales, la perte des cellules ciliées et une hyperplasie des cellules caliciformes. La membrane basale est épaissie par la fibrose avec des dépôts de collagènes et de protéoglycanes. Il y a également une hyperplasie des glandes muqueuses, entraînant une hypersécrétion de mucus. L'angiogénèse est altérée : les vaisseaux se dilatent et prolifèrent. Ce remodelage de l'épithélium respiratoire est présent quelle que soit la sévérité de l'asthme. Il existe une corrélation entre le dépôt de collagènes et de protéoglycanes et la réactivité des bronches. Il existe différents endotypes d'asthme, c'est-à-dire différents types d'asthme dans lesquels les mécanismes physiopathologiques impliqués sont différents. Par exemple, l'asthme à immunité Th2 prédominante ou non, allergique ou non, apparaissant dans l'enfance ou à l'âge adulte, répondant aux corticostéroïdes ou non²⁷. Récemment, des études épidémiologiques ont mis en avant que la BPCO et l'asthme coexistaient chez certains patients. Cette coexistence touche 27% des patients atteints de BPCO. Ces patients présentent des caractéristiques de l'asthme en plus de leur BPCO. Cette combinaison a donné lieu à la définition d'un nouveau syndrome : Asthma and Chronic obstructive pulmonary disease Overlap Syndrome (ACOS) ou syndrome de chevauchement de l'asthme et de la BPCO²⁸.

2. Les pathologies interstitielles

Les pathologies pulmonaires interstitielles affectent le parenchyme pulmonaire : la structure des parois des alvéoles est détériorée. Cette détérioration mène à une inflammation généralisée conduisant à la formation de cicatrices fibreuses dans le parenchyme. Le terme de maladies interstitielles pulmonaires regroupe plus de 300 affections. Les deux formes les plus

courantes de pneumopathie interstitielle sont la fibrose pulmonaire idiopathique et la sarcoïdose²⁰.

a. La fibrose pulmonaire idiopathique

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est la pneumopathie interstitielle la plus commune. C'est une maladie chronique caractérisée par la cicatrisation progressive de l'interstitium des poumons sans cause apparente. Cette cicatrisation entraîne une diminution de l'efficacité des échanges gazeux. En Europe et aux Etats-Unis son incidence est de 2,8 à 18 cas pour 100 000 personnes par an²⁹, sa prévalence dans le monde est d'environ 3 millions de cas³⁰. Les symptômes de la fibrose pulmonaire idiopathique sont non spécifiques : dyspnée à l'effort, toux sèche et un hippocratisme digital pour certains patients. La maladie peut également connaître des exacerbations aiguës. La fibrose pulmonaire idiopathique se présente sous forme de cas sporadiques ou sous forme familiale. La maladie, que ce soit pour les cas sporadiques ou familiaux, se développe préférentiellement chez les individus porteurs de variants génétiques des gènes de maintenance des télomères, du gène *SFTPC* codant pour la Sft-PC ou du promoteur du gène *MUC5B* codant pour la mucine 5B, facteur génétique le plus commun. L'âge est le déterminant le plus fort dans le développement de la FPI. L'exposition environnementale à la cigarette, aux infections virales chroniques, aux poussières de bois et de métaux, à la silice ainsi que la présence de comorbidités favorise également le développement de la maladie. L'interaction de ces expositions a pour conséquence des microlésions répétitives de l'épithélium alvéolaire et son vieillissement. L'épithélium alvéolaire est alors activé de façon aberrante et un processus de réparation inadapté, caractérisé par la prolifération exagérée des fibroblastes et de leur différenciation en myofibroblastes, se met en place (**Figure 5**). Les myofibroblastes entraînent une accumulation de matrice extracellulaire dans l'interstitium. Cette matrice, composée de collagènes, de fibronectine et de protéoglycanes, est anormale : elle est plus rigide. Elle est à la fois la conséquence et la cause de l'activation des fibroblastes en myofibroblastes. Les myofibroblastes peuvent provenir de la différenciation des cellules résidentes : fibroblastes résidents, péricytes et progéniteurs mésenchymateux. Ils peuvent aussi provenir de la différenciation des fibrocytes, progéniteurs circulants de la moelle osseuse. Les transitions épithélio-mésenchymateuse et endothélio-mésenchymateuse, où les cellules épithéliales et endothéliales acquièrent un phénotype mésenchymateux, sont également des sources de myofibroblastes. Les cellules épithéliales jouent également un rôle majeur dans la mise en place de la pathologie : de façon concomitante les cellules épithéliales prolifèrent, entrent en

apoptose, en sénescence, s'activent et entrent en transition épithélio-mésenchymateuse (**Figure 5**). La perte de l'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire ainsi que l'épuisement des pneumocytes de type 2 seraient déclencheurs de la FPI. Les lésions de la barrière alvéolaire déclenchent également une bronchiolisation des alvéoles : les cellules basales bronchiolaires ainsi que les cellules club migrent pour ré-épithélialiser les alvéoles. Les pneumocytes de type II entrent en sénescence, un état d'arrêt métabolique de la cellule, de façon accélérée et persistante, ce qui participe à la réponse aberrante de l'épithélium alvéolaire³⁰. Le diagnostic de cette pathologie est compliqué car il faut exclure les autres pneumopathies interstitielles ainsi que les comorbidités. Pour établir un diagnostic précis, en l'absence de symptômes spécifiques, un examen clinique, un examen radiologique par tomographie à haute résolution et une analyse anatomopathologique, discutés par une équipe multidisciplinaire sont nécessaires. Différentes prises en charge existent : médicamenteuse (pirfenidone, nintedanib) ou non (réhabilitation pulmonaire via le conditionnement physique, la transplantation pulmonaire, la ventilation mécanique, la prise en charge des comorbidités)³⁰.

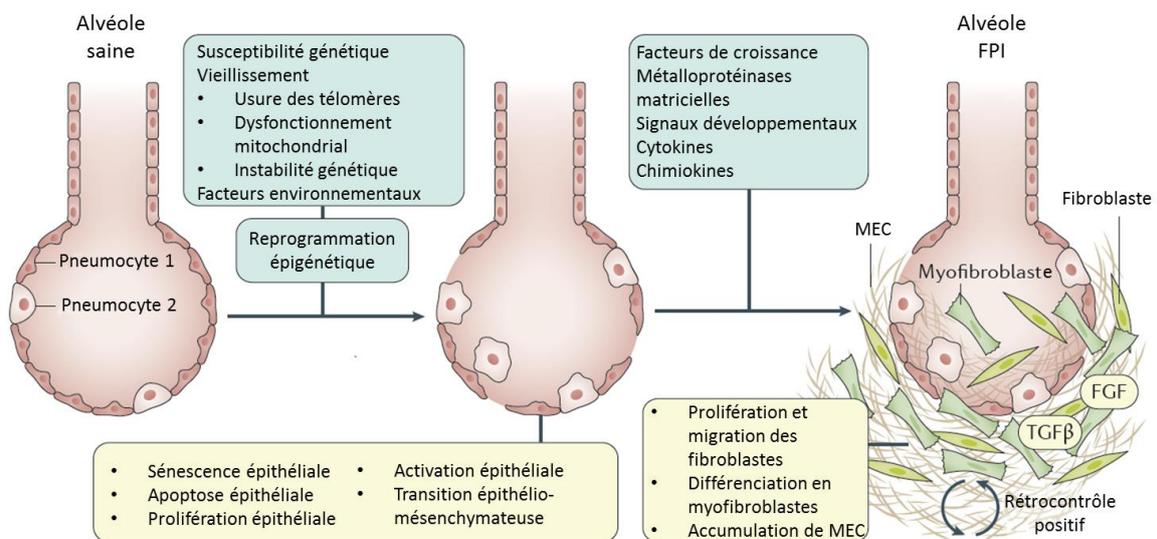


Figure 5 : Modèle de pathogénèse proposé pour la fibrose pulmonaire idiopathique

(FPI). (Source : Martinez et al 2017³⁰)

MEC : Matric Extracellulaire ; TGFβ : Transforming Growth Factor bêta; FGF : Fibroblast Growth Factor

b. La sarcoïdose

La sarcoïdose est une maladie inflammatoire chronique granulomateuse de cause inconnue observée partout dans le monde. Son incidence est d'environ 10 pour 100 000 chez les caucasiens mais varie selon les ethnies. Même si la cause exacte de la sarcoïdose reste inconnue à l'heure actuelle, cette pathologie semble se développer chez des individus prédisposés génétiquement après exposition à certains facteurs environnementaux. Les gènes impliqués dans cette maladie polygénique sont les gènes d'*Antigène Leucocyte Humain (HLA)*, faisant partie du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) ainsi que d'autres gènes du système immunitaire³¹. Elle affecte les poumons dans 90% des cas mais peut également affecter la peau, les yeux, le système gastro-intestinal, le système nerveux, le cœur et l'appareil musculo-squelettique. Les manifestations cliniques de la sarcoïdose sont variables et dépendent de la sévérité de l'atteinte des organes. La sarcoïdose pulmonaire peut être asymptomatique ou présenter des symptômes chroniques non spécifiques comme une toux, une dyspnée à l'effort ou de la fatigue. La sarcoïdose est souvent découverte accidentellement lors d'examens radiographiques ou tomographiques qui révèlent la présence d'une lymphadénopathie intrathoracique, c'est-à-dire une hypertrophie des ganglions lymphatiques intra-thoraciques, et de nodules dans le parenchyme. La lymphadénopathie est présente chez 97% des patients atteints de sarcoïdose pulmonaire³². La sarcoïdose est caractérisée par la formation de granulomes non nécrotiques dans l'interstitium pulmonaire. Ces granulomes sont des amas de cellules géantes multi-nucléées entourés de Lymphocytes T CD4⁺³¹. L'interaction entre le génome et les facteurs environnementaux déclenche une réponse immunitaire granulomateuse menée par les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes T. Une fois activés, les lymphocytes T sécrètent des cytokines et des chimiokines : l'*interféron γ* (INF- γ), TNF- α et TGF- β . Les granulomes peuvent se résorber avec le temps ou persister et mener à une fibrose pulmonaire³³. La prise en charge thérapeutique de la sarcoïdose dépend des symptômes présents, de la sévérité de l'atteinte des organes et de la progression de la maladie. Les traitements possibles incluent les corticostéroïdes, des anticorps anti-TNF- α ou une thérapie immunosuppressive.

3. Les cancers broncho-pulmonaires

Le cancer est une pathologie provoquée par la prolifération excessive de cellules ayant subi une modification quantitative ou qualitative de leur génome. Ces cellules dérégées forment alors une masse, appelée tumeur maligne. Selon l'Institut National du Cancer, il y a

eu 399 626 nouveaux cas estimés en France, en 2017. Parmi ces nouveaux cas de cancer, 49 109 sont des cancers broncho-pulmonaires avec un âge médian au diagnostic de 66 ans chez les hommes et 65 ans chez les femmes. Le cancer broncho-pulmonaire est le 4^{ème} cancer le plus fréquent en France (Institut National du Cancer). La survie nette à 5 ans, entre 2005 et 2010, est de 17%. Il y a 2 grands types de cancers broncho-pulmonaires : les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBNPC), 85% des cas, et les cancers broncho-pulmonaires à petites cellules (CBPC), 15% des cas. Les CBNPC regroupent différents sous-types histologiques de tumeurs. Le facteur de risque principal est le tabagisme. Mais des facteurs environnementaux entrent également en compte comme l'exposition au radon, à l'amiante, aux gaz d'échappement de moteurs diesels, aux rayonnements X et γ , à la pollution de l'air ou encore au tabagisme passif. Certaines expositions professionnelles sont également des facteurs de risque : l'exposition à la silice, au cadmium, au chrome hexavalent, au nickel, à l'arsenic, au béryllium et aux benzopyrènes³⁴. Le diagnostic du cancer broncho-pulmonaire repose sur un examen anatomopathologique en coloration standard (Hématoxyline-Eosine-Safran) de la tumeur et/ou des adénopathies associées et/ou sites métastatiques accessibles, ainsi qu'un examen d'imagerie thoracique (radiographie, tomodensitométrie) et dans certains cas de CBNPC la recherche de mutations sur les gènes de l'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) ou sur le gène de l'*Anaplastic Lymphoma Kinase* (ALK)³⁴. La stratégie thérapeutique dépendra du type d'histologie de la tumeur, de l'extension de la maladie et des anomalies moléculaires éventuelles.

a. Les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules

Les 3 sous-types histologiques les plus fréquents de cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules sont le carcinome malpighien ou épidermoïde, l'adénocarcinome et le carcinome à grandes cellules. Le carcinome malpighien se développe au niveau de la paroi interne des grosses bronches, dans la partie centrale des poumons. Il représente 30% des CBNPC et est le sous-type histologique le plus fréquent chez l'homme. Il se développe à partir d'une métaplasie malpighienne, c'est-à-dire une transformation de l'épithélium bronchique en épithélium pavimenteux stratifié, kératinisé ou non, en réponse à un changement environnemental, la fumée de cigarette par exemple. Les anticorps P63 et cytokératines 5-6 permettent l'identification de la différenciation épidermoïde de façon fiable³⁵ (**Figure 6**). L'adénocarcinome est un type de tumeur se développant à partir des glandes de la muqueuse des petites bronches et bronchioles, en périphérie des poumons. Il représente 50% des CBNPC et est plus fréquent chez la femme et les individus non-fumeurs.

Les carcinomes non à petites cellules positifs pour les mucines et négatifs pour les marqueurs épidermoïdes, sont classés comme adénocarcinomes³⁵. La recherche de marqueurs moléculaires permet de distinguer différents types d'adénocarcinomes : papillaire-lépidique, mucipare ou solide/acinaire (**Figure 6**). Le carcinome à grandes cellules est établi en absence totale de différenciation épidermoïde ou glandulaire³⁵, établie sur de grands prélèvements chirurgicaux. Il est caractérisé par de grandes cellules anaplasiques en îlots ou en nappe. Le carcinome à grandes cellules représente 10 à 15% des cas de CBNPC et peut se développer dans toutes les parties du poumon. Sa croissance et son extension sont rapides, le pronostic est mauvais. D'autres types de cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules existent mais ils sont moins fréquents : les tumeurs carcinoïdes, les carcinomes adénoquameux, les carcinomes sarcomatoïdes par exemple.

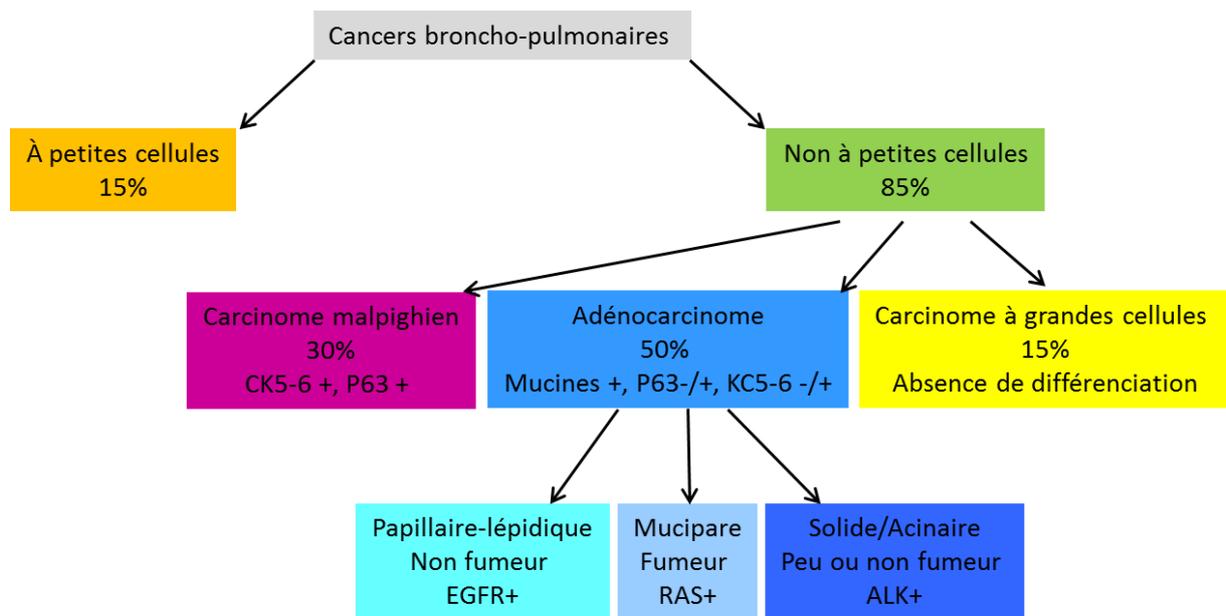


Figure 6 : Classification des cancers broncho-pulmonaires (inspiré de Lantuéjoul et al 2011³⁵)

Le traitement de référence pour le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules est la chirurgie si le stade et l'état du patient le permettent, avec éventuellement une chimiothérapie. En cas de CBNPC de stade I chez des patients inopérables, la radiothérapie stéréotaxique sera recommandée. Pour les stades II inopérables, la radiothérapie conformationnelle est recommandée, avec éventuellement une chimiothérapie. Pour les stades

III inopérables, c'est la chimiothérapie ou la chimioradiothérapie qui est recommandée. Pour les stades IV, métastatiques, le traitement est discuté en fonction du statut moléculaire de la tumeur.

b. Les tumeurs broncho-pulmonaires à petites cellules

Le cancer broncho-pulmonaire à petites cellules est un carcinome neuroendocrinien, agressif, métastasant rapidement et de mauvais pronostic. Les tumeurs neuro-endocrines sont dues au développement anarchique des cellules neuro-endocrines présentes dans l'épithélium respiratoire. Il est caractérisé comme une tumeur épithéliale maligne composée de petites cellules avec un cytoplasme maigre, des frontières cellulaires mal définies, une chromatine nucléaire finement granulaire et des nucléoles absentes ou peu visibles par la classification des tumeurs de 2015 de l'OMS. Plus de 90% des cas de CBPC surviennent chez les gros fumeurs ou anciens gros fumeurs. La majorité des cas de CBPC sont mutés pour *TP53* et *Rb1*, des gènes suppresseurs de tumeurs³⁶. Ces cancers sont accompagnés de syndromes paranéoplasiques : symptômes ou syndrome dus à une tumeur mais dont l'effet tumoral se fait à des localisations éloignées de la tumeur primitive. Parfois, leur diagnostic précède celui du cancer, ces syndromes peuvent donc servir d'outil de diagnostic. Du fait de la nature neuroendocrine de ces tumeurs, les symptômes sont endocriniens ou neuronaux. Les symptômes endocriniens sont dus à la production ectopique d'hormones par les cellules tumorales et les symptômes neuronaux, dus à la production d'anticorps anti-neuronaux. Les syndromes endocriniens les plus fréquents sont la production inappropriée d'*Antidiuretic Hormone* (ADH) et le syndrome de Cushing, associé à une production inappropriée d'*Adenocorticotrophic Hormone* (ACTH)³⁷. Le CBPC représente une urgence thérapeutique et doit être pris en charge rapidement. Le traitement de référence est la chimiothérapie pour les stades I à III, éventuellement la radiothérapie. Une irradiation prophylactique crânienne peut également être réalisée pour éviter les métastases cérébrales. Pour les stades IV et III non irradiables, la chimiothérapie reste le traitement de référence³⁴. Ces tumeurs répondent généralement bien à la chimiothérapie mais le taux de rechute est élevé, probablement à cause de la présence de clones résistants au traitement³⁶.

Chapitre III : Histoire de la prise en charge des tumeurs pulmonaires

Nous avons vu dans le chapitre précédent que l'arsenal thérapeutique contre le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules comprend la chirurgie, la radiothérapie ainsi que la chimiothérapie. La chimiothérapie étant réservée aux stades avancés métastatiques, la chirurgie et la radiothérapie sont les traitements les plus fréquemment utilisés. Dans ce chapitre, nous allons retracer l'histoire de ces deux techniques dans le cadre de la prise en charge thérapeutique du cancer broncho-pulmonaire.

Les débuts de la prise en charge des cancers pulmonaires remontent au début du XX^{ème} siècle. En effet, avant les années 1930, le cancer broncho-pulmonaire était une maladie rare, comme en témoigne Alton Ochsner (1896-1981), chirurgien: « *As a junior student in 1919 at Washington University, I recall very vividly seeing a patient with cancer of the lung who was admitted to the Barnes Hospital. As is usual, the patient died. Dr Georges Dock, our eminent professor of medicine, who was also a great pathologist, insisted upon having the two senior classes witness the autopsy because he said the condition was so rare he thought we might never see another case as long as we lived. [...] I did not see another case until 1936, seventeen years later, when in a period of six months, I saw nine cases of cancer of the lung.* »³⁸ Cette augmentation du nombre de cas de cancer du poumon est liée à l'apparition de la cigarette en 1843 qui va s'imposer comme un produit de consommation courante après la Première Guerre Mondiale.

1. La chirurgie

Les premiers actes chirurgicaux remontent au Néolithique (-8500 à -3000 ans avant J.-C.). Des traces de trépanation cicatrisées ont été retrouvées sur des crânes datant du Néolithique. Le papyrus d'Ebers, rédigé entre 1 600 et 1 400 ans avant J.-C., décrit, entre autres, des procédures chirurgicales pour les fractures, les abcès et les tumeurs. Des descriptions d'actes chirurgicaux sont également présentes dans le Corpus Hippocratique, datant de la Grèce antique. Cependant, ce n'est qu'avec la mise au point de l'anesthésie générale à base d'éther en 1846 que l'ère de la chirurgie thoracique débuta. Pourtant, sous anesthésie à l'éther, le taux de mortalité était très élevé à cause de l'hypoxie du patient causée par le pneumothorax qu'induit l'ouverture de la cage thoracique³⁹. En 1909, la ventilation mécanique à pression positive mise au point par Samuel Meltzer (USA), permet la ventilation pendant l'anesthésie. En 1928, Guedel et Waters (USA) mettent au point un tube endotrachéal en caoutchouc muni d'un brassard gonflable qui permet une ventilation à pression positive contrôlée. Ainsi, le pneumothorax est évité et le poumon controlatéral est ventilé

normalement. Les procédures complexes deviennent donc possibles. Pourtant, la première résection pulmonaire pour traiter une tumeur pulmonaire périphérique est réalisée en 1861 par Jules Emile Péan, un chirurgien français³⁸. En 1914, Chevalier Jackson (USA) utilise pour la première fois la bronchoscopie pour la résection d'une tumeur broncho-pulmonaire⁴⁰. Le 5 avril 1933, Evarts A. Graham (USA) (**Figure 7**) réalise la première pneumonectomie réussie, sur le Dr James Gilmore, 48 ans, pour un carcinome central sur le lobe supérieur gauche. Ce qui devait être une lobectomie fut finalement la première pneumonectomie de l'histoire à cause de l'extension du carcinome au niveau de la bronche inférieure et du lobe inférieur ainsi qu'à une scissure incomplète entre les deux lobes⁴¹. Pour une trentaine d'années, la pneumonectomie devient le traitement de référence pour le cancer du poumon, malgré un taux élevé de complications et de mortalité.



Figure 7 : Evarts Ambrose Graham, chirurgien thoracique américain, pionnier des résections pulmonaires

La lobectomie est alors comparée à la pneumonectomie et prend place de traitement de référence en 1962 suite à l'étude Shimkin et al montrant une survie équivalente et moins de complications post-opératoires pour la lobectomie⁴². Quelques années plus tard, les chirurgiens se sont intéressés à la résection sub-lobaire, notamment pour les patients à risque pour la chirurgie. Une étude prospective et randomisée du *Lung Cancer Study Group* (USA) sur la résection sub-lobaire pour les stades précoces de CBNPC (stade I) a montré en 1995 que la résection sub-lobaire engendrait trois fois plus de récurrences locales et une diminution globale de la survie⁴³. La lobectomie est donc restée le traitement de référence. Cependant, avec les progrès de l'imagerie médicale pour le diagnostic et la mise en place d'un dépistage accru du cancer du poumon, les tumeurs sont détectées à des stades bien plus précoces et sont de plus petite taille. Pour ce type de tumeur, la résection sub-lobaire est équivalente à la

lobectomie³⁹. Ces techniques, quoi qu'il en soit, nécessitent une thoracotomie, c'est-à-dire une grande incision permettant l'écartement des côtes. Ainsi, le chirurgien a un accès direct aux poumons avec les deux mains. Dans les années 1990, la chirurgie assistée par vidéo ou thoracoscopie se développe. La thoracoscopie est une technique de chirurgie mini-invasive. Elle décrit une procédure chirurgicale avec un nombre variable d'incisions, inférieures à 8 cm. Ces incisions permettent l'accès de l'endoscope et des instruments rigides. Cette technique dépend de la visualisation thoracoscopique et évite complètement l'écartement ou la coupe des côtes⁴⁴. Ces deux techniques ont été comparées : la thoracotomie a été associée avec une plus grande morbidité, une moins bonne survie, ainsi qu'à des névralgies dues à l'irritation des nerfs intercostaux. La chirurgie thoracique assistée par vidéo est cependant limitée par son manque de précision, dû à la rigidité des instruments et à l'absence de visualisation tridimensionnelle. Elle est donc limitée à la résection de tumeurs broncho-pulmonaires non à petites cellules périphériques, de stade précoce et sans adénopathies³⁹. Toujours dans les années 1990, sont développés les premiers robots chirurgicaux : en 1992 le Robodoc® pour la pose de prothèses de hanche et en 1998, le robot DaVinci®, première version standard de robot chirurgical. Ces plateformes utilisent une caméra haute résolution, tridimensionnelle et des instruments articulés capables de s'insérer dans des incisions de 8 mm. Le chirurgien contrôle le robot via une console. Ces robots chirurgicaux permettent des actes précis, ce qui résout les limitations de la chirurgie thoracique vidéo assistée. La chirurgie thoracique robotisée est aujourd'hui utilisée en routine pour tous les cas de CBNPC (tumeurs périphériques ou centrales, pneumonectomie, bronchoplastie). Comparée à la thoracotomie, elle diminue la mortalité, les complications péri-opératoires et diminue la durée d'hospitalisation. Comparée à la chirurgie thoracique assistée par vidéo, il y a peu de différences mais elle permet de diminuer l'utilisation des narcotiques et permet un retour aux activités normales plus rapide³⁹. En matière d'efficacité, la lobectomie robotisée présente de bons résultats. Avec un suivi médian de 27 mois, la survie globale à 5 ans est de 80%. La survie à 5 ans est comprise entre 88% et 91% pour les stades I³⁹.

2. La radiothérapie normo-fractionnée : des débuts à aujourd'hui

Aujourd'hui, en plus de la chirurgie, la radiothérapie est un outil thérapeutique incontournable dans la gestion des tumeurs bronchopulmonaires.

La radiothérapie est le traitement locorégional des cancers. Elle utilise des rayonnements ionisants pour stopper le développement et tuer les cellules cancéreuses.

L'histoire de la radiothérapie commence par la découverte des rayons X par William Röntgen, physicien allemand, en Novembre 1895. Ces rayonnements, rendant visible l'intérieur du corps, sont rapidement utilisés à des fins diagnostiques et les premiers appareils de radiographie sont développés rapidement. En juillet 1896, 5 mois à peine après la découverte des rayons X, a lieu la première radiothérapie anti-cancéreuse de l'histoire. Victor Despeigne, médecin lyonnais, traite un patient pour ce qu'il pense être un cancer de l'estomac. Il a irradié son patient, deux fois par jour (tôt le matin et tard le soir) grâce à un tube à rayons X, pendant 8 jours et lui a administré un traitement accessoire. Du 4 au 12 juillet, Despeigne a noté une diminution de la douleur, jusqu'à se passer des narcotiques ainsi qu'une diminution sensible de la taille de la tumeur⁴⁵. Cependant, son patient décède le 24 juillet 1896 (**Figure 8**).

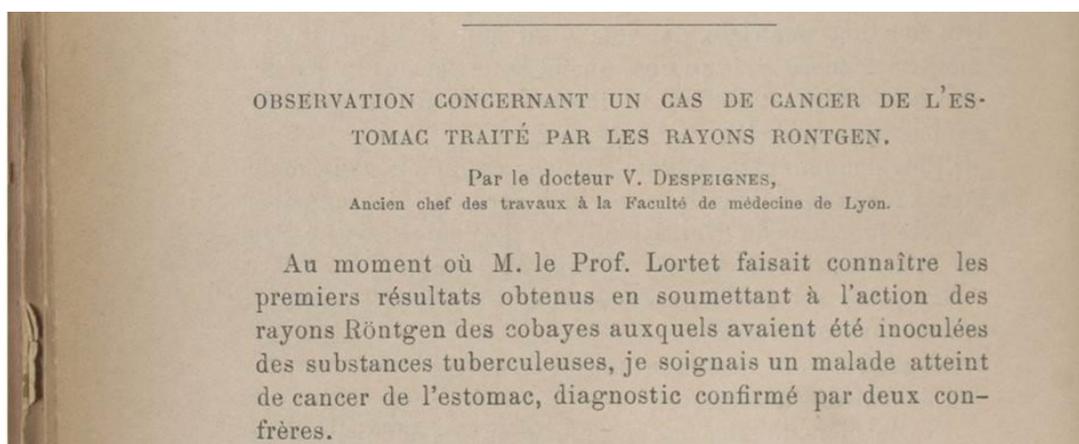


Figure 8 : Article de Victor Despeigne publié dans le Lyon Médical le 26 juillet 1896

(source : Gallica.bnf.fr/ BNF/ Bibliothèque de l'Université Claude Bernard Lyon 1)

Aujourd'hui, les radiothérapeutes doutent que le patient de Despeigne ait été atteint d'un cancer de l'estomac. Au vu de la réponse rapide aux rayons X, les radiothérapeutes pensent que cette tumeur était en réalité un lymphome gastrique⁴⁶. Le premier traitement réussi par radiothérapie est attribué à Eduard Schiff, un médecin allemand, qui traita un lupus érythémateux en 1897. En décembre 1898, Pierre et Marie Curie découvrent le Radium. Deux ans plus tard les effets du radium sur la peau sont décrits par Otto Walkhof et Friedrich Giesel. Ces travaux seront confirmés par Henri Becquerel et Pierre Curie en 1901 avec leur note « *L'action physiologique des rayons du radium* » (Comptes rendus de l'Académie des Sciences, tome 132, 3 juin 1901). En 1901, la curiethérapie voit le jour : elle consiste à mettre

en contact direct une source de radium et la tumeur. Quelques années plus tard, les bases de la radiobiologie vont être établies. D'abord par Jean Bergonié (radiologiste) et Louis Tribondeau (histologiste), avec leur loi, énoncée en 1906 : « *Les rayons X agissent avec d'autant plus d'intensité sur les cellules que l'activité reproductrice de ces cellules est plus grande, que leur devenir karyocinétique est plus long, que leur morphologie et leurs fonctions sont moins définitivement fixées* » (Comptes Rendus de l'Académie des Sciences du 10 décembre 1906). La même année, Claudius Regaud, histologiste, met en évidence la radiosensibilité des spermatogonies souches dont il se servira pour réfuter la loi de Bergonié et Tribondeau. En effet, il décortique point par point les arguments de Bergonié et Tribondeau et y oppose des contre-exemples, notamment basés sur ses observations sur la spermatogénèse⁴⁷ (**Figure 9**).

*Liqué spermaticque du testicule
adulte : les générations dites spermatogonies
sont beaucoup plus sensibles que les
générations suivantes dites auxocytes,
cellules d'Ébner et spermies.*

*Liqué spermaticque du testicule impubère :
les générations dites spermatogonies
sont beaucoup moins sensibles que les
générations dites spermatogonies du testicule
adulte (qui forment leur succédent)*

*La loi de Bergonié - Tribondeau
est donc inexacte.*

Figure 9 : note manuscrite de Claudius Regaud où il explique que la loi de Bergonié et Tribondeau est inexacte. (source : Foray N. 2012⁴⁷)

Il montre également qu'une dose unique de rayons X suffisante pour déclencher des lésions graves à la peau et la stérilisation des testicules chez le lapin, lorsqu'elle est fractionnée sur plusieurs jours, stérilise le lapin mais n'entraîne pas de lésion cutanée. Ces observations sur la stérilisation des testicules de lapin seront la base du principe de fractionnement en radiothérapie. C'est Henri Coutard qui appliquera les principes de Regaud à la clinique : Coutard met au point « la méthode Coutard » ou « méthode de fractionnement

prolongé », consistant à administrer une forte dose de rayons X en fractions de faibles doses journalières sur une certaine période de temps. En 1934, Coutard publie un papier : « Principles of X-ray therapy of malignant diseases »⁴⁸, dans lequel il met l'accent sur l'effet du fractionnement de la dose sur le tissu conjonctif ainsi que sur la radiosensibilité de la tumeur selon différents types de cancers. Aujourd'hui ce principe de fractionnement de la dose est toujours appliqué. Les débuts de la radiothérapie se sont faits avec des tubes à rayons de X de bas voltage (<150kV) puis à des voltages un peu plus élevés (200/500 kV) dont les rayons étaient peu pénétrants. Il était donc difficile de traiter des tumeurs profondes. Avec la découverte en 1934 de la radioactivité artificielle par Irène et Frédéric Joliot-Curie (France), la production de radio-isotopes artificiels pour la radiothérapie est possible. Les premières sources de Cobalt 60 ont pu être produites à partir de 1941 grâce à l'équipe du physicien Glenn Seaborg au Lawrence Berkeley National Laboratory (USA). Les sources de Cobalt 60 remplacent le Radium, plus rare et plus cher. Les rayonnements gamma du Cobalt étant plus pénétrants, les bombes à Cobalt permettent le traitement de tumeurs plus profondes. Puis des appareils dédiés sont développés dans les années 1950 : en 1951, le premier traitement à la télécobalthérapie est réalisé au Canada. Ce type d'appareil sera utilisé jusque dans les années 2010 en France. L'un des tournants majeurs dans l'histoire de la radiothérapie est l'apparition des accélérateurs linéaires de particules médicaux ou LINAC médicaux. Les accélérateurs linéaires de particules médicaux génèrent des rayons X de haute énergie grâce à un faisceau d'électrons interagissant avec une électrode. Le premier LINAC médical est installé à Londres en 1952, le premier patient sera traité l'année suivante. Les LINAC sont les machines les plus utilisées pour la radiothérapie externe. Actuellement les LINAC sont utilisés pour la radiothérapie conventionnelle, la radiothérapie guidée par l'image, la radiothérapie stéréotaxique extra-crânienne et la radiochirurgie. Aujourd'hui quand on parle de radiothérapie conventionnelle, normo-fractionnée à 2 Gy par fraction, 5 jours par semaine sur 5 à 8 semaines, ce terme regroupe en fait, la Radiothérapie Conformationnelle 3D (3D-CRT) et la Radiothérapie Conformationnelle à Modulation d'Intensité (RCMI), toutes deux utilisées pour le traitement du cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules. La 3D-CRT est la technique la plus fréquemment utilisée. Elle fait correspondre au maximum le volume irradié avec le volume tumoral afin de délivrer une dose efficace à la tumeur tout en limitant l'exposition des tissus sains⁴⁹. La 3D-CRT fait partie des traitements curatifs du thorax mais également de la prostate, du pelvis, de l'abdomen et de la sphère ORL et du cerveau. La mise en place du traitement commence par la contention personnalisée du patient grâce à des systèmes de contention à base de résine thermoformée ou en mousse de polyuréthane.

Ensuite, le patient passe un scanner de dosimétrie : en position de traitement avec différentes coupes pendant les différentes phases de la respiration. Ce scanner est transféré au logiciel de planification de traitement. Les organes à risque sont alors délinés et les différents volumes sont définis : Le *Gross Tumor Volume* (GTV) correspondant au volume tumoral, le *Clinical Target Volume* (CTV) correspondant à l'extension microscopique, l'*Internal Target Volume* (ITV) correspondant au volume prenant en compte les mouvements respiratoires et cardiaques et pour finir, le *Planning Target Volume* (PTV), c'est le volume cible planifié (**Figure 10**). Ces volumes sont définis en 3 dimensions. La dose totale à délivrer ainsi que le fractionnement sont alors précisés. Ensuite, vient l'étape de dosimétrie, où la position des faisceaux de même intensité, l'énergie des photons, la répartition de la dose par faisceau, la position des lames du collimateur multi-lames (en RCMI) sont déterminées. Les courbes isodoses, reliant les points recevant la même dose et les contraintes de doses sont alors calculées⁴⁹. En radiothérapie normo-fractionnée pulmonaire, les organes à risque sont les poumons droit et gauche en dehors de la tumeur, le cœur, l'œsophage, le plexus brachial et la moelle épinière. Les contraintes de doses sont la dose moyenne au poumon (<20 Gy), le volume pulmonaire recevant 20 Gy ou plus (V_{20Gy}) (<40%), la dose maximale à la moelle épinière (45 Gy) et le volume cardiaque recevant 45 Gy ou plus (<66%).

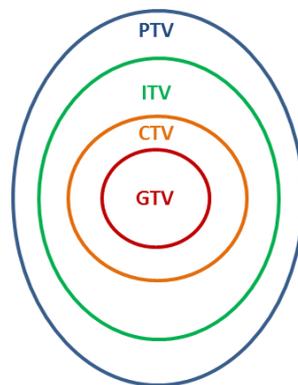


Figure 10 : les différents volumes définis lors de la planification du traitement en radiothérapie conventionnelle

La RCMI est une technique innovante, de plus en plus utilisée pour le thorax, notamment pour les tumeurs proches de la moelle épinière ou du cœur. Cette technique permet d'avoir un fort gradient de dose entre le CTV et le volume de tissus à épargner. La délinéation doit de ce fait être très précise et la dosimétrie est complexe. La précision de la position du patient est donc essentielle et est vérifiée par *Cone Beam Computed Tomography*

(CBCT). La RCMI nécessite un LINAC équipé d'un collimateur multi-lames mais également d'un logiciel de planification de traitement adapté. En effet, le flux de photons est modulé dans son intensité par le mouvement des lames du collimateur⁴⁹. Pour la RCMI, les faisceaux sont statiques mais des variantes de la RCMI ont des faisceaux rotationnels : par exemple la radiothérapie avec modulation d'intensité volumétrique par arc-thérapie (VMAT). Dans ce cas, le bras du LINAC décrit un arc de cercle. Une autre variante de la RCMI est la tomothérapie où la RCMI est en fait administrée sur un appareil dédié, le Tomotherapy^R : un accélérateur miniaturisé est associé à un scanner. Cette fois, en plus de l'arc décrit par le bras de l'accélérateur, la table de traitement a un mouvement longitudinal. De cette façon, le traitement est administré de façon hélicoïdale⁵⁰. La RCMI confère un avantage dosimétrique par rapport à la 3D-CRT : le V_{20Gy} pulmonaire diminue⁵¹. Yom et al, obtiennent des V_{20Gy} pulmonaires de 35% avec la RCMI et de 38% avec la 3D-CRT⁵². Liao et al confirme ces données avec des V_{20Gy} pulmonaires de 34% et 37% respectivement⁵³. Ces deux études montrent également un volume recevant 5 Gy (V_{5Gy}), de 63 à 64% pour la RCMI alors qu'il est de 57% pour la 3D-CRT, le volume de tissus sains irradié à des doses plus faibles est donc plus important. La survie était meilleure en RCMI qu'en 3D-CRT dans l'étude de Liao et al. En termes de toxicité, moins de pneumopathies radiques à 12 mois sont rapportées après RCMI que 3D-CRT. Une étude de Chun et al montre que la RCMI est associée avec un risque moindre de pneumopathie radique⁵⁴. Dans une étude de Koshy et al, la RCMI est associée à une meilleure survie que la 3D-CRT⁵⁵. Ces dernières années, les progrès de l'imagerie et de la radiothérapie ont permis l'émergence de la radiothérapie guidée par l'image (IGRT) : le LINAC est associé à un dispositif d'imagerie. L'IGRT permet d'acquérir des images anatomiques du patient, en salle, en position de traitement et permet donc de visualiser les changements survenant pendant le traitement : la dosimétrie est ainsi adaptée à la régression tumorale par exemple. Ceci permet de mieux délivrer la dose à la tumeur et de mieux protéger les organes à risque en limitant les marges sur le volume cible (CTV)^{49,51}. Une autre façon de mieux délivrer la dose au CTV tout en protégeant les organes à risque est l'asservissement respiratoire durant le traitement. Cette technique permet de prendre en compte ou de diminuer les mouvements respiratoires faisant bouger la tumeur. Quatre techniques sont actuellement disponibles : la respiration superficielle forcée où la compression abdominale diminue l'amplitude des mouvements respiratoires, le gating où l'irradiation a lieu sur un temps de la respiration déterminé à l'avance, le tracking où la tumeur est localisée et suivie par le faisceau d'irradiation⁵¹ et la respiration bloquée où le patient retient sa respiration au moment du tir,

grâce à un spiromètre et des lunettes permettant de visualiser sa courbe respiratoire (**Figure 11**).



Figure 11 : Dispositif d'asservissement respiratoire lors de radiothérapie pulmonaire : la respiration bloquée

Mais l'une des avancées les plus récentes et efficaces en termes de radiothérapie pulmonaire est le développement de la radiothérapie stéréotaxique pulmonaire.

3. La radiothérapie en conditions stéréotaxiques (ou radiothérapie stéréotaxique)

La stéréotaxie est une méthode de localisation des structures cérébrales via un cadre de référence externe en trois dimensions lors d'une procédure chirurgicale mini-invasive. Cette technique a été développée, chez l'animal, par Horsley et Clarke (Royaume-Uni) et publiée en 1908⁵⁶. Ils ont construit le premier cadre de stéréotaxie, utilisant un système de coordonnées cartésien en 1906. Clarke s'en servira, notamment pour créer des atlas d'anatomie cérébrale du singe et du chat. L'application clinique de la stéréotaxie a eu lieu en 1947. Spiegel et Wycis (USA) ont mis au point un cadre de stéréotaxie, basé sur un système de coordonnées cartésien, similaire à celui d'Horsley et Clarke. Le cadre était fixé sur la tête du patient grâce à un plâtre amovible, rendant ainsi l'appareil adapté à la chirurgie et à l'imagerie. La stéréotaxie s'est alors développée et des améliorations y ont été apportées. Lars Leksell (Suède) mit au point un cadre de stéréotaxie basé sur un système de coordonnées polaires (angle, profondeur et position antéro-postérieure). Plus tard, avec l'aide de Jenberg (Suède), il rend son cadre compatible avec la tomodensitométrie. D'autres participèrent au développement de la stéréotaxie. Le cadre de Jean Talairach (France) fut, par exemple, le premier cadre à être

utilisé, en 1982, lors d'une procédure de radiochirurgie associée à un LINAC. Le développement de la radiochirurgie est d'ailleurs dû à John Lawrence et Cornelius Tobias (USA) : dès la fin des années 1940, ils conceptualisent l'utilisation de faisceaux de particules chargées pour modifier ou altérer des structures cérébrales. Puis Leksell leur suggère la méthode stéréotaxique pour guider ces faisceaux de particules. Les premières radiochirurgies ont été administrées, par Leksell en 1953 et par Larsson (Suède) en 1955. La radiochirurgie à faisceaux de particules est étudiée dans différents laboratoires de physique d'Uppsala en Suède, Berkeley et Harvard aux Etats-Unis et Cambridge en Angleterre grâce au synchrocyclotron de Berkeley ou aux différentes installations à faisceaux de protons. En Suède, à Berkeley et à Cambridge, l'accès aux installations était réservé à la recherche physique, l'accès pour la recherche biologique et clinique était difficile. Lars Leksell et différentes équipes de recherche suédoises se sont alors réunis pour concevoir un appareil de radiochirurgie adapté à l'hôpital : le Gamma Knife I vit le jour en 1967 à l'hôpital de Sofiahemmet à Stockholm⁵⁶. Il est composé de 167 sources de Cobalt 60 distribuées dans un secteur sphérique de 70° de latitude et 160° de longitude. Le collimateur fournit un faisceau de section transversale de 2,5 x 7,5 mm avec une pénombre de 0,5 mm au centre du faisceau. Les premiers patients sont traités, en une fraction, pour des malformations artérioveineuses intracrâniennes, des tumeurs cérébrales bénignes et malignes et des désordres fonctionnels, dès décembre 1967. La décroissance des sources de Cobalt 60 du Gamma Knife I conduisit à une révision de l'appareil. Le Gamma Knife II fut installé en 1975 à l'hôpital de Karolinska. Leksell suggère que cette machine pourrait être utilisée pour des traitements fractionnés : l'idée de la radiothérapie stéréotaxique est née. En 1972, Leksell fonde la société Elekta qui commercialise le Gamma Knife. Le premier Gamma Knife commercial a été installé à l'Université de Pittsburg en 1987. En 2007, Elekta sort le Perfexion™ gamma unit (**Figure 12**), équipé de 192 sources de Cobalt arrangées de façon conique, dans 8 secteurs différents, pouvant changer de collimation : 4, 8 ou 16 mm de diamètre. En 2008, 500 000 patients avaient été traités à travers le monde grâce aux différents modèles de Gamma Knife.

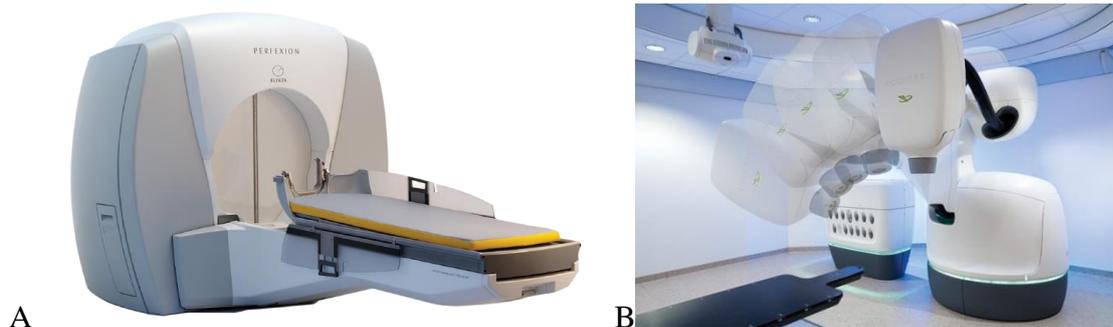


Figure 12 : Appareils de radiothérapie stéréotaxique

A : Le Gamma Knife Perfexion sorti en 2006 (source Elekta, gammaknife.com), B : Le CyberKnife mis au point en 1987 (source Cyberknife.com)

En 1982, le neurochirurgien argentin Osvaldo Betti et l'ingénieur Victor Derechinsky modifient un LINAC médical pour l'adapter à la radiochirurgie. Le lit du LINAC pose tout de suite problème : ils mettent donc au point un fauteuil dans lequel le patient est installé, « la chaise de Betti » ou « Cyclothrone ». Beaucoup d'équipes à travers le monde ont participé au développement de la radiochirurgie associée au LINAC tout au long des années 1980. Le premier LINAC pour la radiochirurgie est commercialisé à la fin des années 1980 par Philips Medical : le SRS 200. Il est équipé d'un bras isocentrique et de collimateurs circulaires allant de 10 à 32 mm et est associé à système de planification de traitement basé sur la tomographie. En 1992, le premier collimateur micro-multi-lames est mis au point pour la radiochirurgie. Les années 1990 voient également l'apparition de machines dédiées pour la radiochirurgie associée au LINAC. En 1989, John Adler, neurochirurgien, conceptualise une machine de radiochirurgie constituée d'un LINAC compact robotisé, sans cadre stéréotaxique, en utilisant la superposition de deux images radiographiques pour la localisation⁵⁶. Le CyberKnife recevra son autorisation d'utilisation en 2001. Aujourd'hui le CyberKnife (**Figure 12**) est une machine utilisée en routine pour les traitements en conditions stéréotaxiques, intracrâniens et extracrâniens. D'autres LINAC dédiés à la radiochirurgie ont été développés : le 600SR (Varian), le C-arm LINAC (Mitsubishi), le Novalis. Face au succès et à l'efficacité de la radiochirurgie crâniale, son application à des tumeurs extracrâniennes pour des traitements à forte dose par fraction est évaluée dans les années 1990. La principale limite de cette application extra-crânienne est la contention du patient. Contrairement aux localisations intracrâniennes, les localisations corporelles sont sujettes aux mouvements internes des organes et aux mouvements externes du patient. Dans un premier temps, des cadres corporels de stéréotaxie ont été développés par Lax et l'équipe de l'hôpital de

Karolinska en Suède : ils sont associés à un dispositif de compression du thorax et de l'abdomen pour limiter les mouvements respiratoires. Le cadre était conçu pour être utilisé avec un scanner grâce à des repères radio-opaques intégrés dans le cadre de stéréotaxie. En 2003, Yenice et al décrivent un système de cadre stéréotaxique corporel combiné à l'image scanner quotidienne pour le repositionnement du patient. Shiu et al, eux proposent l'installation d'un scanner sur des rails dans la salle de traitement. Aujourd'hui, la technologie *Cone Beam Computed Tomography* (CBCT) est largement utilisée pour la localisation du PTV mais également pour l'évaluation des variations anatomiques intrafractions (mouvements respiratoires et cardiaques) et interfractions (perte de poids, modification du volume tumoral). Le développement de la radiothérapie stéréotaxique extracrânienne pulmonaire est également supporté par le développement de méthodes d'asservissement respiratoire telles que la compression abdominale, le gating ou le tracking mentionnés précédemment. De nouvelles techniques de gestion des mouvements du volume cible se développent : l'adaptation en temps réel de la forme et de la position des faisceaux grâce aux mouvements des lames du collimateur multi-lames permet de suivre les mouvements de la tumeur, c'est le *tracking multi-leaf collimator* (tracking MLC). Les tables de traitement robotisées peuvent également servir à compenser les mouvements de la cible. Depuis quelques années, se développe un système de gating associé à l'imagerie par résonance (IRM) : en effet l'IRM permet d'obtenir un meilleur contraste au niveau des tissus mous comme le poumon⁵⁷. L'IRM associée à la radiothérapie stéréotaxique pulmonaire pourrait permettre d'améliorer la délimitation des organes à risque, le positionnement du patient, le contrôle des mouvements internes et les adaptations. Ceci pourrait améliorer la qualité de la radiothérapie stéréotaxique pulmonaire, notamment en améliorant sa précision, permettant de délivrer des doses plus fortes⁵⁸.

Aujourd'hui, la radiothérapie stéréotaxique extracrânienne est définie comme « *une méthode de radiothérapie externe utilisée pour délivrer de fortes doses de rayonnements à une cible extracrânienne, dans le corps, utilisant soit une dose unique, soit un petit nombre de fractions* »⁵⁹. Pour la radiothérapie stéréotaxique, les doses sont dites ablatives : elles permettent l'ablation de la tumeur et des tissus situés dans le PTV grâce à la mort cellulaire et aux dommages vasculaires induits par de telles doses. Ces fortes doses peuvent être délivrées au PTV grâce à la précision millimétrique de la radiothérapie stéréotaxique ainsi qu'à la forte

décroissance de dose en dehors du PTV : elle permet d'épargner au maximum les tissus sains. Actuellement, la radiothérapie stéréotaxique est indiquée pour :

- des localisations intracrâniennes : métastases cérébrales, méningiomes, neurinomes de l'acoustique, tumeurs pituitaires, malformations artério-veineuses, névralgie du nerf trijumeau.
- des localisations extracrâniennes : lésions médullaires, oligométastases pulmonaires, osseuses ou hépatiques, cancer de la prostate, carcinomes hépatocellulaires inopérables, cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules de stade I inopérables. La radiothérapie stéréotaxique peut également être indiquée pour des ré-irradiations des voies aéro-digestives supérieures ou en cas de récidives pelviennes.

La radiothérapie stéréotaxique est donc une technique de pointe. Elle permet d'irradier de très petits volumes grâce à la convergence de mini-faisceaux au centre de la cible. Sa précision est submillimétrique. C'est une technique de radiothérapie guidée par l'image dont l'avantage majeur est la décroissance de dose rapide en dehors du volume cible. Ainsi l'irradiation des tissus sains est limitée. Cette amélioration de la balistique autorise l'utilisation de fortes doses par fraction, des doses dites ablatives, allant de 6 à 20 Gy. L'utilisation de ces fortes doses par fraction a fait émerger une nouvelle radiobiologie pour les tissus sains et la tumeur, qui explique l'efficacité clinique de la radiothérapie stéréotaxique (chapitre 6, section 4). Actuellement, la radiothérapie stéréotaxique est indiquée en cas de cancer bronchopulmonaire non à petite cellules de stade précoce, sans invasion ganglionnaire ni métastases, avec une taille tumorale inférieure à 7 cm. Globalement, la radiothérapie stéréotaxique est une excellente alternative thérapeutique pour les patients inopérables ou refusant la chirurgie, qui reste la première intention. Le taux de contrôle local est bon, allant de 86 à 98% à 3 ans⁶⁰. Le taux de survie spécifique est de 73 à 82% et la survie globale de 43 à 57%⁶¹. En 2017, les recommandations de l'*European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) pour la radiothérapie stéréotaxique pulmonaire sont de ne pas utiliser de fortes doses par fraction sur les tumeurs ultra-centrales et de diminuer les doses afin de les adapter aux organes à risque présents dans le champ d'irradiation. Le patient doit être dans une position stable et reproductible avec les bras au-dessus de la tête, que ce soit pour l'acquisition d'images ou le traitement. Les stratégies d'asservissement respiratoire ne sont pas obligatoires mais vivement recommandées (**Figure 13**).



Figure 13 : Positionnement et technique d'asservissement respiratoire (compression abdominale) en radiothérapie stéréotaxique pulmonaire (source : meditest.fr)

L'image scanner de planification doit inclure l'ensemble des poumons : du cartilage cricoïde jusqu'à la deuxième vertèbre lombaire. Le CT-4D est fortement recommandé car il permet d'avoir des images de la tumeur pour chaque phase respiratoire, les mouvements de la tumeur sont ainsi mieux pris en compte. La tomographie par émission de positons couplée au FluorodésoxyGlucose (FDG), via un protocole standard, est fortement recommandée pour la planification du volume cible. Au niveau de la mise en place du traitement, les calculs de doses doivent être réalisés avec des algorithmes de type B ou de type Monte Carlo qui permettent une meilleure précision de calcul de la distribution de dose. L'orientation des faisceaux doit être choisie de façon à minimiser l'exposition des organes à risque tout en conservant l'exposition du volume cible⁶². En matière d'efficacité, quand la radiothérapie stéréotaxique pulmonaire est comparée à la radiothérapie conformationnelle en 3D, l'étude de Widder et al conclut que la survie globale et le contrôle local sont meilleurs après radiothérapie stéréotaxique : survie globale à 48 % pour la 3D-CRT contre 72% pour la radiothérapie stéréotaxique, et un contrôle tumoral de 78% pour la 3D-CRT et 95% pour la radiothérapie stéréotaxique. La qualité de vie globale, la fonction pulmonaire et les dyspnées étaient stables après radiothérapie stéréotaxique⁶³. L'essai clinique randomisé de phase II *Stereotactic Precision And Conventional radio-therapy Evaluation (SPACE)*, compare également l'efficacité de la radiothérapie stéréotaxique et de la 3D-CRT. Les patients traités par 3D-CRT ont eu une aggravation de leur dyspnée, douleurs thoraciques et toux. Les auteurs n'ont pas trouvé de différence de survie globale entre les deux traitements. Le contrôle

local est meilleur avec la radiothérapie stéréotaxique et les patients ont une meilleure qualité de vie liée à la santé ainsi que moins de toxicité radio-induite que les patients traités par 3D-CRT⁶⁴. Les derniers résultats publiés concernant la comparaison de la radiothérapie stéréotaxique pulmonaire versus la radiothérapie conventionnelle sont ceux de l'essai clinique randomisé de phase II CHISEL pour les CBNPC de stade I. Ils concluent que le traitement par radiothérapie stéréotaxique procure un meilleur contrôle local de la maladie sans augmenter le risque de toxicité⁶⁵. L'essai clinique de phase 2 randomisé RTOG0915 compare deux types de traitement par radiothérapie stéréotaxique pour des CBNPC de stade I : 34 Gy en une fraction ou 48 Gy en quatre fractions. Ces deux protocoles n'ont pas entraîné de toxicité particulière et le taux de contrôle local à 5 ans est similaire. L'efficacité des deux traitements est également similaire avec une survie à 4 ans comparable⁶⁶. Une autre étude de Koshy et al met en évidence que des doses plus importantes, avec une *Biological Effective Dose* pour un ratio α/β de 10 Gy (BED_{10Gy}) supérieure à 150 Gy sont plus efficaces pour les patients atteints de CBNPC de stade II : les patients ont une meilleure survie que ceux traités avec une BED_{10Gy} inférieure à 150 Gy⁶⁷. Toutes ces études sont en accord avec le fait que la radiothérapie stéréotaxique est également plus pratique pour les patients et les praticiens : le nombre de séances de traitement est généralement réduit de trente-cinq à trois. De plus la radiothérapie stéréotaxique diminue le coût du traitement⁶⁸. Toutes ces données font de la radiothérapie stéréotaxique pulmonaire le traitement de référence pour les patients inopérables ou refusant la chirurgie atteints de cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules de stade précoce.

Chapitre IV : Le poumon en radiothérapie stéréotaxique

Le poumon supporte bien la radiothérapie stéréotaxique grâce à son organisation tissulaire. Les effets indésirables les plus fréquents après radiothérapie stéréotaxique pulmonaire sont la pneumopathie radique aiguë et la fibrose pulmonaire radio-induite. Cependant, une attention particulière doit être apportée aux organes à risque dont l'organisation tissulaire ne permet pas de supporter de fortes doses par fraction. Ces organes à risque sont responsables du développement des effets secondaires et vont, lors de la planification du traitement, limiter la dose pouvant être délivrée à la tumeur.

1. Le poumon, un bon candidat pour la radiothérapie stéréotaxique

La réponse des tissus sains aux fortes doses de rayonnements ionisants et donc l'apparition des complications dépendent de la nature et de l'organisation de l'organe. Les tissus à renouvellement rapide sont des organes hiérarchisés, c'est-à-dire que leur compartiment fonctionnel est clairement séparé de leur compartiment prolifératif, responsable du renouvellement du tissu. En cas d'irradiation, les lésions apparaîtront rapidement, en fonction de la durée de vie des cellules fonctionnelles : plus le taux de renouvellement cellulaire est élevé, plus la durée de vie des cellules fonctionnelles est courte. La cicatrisation dépendra, elle, du nombre de cellules souches et progénitrices restantes. La peau ou l'intestin sont des organes hiérarchisés et ont un renouvellement rapide. Au contraire, les organes non hiérarchisés ont un renouvellement tissulaire lent. Ils n'ont pas de compartiment prolifératif distinct mais possèdent différents types cellulaires différenciés capables d'auto-renouvellement. Le renouvellement du tissu a lieu en cas de lésion. Cette fois, en cas d'irradiation, les lésions apparaîtront plus tardivement : les cellules fonctionnelles de l'organe ont une durée de vie plus longue. Le poumon, par exemple, est un organe non hiérarchisé. Il ne possède pas de compartiment prolifératif mais les cellules club et les pneumocytes de type II sont capables de proliférer et de se différencier en cas de lésion pour repeupler les alvéoles pulmonaires.

Un autre paramètre à prendre en compte dans la réponse aux fortes doses de rayonnements ionisants d'un organe est son architecture macroscopique. Les organes peuvent être organisés en série ou en parallèle. Les organes organisés en série possèdent des sous-unités fonctionnelles dépendantes les unes des autres. Pour que l'organe fonctionne, l'ensemble de ses sous-unités lui est nécessaire. Si l'une d'entre elles perd sa fonction, l'organe perd également sa fonction. Ce sont des organes sensibles à la dose maximale reçue : la dose maximale (D_{\max}) déterminera l'apparition d'effets secondaires⁶⁹. L'intestin, la moelle épinière,

la trachée et les bronches souches et segmentaires sont des organes en série. A l'inverse, les organes organisés en parallèle possèdent des sous-unités fonctionnelles indépendantes. Si l'une des sous-unités fonctionnelles est endommagée, les autres fonctionnent sans être affectées par la sous-unité dysfonctionnelle. Le parenchyme pulmonaire est organisé en parallèle : les lobules pulmonaires, ses sous-unités fonctionnelles, fonctionnent indépendamment les uns des autres. C'est grâce à cette indépendance fonctionnelle des lobules pulmonaires que le poumon est un bon candidat pour la radiothérapie stéréotaxique. Effectivement, les organes en parallèle supportent mieux les fortes doses mais sont sensibles au volume irradié. L'apparition des effets secondaires dépendra plutôt du volume recevant une certaine dose (V_{xGy})⁶⁹. La radiothérapie stéréotaxique consiste à administrer de fortes doses sur de très petits volumes. Le poumon, par son organisation fonctionnelle, tolère des « points chauds », ce qui en fait un bon candidat pour ces nouvelles modalités de traitements. Néanmoins, dans ce contexte comme en radiothérapie conventionnelle, l'exposition des organes à risque est responsable de l'apparition d'effets secondaires.

2. Les organes à risque en radiothérapie stéréotaxique thoracique

Les organes à risque sont les organes ou tissus sains présents dans le champ d'irradiation ou le trajet des faisceaux. Ils limitent la dose pouvant être délivrée à la tumeur et sont responsables du développement des effets indésirables. L'une des clés du traitement par radiothérapie stéréotaxique est d'éviter l'irradiation des organes à risque, notamment grâce au fort gradient de dose et à la délimitation de ces organes lors de la planification du traitement, évitant ainsi l'apparition des effets indésirables.

Le premier organe à risque en radiothérapie stéréotaxique thoracique est le poumon sain. Les principales toxicités liées à l'irradiation de tissus pulmonaires sains sont la pneumopathie radique et la fibrose pulmonaire radio-induite. La pneumopathie radique concerne jusqu'à 28% des patients en précoce. La fibrose pulmonaire radio-induite concerne 3 à 12% des patients en tardif⁶⁰. Une attention particulière sera portée aux patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique ou toute autre pathologie pulmonaire interstitielle : la radiothérapie leur est déconseillée car leur pathologie augmente leur risque de développer une pneumopathie radique sévère^{70,62}. Comme mentionné plus haut, le poumon est organisé en parallèle et les contraintes de dose appliquées aux poumons sains sont la dose moyenne aux poumons et les V_{5Gy} , V_{20Gy} et V_{30Gy} ⁷¹. La trachée est un organe à risque très sensible avec des toxicités létales comme la sténose, l'occlusion, la formation de fistule ou la nécrose trachéale.

Son organisation tissulaire en série est responsable de l'apparition de ces toxicités sévères aux fortes doses par fraction. Les contraintes de dose appliquées à la trachée sont la D_{\max} et le V_{xGy} . Il en est de même pour les bronches souches et segmentaires avec la possible formation de sténose, d'occlusion et de fistule à la suite de l'exposition à de fortes doses⁷⁰. Un autre organe à risque pour la radiothérapie stéréotaxique est l'ensemble des gros vaisseaux. Ces vaisseaux sont l'aorte, les veines caves inférieure et supérieure ainsi que les veines et artères pulmonaires. Tous ces vaisseaux sont considérés comme un seul organe à risque. Les vaisseaux pulmonaires seraient plus radiosensibles que les autres gros vaisseaux⁷⁰. Parmi les différentes toxicités observées au niveau de ces vaisseaux après radiothérapie stéréotaxique thoracique, sont retrouvées les altérations des parois vasculaires pouvant entraîner anévrisme, rupture et hémorragie^{71,72}. Les vaisseaux sont des organes organisés en série. La contrainte de dose appliquée est la D_{\max} . Il est recommandé d'utiliser un produit de contraste lors de la scanographie afin de mieux les délimiter. Le cœur est également un organe à risque : il doit être considéré comme tel dans son ensemble avec les ventricules, les oreillettes, les valves et le péricarde⁷². Globalement, la radiothérapie thoracique augmente le risque de mortalité cardiaque par trois⁷³. Le but est d'éviter les cardiopathies et l'infarctus du myocarde après radiothérapie stéréotaxique. Le cœur est organisé en série pour les structures vasculaires (coronaires) et en parallèle pour les structures cardiaques. Les contraintes dosimétriques pour le cœur sont la D_{\max} , la dose moyenne au cœur entier et le V_{xGy} . L'œsophage est également un organe à risque en radiothérapie stéréotaxique pulmonaire. Les toxicités observées après radiothérapie stéréotaxique comprennent l'œsophagite radique, la sténose œsophagienne, la perforation ou la fistule trachéo-œsophagienne⁷². L'œsophage est considéré comme un organe organisé en série mais les contraintes dosimétriques appliquées suggèrent une organisation en parallèle : V_{xGy} et la dose moyenne à l'œsophage⁷¹. Un autre organe à risque est le plexus brachial. Une plexopathie brachiale radio-induite peut se développer après radiothérapie stéréotaxique pulmonaire avec des manifestations telles qu'une paresthésie des extrémités, une faiblesse motrice et des douleurs neuropathiques⁷². L'irradiation de la moelle épinière peut également entraîner des toxicités : la myélopathie radique caractérisée par des signes de déficiences motrices et sensorielles, des douleurs et des pertes de fonction. La paroi thoracique et la peau sont aussi considérées comme des organes à risques. L'irradiation à trop forte dose de ces structures peut entraîner une nécrose de la peau, la fracture des côtes et des douleurs chroniques de la paroi thoracique. La paroi thoracique est considérée comme un organe en série : les contraintes dosimétriques sont le V_{xGy} et la D_{\max} . Les patients atteints de

diabète ou d'obésité sont plus susceptibles de développer des toxicités cutanées. Les limites anatomiques de ces organes à risques sont présentées **tableau 1**.

Organe	Limite crânienne	Limite caudale	Limite antérieure	Limite postérieure	Limite latérale
Trachée	Cartilage cricoïde	2 cm sous la tête des clavicules	Isthme de la thyroïde	Œsophage latéral	Thyroïde latérale
Œsophage	Orifice du thorax	Jonction œsogastrique	Trachée puis cœur	Corps vertébraux	Interface œsophage/poumon
Plexus brachial	Vertèbre cervicale 4	Vertèbre thoracique 1	Muscle scalène antérieur	Muscle scalène moyen	Espace graisseux
Paroi thoracique	Tête de la clavicule	Référence clinique (radio-opaque)	Peau	Interface plèvre/côte	Référence clinique (radio-opaque)

Tableau 1 : Limites anatomiques des principaux organes à risque en radiothérapie stéréotaxique pulmonaire (source : Noël et al 2016⁷¹)

Le risque pour ces organes dépend bien sûr de la localisation de la tumeur. La trachée, les bronches souches, l'œsophage, le cœur et les gros vaisseaux seront des organes à risque en cas de tumeurs bronchopulmonaires centrales. Le plexus brachial sera particulièrement exposé en cas de tumeur de l'apex. Il est essentiel pour la protection des organes à risque juxtaposant les volumes cibles de les délimiter correctement lors du plan de traitement, en utilisant les bons fenêtrages sur les images CBCT. La délimitation des différentes structures sur les images scanner se fait sur un fenêtrage déterminé⁷¹. La délimitation sera d'autant plus précise que les coupes des images scanner seront fines⁷¹. L'utilisation d'atlas de délimitation est fortement recommandée. La planification du traitement est influencée par la présence d'organes à risque proches des volumes cibles : un volume d'organe à risque planifié, ou *Planning Organ At Risk Volume* (PRV) peut être défini lors de la planification du traitement. Il sera cliniquement pertinent de prendre une marge autour de ce volume pour les organes en série⁷⁴.

Ce sont les organes à risque présents dans le champ d'irradiation qui vont déterminer les contraintes de dose appliquées lors de la planification du traitement.

3. Les contraintes dosimétriques aux organes à risque

Les contraintes de dose aux organes à risque en radiothérapie stéréotaxique proviennent de la littérature et des études rétrospectives menées sur des cohortes de patients. Timmerman fut le premier à proposer des contraintes de dose aux organes à risque en radiothérapie stéréotaxique en 2008⁷⁵. Depuis, la démocratisation de la radiothérapie stéréotaxique a permis de mener de nombreuses études cliniques où les toxicités et leur grade ont été enregistrés et mis en parallèle des doses par fraction administrées. Ceci a permis de définir les doses ou volumes aux différents organes permettant d'éviter au maximum les effets secondaires décrits précédemment. Les recommandations en matière de contraintes de dose étant nombreuses^{76,77,72,70}, nous aborderons dans cette partie celles émises par l'*European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC)⁶², celles de la Société Française De Radiothérapie Oncologique (SFRO), nommées Recorad⁷¹, publiées respectivement en 2017 et 2016 et celles de Blais et al, publiées en 2017⁶⁹.

Dans le cadre de la radiothérapie stéréotaxique pulmonaire, l'EORTC recommande une dose maximale de 35 Gy en trois à quatre fractions pour le plexus brachial, ainsi qu'un V_{30Gy} de 0,2 cm³ afin d'éviter la plexopathie brachiale radio-induite. Pour la paroi thoracique, afin d'éviter la douleur thoracique, il est recommandé de ne pas dépasser 16 Gy en quatre fractions sur 70 cm³ et 43 Gy en quatre fractions sur 2 cm³. Pour éviter le risque de fracture costale, la dose maximale recommandée ne doit pas dépasser une BED de 225 Gy avec un α/β ratio de 3 Gy. L'EORTC recommande de diminuer la dose moyenne au cœur au maximum et d'éviter l'irradiation des vertèbres.

Les recommandations de la SFRO, regroupées dans le Recorad, sont plus précises que celles de l'EORTC. Elles sont basées sur le référentiel *Radiation Therapy Oncology Group* (RTOG). Elles prennent en compte le fractionnement du traitement. Les doses maximales aux bronches sont de 13,3 Gy en une fraction, 23,1 Gy pour trois fractions ou 33 Gy en cinq fractions. La dose reçue sur 0,5 cm³ des bronches doit être inférieure à 12,4 Gy pour une fraction, 18,9 Gy en trois fractions et de 21 Gy pour cinq fractions. La dose maximale au cœur ne doit pas dépasser 22 Gy pour un traitement en une fraction, 30 Gy pour trois fractions et 38 Gy pour un traitement en cinq fractions. La dose reçue par 15 mL du cœur ne doit pas excéder 16 Gy pour une fraction, 24 Gy pour trois fractions et 32 Gy pour cinq fractions. Afin d'éviter les fractures costales la dose maximale reçue par les côtes ne doit pas franchir 30 Gy en une fraction, 36,9 Gy en trois fractions et 43 Gy en cinq fractions. Pour les gros vaisseaux, la dose

maximale recommandée est de 37 Gy pour une fraction, 45 Gy pour trois fractions et 53 Gy pour cinq fractions. La dose reçue par 10 mL des vaisseaux ne doit pas excéder 31 Gy, 39 Gy et 47 Gy pour des traitements en une, trois et cinq fractions. Les doses maximales à l'œsophage sont de 15,4 Gy pour un traitement en une fraction, 25,2 Gy pour trois fractions et 35 Gy pour cinq. La dose reçue par un volume de 15 mL d'œsophage ne doit pas dépasser 11,9 Gy pour une fraction, 17,7 Gy pour trois et 19,5 Gy pour cinq. Le volume recevant 30 Gy ou V_{30Gy} au niveau de la paroi thoracique ne doit pas excéder 0,7% de la paroi, le V_{35Gy} 0,39% et le V_{40Gy} 0,19%, que le traitement soit administré en trois ou en cinq fractions. Pour le plexus brachial, la D_{max} est de 17,5 Gy pour un traitement en une fraction, 20,4 Gy pour trois fractions et 30,5 Gy en cinq fractions. La dose reçue par un volume de 3 mL ne doit pas dépasser 14 à 27 Gy selon le nombre de fractions. Pour le poumon sain, les contraintes de dose sont un V_{20Gy} inférieur à 10%, les doses reçues par 1000 mL de poumon sont restreintes à 7,4 Gy en une fraction, 12,4 Gy pour trois fractions et 13,5 Gy en cinq fractions. La dose moyenne aux poumons ne doit pas excéder 6 Gy pour diminuer le risque de développer une pneumopathie radique.

Les recommandations de contraintes de dose pour la radiothérapie stéréotaxique thoracique établies par Blais et al sont présentées dans le **tableau 2**. Ils proposent quelques contraintes dosimétriques supplémentaires en fonction du fractionnement. Les données de leur centre corrélaient le risque de pneumopathie radique avec une dose moyenne aux poumons de plus de 4 Gy et un V_{20Gy} de plus de 4%. Pourtant les recommandations actuelles proposent de ne pas dépasser une dose moyenne aux poumons de 6 Gy et un V_{20Gy} de moins de 10% pour éviter le risque de pneumopathie radique. Ceci illustre bien l'hétérogénéité en matière de recommandations pour les pratiques de radiothérapie stéréotaxique : les données sont issues d'études monocentriques et le recul clinique concernant la radiothérapie stéréotaxique thoracique est encore limité. De plus il est difficile de comparer les données entre les différents centres de traitement étant donné l'hétérogénéité des pratiques cliniques concernant la prescription de la dose et le fractionnement.

Organes à risque	Volume	1 fraction	3 fractions	4 fractions	5 fractions	7 fractions	8 fractions
Poumons (droit et gauche)	1500 cm ³	7 Gy	11,6 Gy	11,6 Gy	12,5 Gy		14,4 Gy
		7,2 Gy	10,8 Gy		12,5 Gy		
	1000 cm ³	7,4 Gy	12,4 Gy	12,4 Gy	13,5 Gy		15,6 Gy
	< 31 %		4,5 Gy				
	100 cm ³			< 40 Gy			
	V12,5 Gy		< 15 %		< 15 %		< 15 %
	V15			< 25 %			
	MLD			≤ 6 Gy			
				< 18 Gy			
	Ipsilatéral			≤ 10 Gy			
	MLD						
	V5			≤ 30 %			
	V10			≤ 17 %			
	V20			≤ 12 %			
			< 10 %				
			< 20 %				
			≤ 35 %				
	V30			≤ 7 %			
	Ipsilatéral			≤ 35 %			
	V10						
	Ipsilatéral			≤ 25 %			
	V20						
	iV30			≤ 15 %			
	V40						
Voies aériennes centrales (trachée + bronches souches)	< 4 cm ³	10,5 Gy	15 Gy	15,6 Gy	16 Gy-18 Gy		20,8 Gy
	< 5 cm ³	27,5 Gy	39 Gy	40 Gy	45 Gy		54,5 Gy
	< 10 cm ³		30 Gy				44 Gy
	Max						
	Tout point		30 Gy				
			10 Gy				
	≤ 1 cm ³		30 Gy	35 Gy	32 Gy		32 Gy
	< 0,1 cm ³						
Trachée	Tout point				45 Gy	49 Gy	
	< 0,5 cm ³	12,4 Gy	18,9 Gy		21 Gy		
Bronches lobaires		17,4 Gy	25,8 Gy		32 Gy		
	Tout point				55 Gy	49 Gy	

Tableau 2 : recommandations de contraintes de dose utilisées en radiothérapie stéréotaxique thoracique selon le fractionnement (source : Blais et al, 2017⁶⁹)

4. Le cas particulier des tumeurs broncho-pulmonaires centrales

La radiothérapie stéréotaxique pulmonaire est devenu le traitement de référence pour les CBNPC chez les patients inopérables ou refusant la chirurgie. Cependant, dès les premières applications à des tumeurs centrales, un excès de toxicité a été observé. Une tumeur bronchopulmonaire centrale est définie comme une tumeur dont le PTV est localisé dans un périmètre de 2 cm autour de l'arbre trachéobronchique, comprenant ainsi la trachée, les deux bronches souches et l'arbre bronchique jusqu'à la bifurcation en bronches segmentaires comme défini dans l'essai clinique RTOG 0236⁷⁸. Une autre définition possible est qu'une tumeur centrale est une tumeur située dans un périmètre de 2 cm autour de toutes les structures médiastinales critiques : l'arbre bronchique, l'œsophage, le cœur, le plexus brachial, les gros vaisseaux, la moelle épinière, le nerf phrénique et les nerfs laryngés⁷⁸. Les tumeurs ultra-centrales sont les tumeurs dont le PTV chevauche la trachée et/ou les bronches

souches. Cependant les définitions varient selon les centres et les études. Cet excès de toxicité a été observé en premier par Timmerman et son équipe en 2006⁷⁹. Lors d'un essai clinique de phase II sur la radiothérapie stéréotaxique pour des stades précoces de cancers bronchopulmonaires inopérables, six patients ont présenté des toxicités de grade 5 (décès). Parmi ces décès, quatre ont été associés à une pneumonie bactérienne. L'un des décès a été associé à un épanchement péricardique après traitement d'une tumeur adjacente au médiastin supérieur. Le dernier patient décédé présentait une récurrence locale de la maladie au niveau de la bifurcation de la trachée en bronches souches. Le traitement causa une hémoptysie massive 19,5 mois après le traitement. Leurs analyses ont montré que la localisation de la tumeur (hilaire et centrale versus périphérique) était un facteur prédictif de toxicité⁷⁹ avec onze fois plus de risque de développer une toxicité sévère pour des tumeurs centrales. De ce fait, la région thoracique centrale, contenant la trachée, l'œsophage, les bronches souches, le cœur et les gros vaisseaux, a été labellisée comme une zone à risque, une « no fly zone » en radiothérapie stéréotaxique thoracique (**Figure 14**).

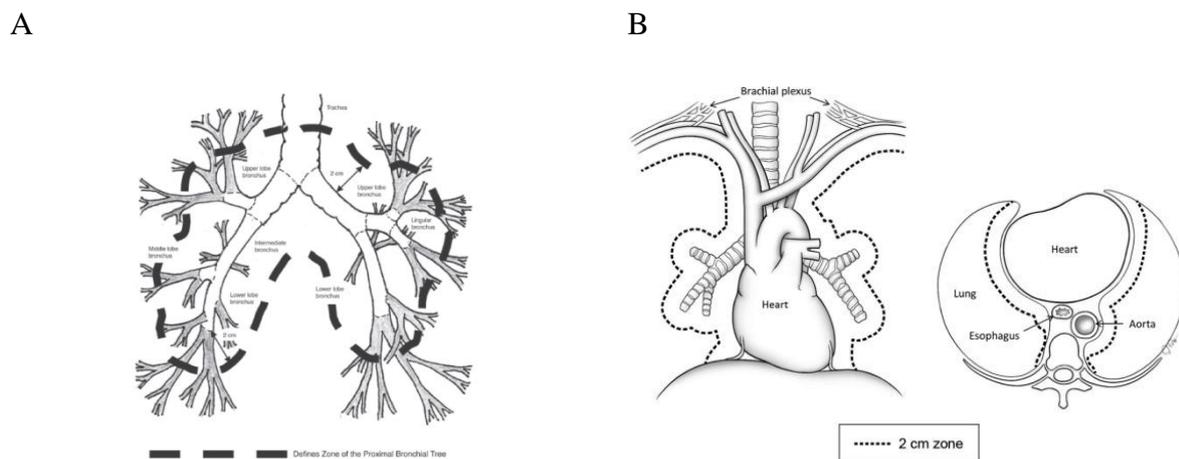


Figure 14 : La « No fly zone » en radiothérapie stéréotaxique pulmonaire : une zone de 2 cm autour de l'arbre trachéobronchique.

A/ source : Timmerman et al 2006⁷⁹ B/ source : Chang et al 2015⁷⁸

En 2009, Song et al, rapportent les résultats du traitement de 9 patients avec des tumeurs centrales avec une toxicité élevée : 6 tumeurs bronchiques (dont une sur la bronche souche) et 3 en position péribronchique. Pour les 6 tumeurs bronchiques, le GTV et le PTV englobent la bronche souche ou lobaire. Pour les tumeurs péribronchiques, le PTV inclut partiellement la bronche lobaire ou segmentaire. Dans leur étude, la localisation de la tumeur

n'affecte pas le contrôle local de la maladie, ni la survie globale. Trois patients développent une toxicité pulmonaire de grade 3 ou plus. Huit patients sur neuf présentent un rétrécissement des bronches après traitement, partiel ou complet. Un patient est décédé des suites de saignements causés par un rétrécissement complet de la bronche souche. La bronche souche se situait dans le PTV et le patient a reçu 4x12 Gy. Le rétrécissement complet de la bronche a été attribué au traitement⁸⁰. En 2012, Corradetti et al rapportent le cas d'une patiente ayant développé une nécrose des voies aériennes centrales après avoir reçu 5x10 Gy, 8 mois après le traitement⁸¹. Différentes études prospectives et rétrospectives se sont intéressées aux résultats des traitements par radiothérapie stéréotaxique des tumeurs ultra-centrales et centrales. Dans une étude rétrospective menée sur leur centre, Nguyen et al rapportent un contrôle local et une survie globale après traitement de tumeurs ultra-centrales, centrales et paramédiastinales semblables à ceux après traitement de lésions périphériques. Ils ont identifié un taux de toxicité pulmonaire de grade ≥ 2 plus élevé pour les tumeurs ultra-centrales, dont une toxicité fatale. Le taux de toxicité de grade 2 et plus à 2 ans est de 57,6% pour les tumeurs ultra-centrales, 14,2% pour les tumeurs centrales et de 7,1% pour les tumeurs paramédiastinales. Parmi les onze cas de toxicité de grade 2 et plus, huit étaient des toxicités pulmonaires (pneumopathie radique, pneumonie obstructive, épanchement pleural et arrêt respiratoire). Deux patients avec des tumeurs ultra-centrales ont développé des toxicités de grade 3 ou plus : une pneumonie obstructive et un arrêt respiratoire (grade 5). Cependant le taux de toxicité de grade 3 ou plus pour les tumeurs ultra-centrales reste bas : 14%. Un seul patient avec une tumeur centrale a développé une toxicité de grade 3. Cette différence de taux de toxicité peut s'expliquer par le fait que les patients atteints de tumeurs ultra-centrales ont reçu des doses plus élevées au niveau de l'arbre trachéobronchique, notamment des doses qui dépassent les contraintes dose maximales ponctuelles définies par l'essai clinique RTOG 0813. Cet essai clinique prospectif évalue l'innocuité de la radiothérapie stéréotaxique pour le traitement de tumeurs pulmonaires centrales avec une escalade de dose jusqu'à 60 Gy en cinq fractions. Pour les doses les plus fortes, un taux de toxicité de grade 3 et plus de 7,2% est rapporté. Ces résultats préliminaires suggèrent l'innocuité de la radiothérapie stéréotaxique pour les tumeurs centrales. Une analyse rétrospective d'Arnett et al rapporte un taux de complications global de grade 3 et plus de 9,7%. Chang et al rapportent, eux, un taux de pneumopathie radique de 12% après traitement de tumeurs centrales avec 70 Gy en dix fractions ou 50 Gy en quatre fractions et l'absence de sténose ou de rétrécissement des bronches.

Les toxicités sévères observées après traitement par radiothérapie stéréotaxique des tumeurs centrales et ultra-centrales sont liées à la radiosensibilité des structures dose-limitantes centrales : la trachée, les bronches souches et lobaires, l'aorte, les veines caves, le cœur et l'œsophage. Les fortes doses sont moins bien supportées par ces organes que par le parenchyme pulmonaire. La dose et le schéma de fractionnement optimal pour les tumeurs centrales permettant de diminuer au maximum les complications tout en obtenant un bon contrôle local restent encore à déterminer. En effet, l'hétérogénéité des doses et des schémas de fractionnement retrouvée dans la littérature rend leur comparaison et leur analyse complexes. Les résultats de l'essai clinique RTOG 0813 permettront sûrement d'établir des recommandations cliniques pour la prise en charge des tumeurs bronchopulmonaires centrales.

5. Les volumes cibles en radiothérapie stéréotaxique

Il existe beaucoup de recommandations pour la radiothérapie stéréotaxique pulmonaire, cependant il semble ne pas y avoir de consensus pour la détermination des différents volumes cibles et marges. La radiothérapie stéréotaxique pulmonaire nécessite pourtant une définition très fine de ces différents volumes cibles. Ces différents volumes cibles doivent être définis sur des scanographies quadridimensionnelles où le patient est en position de traitement. La finesse des coupes doit être de 2 à 3 mm. L'utilisation d'un produit de contraste est recommandée pour mieux délimiter les gros vaisseaux. La définition de ces volumes doit prendre en compte l'évaluation de la compensation des mouvements respiratoires⁶². L'*International Commission on Radiation Units (ICRU)* a publié en 2017 le rapport 91 sur la prescription des traitements en conditions stéréotaxiques. Ce rapport aborde la définition des différents volumes cibles. Les volumes à définir sont le *Gross Target Volume (GTV)*, le *Clinical Target Volume (CTV)*, l'*Internal Target Volume (ITV)*, le *Planning Target Volume (PTV)*, les organes à risques (OAR) et le *Planning Organ at Risk Volume (PRV)*. Le GTV, le CTV et les OAR correspondent à des volumes anatomiques et physiopathologiques alors que l'ITV, le PTV et le PRV sont des volumes conceptuels établis lors de la planification du traitement pour assurer que la dose délivrée à la tumeur et aux organes à risque est cliniquement acceptable que ce soit pour le contrôle local de la maladie ou la limitation de la dose aux organes à risque.

Le premier volume à définir est le *Gross Target Volume (GTV)* qui correspond à la localisation visible de la tumeur sur l'image scanner. Il n'y a pas de seuil défini au-delà

duquel la probabilité qu'un voxel contienne des cellules tumorales soit suffisamment élevée pour l'attribuer au GTV. Si la zone est très susceptible d'être tumorale, elle sera incorporée dans le GTV⁷⁴. Dans tous les cas, le GTV doit être délimité sur le fenêtrage standard des scanographie, mentionné plus haut⁶².

Le *Clinical Target Volume* (CTV) est défini par l'ICRU 91 comme le volume de tissu contenant le GTV et le tissu cible subclinique jugé pertinent pour le traitement. C'est une marge ajoutée au GTV sur jugement clinique. L'expérience clinique montre qu'un bon contrôle local de la pathologie est obtenu avec une marge de 0 à 5 mm. Cette marge n'est pas géométrique et doit être ajustée manuellement en fonction de la propagation et de l'infiltration tumorale. Cette marge est globalement peu utilisée en radiothérapie stéréotaxique et le GTV est alors égal au CTV. En effet, ajouter une petite marge peut faire augmenter le volume cible de façon considérable et donc augmenter le risque de développer des effets secondaires.

Le *Planning Target Volume* (PTV) est un outil conceptuel permettant de garantir avec une probabilité cliniquement acceptable que la dose prescrite sera administrée à toutes les parties du CTV malgré les incertitudes. Les protocoles d'immobilisation du patient et le guidage par l'image en radiothérapie stéréotaxique permettent de réduire cette marge. La marge du CTV au PTV dépend donc des incertitudes liées à la planification et à l'administration du traitement : des incertitudes mécaniques, dosimétriques, des logiciels de planification du traitement, des algorithmes, de la déformation de la tumeur, de la position du patient, des mouvements inter et intra-fraction, des mouvements respiratoires et cardiaques. Le PTV est donc spécifique du patient et doit être déterminé sur les images CBCT de planification quadridimensionnelle (4D-CT). Les stratégies de diminution des mouvements respiratoires réduisent la marge à prendre. La méthode utilisée peut être passive comme déterminer un ITV après délimitation dans les différentes phases respiratoires sur les images 4D-CT ou la technique mid-ventilation/mid-position : la délimitation se fait à mi-ventilation quand la tumeur est la plus proche de sa position moyenne et à mi-position, quand l'image scanner affiche chaque voxel dans sa position moyenne⁶². Des stratégies dites actives peuvent être mises en œuvre comme le *gating*, le *tracking* ou le *MLC tracking*. L'ajout d'une marge pour prendre en compte toutes les variations possibles dans les volumes cibles n'est pas une solution vu l'augmentation du risque de complication, cependant un examen par les pairs et une planification du traitement multidisciplinaire est recommandée pour éviter les mauvais ciblage⁷⁴.

Comme présenté à la section 2, les organes à risque influencent la planification du traitement, et dépendent de la localisation de la tumeur, de la technique de traitement et de la dose prescrite. Les petites variations de délimitation des OAR auront un fort impact sur les organes en série et un impact plus faible sur les organes organisés en parallèle. Le *Planning Organ at Risk Volume* (PRV) permet d'établir une marge à la délimitation des OAR. Définir un PRV est cliniquement pertinent quand les OAR sont organisés en série et que les contraintes de dose maximales sont appliquées. Le PRV diminue alors la probabilité d'utiliser des doses trop fortes. Si le PRV chevauche le PTV, le PRV n'est pas modifié, mais des sous-volumes peuvent être créés. En clinique le PRV est défini surtout pour protéger les structures du système nerveux. Un exemple de planification de traitement en radiothérapie stéréotaxique est montré **figure 15**.

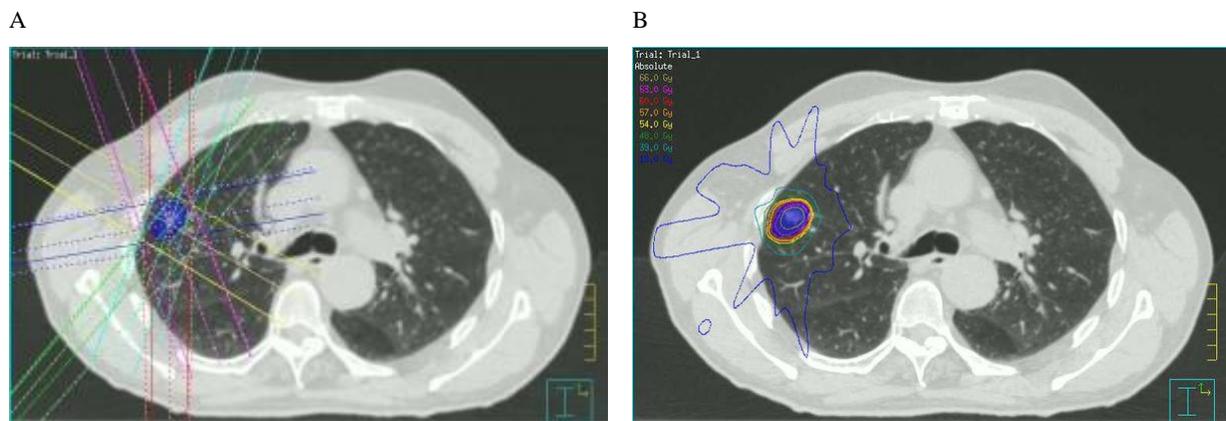


Figure 15 : Planification de traitement en radiothérapie stéréotaxique.

A/ Traitement d'une lésion du lobe pulmonaire droit par 5 faisceaux coplanaires B/ Dosimétrie sur un plan axial d'une lésion du lobe droit, PTV (volume en bleu) et courbes isodoses de 66 Gy (en jaune) à 18 Gy (en bleu foncé) (source : radiothérapie-tenon.aphp.fr)

La dose au PTV n'est pas une dose homogène : la dose maximale au PTV est comprise entre 105% et 150% de la dose prescrite. La dose au GTV varie donc selon les marges appliquées du GTV au PTV et la taille de la tumeur. Selon les recommandations, un minimum de 95% du PTV doit recevoir la dose prescrite⁸². Dans la littérature, les doses prescrites sont très hétérogènes, le protocole le plus fort en radiothérapie stéréotaxique thoracique est 60 Gy délivré en trois fractions (3x20 Gy) pour les lésions broncho-pulmonaires périphériques. La nécessité de délivrer une dose ayant une BED₁₀ d'au moins 100 Gy fait cependant consensus pour assurer le contrôle tumoral. Les schémas de fractionnement sont eux adaptés à la localisation et à la taille de la tumeur. Par exemple une tumeur périphérique de stade T1

pourra recevoir 3x18 Gy ou 3x20 Gy. Une tumeur proche de la paroi thoracique de stade II recevra 5x11 Gy ou 5x12 Gy. Quand à une tumeur proche du médiastin, elle recevra 8x7,5 Gy⁸³.

6. Les séquelles cliniques : la pneumopathie radique et la fibrose pulmonaire radio-induite

Comme vu à la section 2, les effets secondaires de la radiothérapie stéréotaxique pulmonaire peuvent être nombreux et concerner différents organes. Cependant, les complications les plus fréquentes concernent le poumon sain.

Pour évaluer l'apparition et la sévérité des complications post-radiothérapie, différentes échelles de gradation ont été mises au point. Le RTOG a défini des échelles pour les toxicités aiguës et tardives, RTOG-A et RTOG-L. Les toxicités observées après radiothérapie ont été décrites de manière plus exhaustive par l'échelle *Subjective, Objective, Management and Analytic-Late Effect of Normal Tissues* (SOMA-LENT) avec 152 items. Toutefois, l'échelle la plus utilisée par les cliniciens est l'échelle des *Common Toxicity Criteria* (CTC) élaborée par le National Cancer Institute. En 2003 la troisième version des CTC change de nom et devient l'échelle des *Common terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE) avec plus de 1059 items. En 2009, la CTCAE est simplifiée et les termes jugés trop généraux sont remplacés par les termes du *Medical Dictionary for Regulatory Activities* (Med-DRA) compris par tous les professionnels de santé à l'international, réduisant le nombre d'items à 759. Cette version inclut notamment la prise en compte des activités de la vie quotidienne dans la classification des complications. A la fin de l'année 2017, la CTCAE a été mise à jour (CTCAE v5). Les critères concernant la pneumopathie radique et la fibrose pulmonaire radio-induite sont présentés dans le **tableau 3**.

CTCAE term	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5
Pneumopathie radique	Asymptomatique, observations cliniques ou radiologiques, intervention non indiquée	Symptomatique, intervention médicale indiquée, limitations des activités instrumentales de la vie quotidienne	Symptômes sévères, limitations des activités élémentaires de la vie quotidienne, indication d'oxygénothérapie	Atteinte respiratoire menaçant le pronostic vital, indication intervention urgente indiquée (trachéotomie, intubation)	Décès
Fibrose pulmonaire	Fibrose radiologique <25% du volume pulmonaire associée à de l'hypoxie	Hypertension artérielle pulmonaire, fibrose radiologique 25-50% du volume pulmonaire associée à de l'hypoxie	Hypoxie sévère, signes d'insuffisance cardiaque droite, fibrose radiologique 50-75%	Atteinte respiratoire menaçant le pronostic vital (complications hémodynamiques ou respiratoires), indication intubation avec support ventilatoire, fibrose radiologique > 75% avec nid d'abeille sévère	Décès

Tableau 3 : Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 5 pour la pneumopathie radique et la fibrose pulmonaire radio-induite. (source : ctep.cancer.gov)

La complication aiguë la plus commune après radiothérapie stéréotaxique pulmonaire est la pneumopathie radique (PR). Elle survient dans les six mois après la fin du traitement, généralement entre 4 et 12 semaines. Son incidence exacte n'est pas connue car les données proviennent d'études rétrospectives dont l'hétérogénéité est grande (dose totale, schéma de fractionnement, population traitée, critères d'évaluation et comorbidités). Globalement, l'incidence des pneumopathies radiques de grade 1 (asymptomatiques) après radiothérapie stéréotaxique, est comprise entre 8 et 89% selon les études⁶¹. Les pneumopathies radiques de grade 2 concernent 2 à 28% des patients. L'essai clinique RTOG 0236 rapporte un taux de pneumopathie radique de grade 3 de 12,7% et de grade 4 de 3,6%. Aucune pneumopathie radique de grade 5 n'a été rapportée dans cet essai⁸⁴. L'essai clinique de phase II Nordic

rapporte un taux de pneumopathie radique de grade 3 de 21% et l'absence de grades 4 et 5⁸⁵ après radiothérapie stéréotaxique thoracique. En 2010, Guckenberger rapporte un taux de pneumopathie radique de grade supérieur ou égal à 2 de 16%⁸⁶. Barriger et al rapportent un taux de pneumopathie radique de 17% avec 8% des patients atteints d'une pneumopathie radique de grade 1, 7% de grade 2, 2% de grade 3 et 0,4% de grade 4⁸⁷. En 2016, Zhao et al ont analysé les résultats de 88 études sur la radiothérapie stéréotaxique thoracique et obtiennent un taux de PR de grade 2 de 9,5% et de grade 3 de 2,2%⁸⁸. Borst et al ont comparé les incidences de PR après 3D-CRT et après radiothérapie stéréotaxique : 10,9% des patients ont développé une PR après radiothérapie stéréotaxique, 0,8% des patients étaient atteints d'un grade 3. L'incidence de la pneumopathie radique était plus élevée après 3D-CRT : 17,6% des patients ont développé une PR. 3% des patients étaient atteints d'une PR de grade 3 et 0,7% de grade 5⁸⁹. Cette différence est due à la réduction des marges en radiothérapie stéréotaxique ainsi qu'à la précision de la technique grâce à son guidage par l'image. De plus, les manifestations radiologiques de la PR apparaissent plus tardivement après radiothérapie stéréotaxique (3 mois environ contre 1 semaine en 3D-CRT).

La pneumopathie radique est une inflammation radio-induite locale ou diffuse du parenchyme pulmonaire induite par les dommages à l'ADN, le stress oxydatif et la mort cellulaire, conséquences de l'exposition aux rayonnements ionisants. Ses symptômes sont : une toux sèche, une dyspnée, un état fébrile et/ou des douleurs pleurales. Les mécanismes physiopathologiques de la pneumopathie radique sont liés à la réponse aux rayonnements ionisants des pneumocytes de type I, des pneumocytes de type II et des cellules endothéliales composant l'alvéole pulmonaire. Cette réponse se décompose en différentes phases. La première phase, dite phase immédiate, se met en place quelques heures à quelques jours après l'irradiation. C'est une phase d'inflammation, avec une activation des macrophages et une infiltration lymphocytaire dans les alvéoles due à une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins⁹⁰. Cette augmentation de la perméabilité de l'endothélium se traduit également par un œdème alvéolaire. Le modèle d'irradiation en thorax entier a permis de mettre en lumière les différents mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement des lésions pulmonaire radio-induites, que ce soit la pneumopathie radique aiguë ou la fibrose pulmonaire. Ainsi, après irradiation en thorax entier à 12 Gy, Rube et al ont pu observer deux phases de synthèse de cytokines et chimiokines : la première entre 1 et 12 heures post-irradiation et la seconde à 8 semaines post-irradiation⁹¹. Ces travaux mettent en avant l'absence de phase de latence comme décrit en clinique avec une sécrétion

immédiate de cytokines et de chimiokines⁹². Johnston et al ainsi que Rubin et al ont également pu observer cette sécrétion de cytokines et chimiokines, quelques heures après une irradiation en thorax entier à 5 ou 12,5 Gy^{93,94}. Ces cytokines et chimiokines, IL-1^{91,93,94}, IL-6^{91,93}, TNF- α ^{91,93,94}, VEGF^{95,96}, TGF- β ^{95,96}, CTGF⁹⁵⁻⁹⁷ et FGF^{95,96} sont sécrétées par les cellules suite à la lésion radio-induite (cellules épithéliales, cellules mésenchymateuses et cellules immunitaires) et sont impliquées dans la réponse cellulaires aux rayonnements ionisants : la réponse inflammatoire est comme auto-entretenu. Groves et al ainsi que De Leve et al ont mis en avant une perte des macrophages alvéolaires rapidement après irradiation (3 jours), dont la durée dépend de la dose administrée^{98,99}. Cette diminution du nombre de macrophages alvéolaires a lieu en parallèle de l'infiltration des cellules immunitaires dans le tissu lésé. En effet, cette perte cellulaire induit un relargage important de cytokines et chimiokines qui attirent les cellules immunitaires au site de la lésion. Ces mécanismes d'inflammation auto-entretenu et d'infiltration des cellules immunitaires jouent un rôle prépondérant dans le développement des lésions pulmonaires radio-induites. Aujourd'hui, il est connu qu'une inflammation chronique ainsi qu'une lésion persistante peuvent être à la base de différentes formes de fibroses pulmonaires¹⁰⁰. Ensuite, cette phase d'inflammation et d'infiltration progresse, des sécrétions épaisses s'accumulent à cause de la prolifération et de l'altération des cellules caliciformes et des cellules ciliées bronchiolaires. L'épithélium alvéolaire subit également des modifications avec une perte importante des pneumocytes de type I. Cette phase ne possède pas de manifestations cliniques^{90,92}. Almeida et al ont pu objectiver cette perte des pneumocytes de type I, 1 à 5 mois post-irradiation, à 24 Gy administré en fractions de 6 Gy, en thorax entier¹⁰¹. Cette perte des pneumocytes de type I s'accompagne d'une augmentation de l'expression du gène codant pour le surfactant protein C, un marqueur des pneumocytes de type II¹⁰¹. La perte des pneumocytes de type I entraîne la prolifération conséquentielle des pneumocytes de type II qui sécrètent du surfactant pour réparer l'alvéole^{90,101}. En effet ces derniers réagissent en cas de lésion. En clinique, cette perte des pneumocytes de type I et la prolifération des pneumocytes de type II correspondrait à la phase exsudative. Cette phase s'installe quelques semaines à quelques mois après le traitement : il y a une perte des cellules endothéliales et des cellules épithéliales¹⁰¹ entraînant un collapsus des alvéoles et une thrombose des capillaires. Les cellules club participent également à ce processus de ré-épithélialisation des alvéoles en proliférant et se différenciant. Dans les 2 à 9 mois suivant l'irradiation, une phase intermédiaire est observée : les pneumocytes de type II continuent leur prolifération, les alvéoles sont colonisées par les fibroblastes^{61,90}. Durant cette phase, les mécanismes de réparation épithéliale et endothéliale

continuent⁹². Les lésions observées peuvent alors se résorber ou progresser vers une phase chronique. La phase finale de cette réponse aux rayonnements ionisants, dite phase chronique est caractérisée par la fibrose pulmonaire radio-induite. Finalement, la PR connaît 3 évolutions possibles : la résolution spontanée si la lésion n'est pas trop sévère, l'aggravation en syndrome de détresse respiratoire aiguë engageant le pronostic vital, ou la chronicisation en fibrose pulmonaire radio-induite. Cependant, la fibrose pulmonaire radio-induite peut se développer sans que le patient ait développé au préalable une PR aiguë. Ce lien entre l'apparition d'une PR et le développement d'une fibrose est appelé effet conséquentiel. Celui-ci est défini comme un lien de cause à effet entre la sévérité de la lésion précoce et le développement des lésions tardives. Au niveau du poumon, le lien conséquentiel entre réaction précoce, avec la PR, et réaction tardive, avec la fibrose pulmonaire radio-induite, n'est pas forcément établi et porte à controverse. En effet, les données divergent selon les auteurs : Dörr et al rapportent jusqu'à 100% d'effet conséquentiel entre la PR et le développement d'une fibrose pulmonaire radio-induite¹⁰², Frölich lui rapporte le développement de fibrose pulmonaire radio-induite chez des patients n'ayant pas développé de PR auparavant¹⁰³.

Quoiqu'il en soit, la fibrose pulmonaire radio-induite est la complication tardive de la radiothérapie pulmonaire. Elle se développe entre 6 mois et 2 ans après la fin du traitement. Son incidence après radiothérapie stéréotaxique est comprise entre 3% pour l'étude de Lagerwaard et al¹⁰⁴ et 12% pour l'étude de Baumann et al¹⁰⁵. Les phénomènes de dommages à l'ADN, stress oxydatif et mort cellulaire induisent un relargage important de cytokines et de chimiokines au niveau de la lésion et donc une inflammation importante, avec infiltration de cellules immunitaires, notamment les macrophages et les lymphocytes. La fibrose pulmonaire radio-induite est initiée par la destruction des cellules épithéliales suite à l'exposition aux rayonnements ionisants. Elle est caractérisée par une perte de la structure normale des alvéoles ainsi que de leur fonction. La déplétion des cellules club, dans un modèle de souris transgénique, suffit à déclencher une fibrose péribronchiolaire¹⁰⁶. Après irradiation en thorax entier, Groves et al observent une diminution du nombre de cellules club dans les bronchioles, 26 semaines post-irradiation, ce qui correspondrait au début de la phase fibrotique¹⁰⁷. Manning et al ont quant à eux observé la diminution persistante des cellules club dès 8 semaines après une irradiation en thorax entier à 15 Gy. Dans leur étude des effets d'une irradiation en thorax entier, à 15 Gy, Zhang et al ont mis en évidence l'apoptose des pneumocytes de type I et dans une moindre proportion celle des pneumocytes de type II et des

cellules endothéliales. Pour les auteurs, les espèces réactives de l'oxygène générées par la *NADPH oxydase 4* (NOX4) au moment de l'irradiation joueraient un rôle dans ce phénomène d'apoptose¹⁰⁸. En neutralisant les espèces réactives de l'oxygène (ROS), ils parviennent non seulement à diminuer l'apoptose des cellules épithéliales et endothéliales, mais également à empêcher l'augmentation de l'expression de NOX4 et du TGF- β .

Un autre mécanisme déterminant dans le développement de la fibrose pulmonaire radio-induite est l'entrée en sénescence des cellules. La sénescence cellulaire est définie comme un état de différenciation avancé, caractérisé par l'arrêt irréversible du cycle cellulaire, majoritairement en phase G1, une résistance à l'apoptose et un phénotype sécrétoire particulier, appelé le *senescent associated secretory phenotype* (SASP)¹⁰⁹. Il existe différents types de sénescence :

- la sénescence répllicative, programmée et déclenchée par le raccourcissement des télomères
- la sénescence induite par un oncogène, faisant partie des mécanismes suppresseurs de tumeur
- la sénescence prématurée induite par un stress

Dans un contexte d'irradiation, c'est la sénescence induite par un stress qui est observée. Les rayonnements ionisants endommagent la molécule d'ADN et génèrent des ROS lorsqu'ils pénètrent la cellule, ce qui déclenche l'entrée en sénescence des cellules. Le SASP est caractérisé donc par la sécrétion de nombreuses cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, protéases et composants de la matrice extracellulaire qui vont agir de manière paracrine sur les cellules environnantes. Ainsi, via le SASP, les cellules sénescents sont capables de recruter et d'activer les cellules du système immunitaire : lymphocytes, monocytes et macrophages¹¹⁰ ; et donc de participer à la pathogénèse de la fibrose pulmonaire radio-induite en induisant un stress oxydatif chronique, de l'inflammation et une dérégulation de la matrice extracellulaire¹¹¹. Le recrutement des cellules immunitaires via le SASP a pour rôle physiologique l'élimination des cellules sénescents. Le SASP peut également contribuer à l'entrée en sénescence des cellules voisines¹¹². De plus en plus de travaux montrent l'implication de la sénescence dans le développement des lésions pulmonaires radio-induites¹¹²⁻¹¹⁵. Trente semaines après irradiation en thorax entier à 17,5 Gy, Citrin et al observent l'entrée en sénescence des pneumocytes de type II. La sénescence participe donc à la déplétion des pneumocytes de type II observée après irradiation et même de manière plus

importante que l'apoptose. En utilisant un inhibiteur de NOX, le diphenyleneiodonium, ils bloquent l'entrée en sénescence des pneumocytes de type II, en jouant sur la voie de signalisation de p21¹¹², l'un des acteurs majeurs de la sénescence. De plus, ce traitement diminue la fibrose pulmonaire radio-induite, chez la souris, 16 semaines après l'irradiation. Il faut bien garder à l'esprit que si les pneumocytes de type II sont sénescents, ceux-ci ne peuvent pas proliférer et se différencier afin de réparer l'alvéole lésée. Pan et al ont réalisé des irradiations en hémithorax à une dose de 17 Gy, afin de déclencher une fibrose pulmonaire radio-induite. Ils ont observé une augmentation du nombre de cellules sénescents après irradiation, grâce à un marquage à la β -galactosidase. Ils ont donc testé une molécule, nommée ABT-263, capable d'induire spécifiquement l'élimination des pneumocytes de type II sénescents, afin d'objectiver les effets de la sénescence sur le développement de la fibrose pulmonaire radio-induite. L'ABT-263 permet d'inhiber Bcl-2/xl, une protéine anti-apoptotique. En traitant les souris avec l'ABT-263, seize semaines après l'irradiation, en deux injections, ils ont observé une réversion de la fibrose pulmonaire radio-induite. L'ABT-263 est donc une molécule très prometteuse mais son utilisation en clinique fait face à différents obstacles dont sa toxicité. Le Dr Soysouvanh au LRMed (thèse soutenue en Janvier 2019) s'est intéressé récemment au rôle de la sénescence dans la réponse pulmonaire aux doses ablatives (article en cours de publication). La sénescence radio-induite a été suivie après irradiation stéréotaxique pulmonaire, chez la souris, en dose unique de 90 Gy ou fractionnée à 5x20 Gy, grâce à l'utilisation de souris C57bl/6 *knock in* pour la protéine p16 couplée à la luciférase (p16^{INK4}-Luciférase). L'irradiation stéréotaxique a induit l'activation de p16 à très long terme : jusqu'à 21 mois post-irradiation. Les cellules sénescents, marquées par la β -galactosidase, sont localisées principalement autour de la lésion fibreuse. Cette sénescence radio-induite concerne les macrophages, les pneumocytes de type II et les cellules endothéliales. Ces travaux montrent le rôle important de la sénescence dans le développement des lésions pulmonaires radio-induites.

Les diverses cytokines et chimiokines sécrétées, que ce soit par les cellules immunitaires infiltrées, résidentes, les cellules épithéliales sénescents ou en apoptose activent les cellules mésenchymateuses : les fibroblastes. Parmi ces cytokines, le *Transforming Growth Factor β* (TGF- β) joue un rôle central dans le processus de fibrose¹¹⁶⁻¹²⁰. En effet la voie de signalisation du TGF- β est impliquée dans les différents processus physiopathologiques de la fibrose pulmonaire. Le TGF- β agit notamment sur les fibroblastes, cellules mésenchymateuses synthétisant et sécrétant les composants de la matrice

extracellulaire. Ces fibroblastes s'activent sous l'effet du TGF- β et se différencient en myofibroblastes. Ces myofibroblastes produisent de l' α - Smooth Muscle Actin (α -SMA)^{118,121,117}. Ils synthétisent de manière exagérée les composants de la matrice extracellulaire (MEC), notamment des fibres de collagènes et des fibres élastiques, sous l'effet du TGF- β ainsi que d'autres cytokines et chimiokines. Mais les fibroblastes résidents ne sont pas la seule source de myofibroblastes¹²². Le TGF- β déclenche également les phénomènes de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), de transition endothélio-mésenchymateuse (endoMT) et la transformation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) en myofibroblastes. L'EMT est le phénomène de changement d'un phénotype épithélial vers un phénotype mésenchymateux. De même l'endoMT signe la bascule d'un phénotype endothélial vers un phénotype mésenchymateux, sous l'influence de différents facteurs dont le TGF- β . Parmi les cellules se différenciant en myofibroblastes, notamment sous l'effet du TGF- β , il y a les fibrocytes circulants provenant de la moelle osseuse¹²³, les cellules épithéliales pulmonaires ayant subi la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)^{117-119,124,125}, les cellules endothéliales ayant subi la transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT)^{126, 118} et les CSM exprimant *gliome associated oncogen homolog-1* (Gli1)¹¹⁸ ayant subi une transition mésenchymo-mésenchymateuse (MMT). Almeida et al, après avoir observé l'apoptose des pneumocytes de type I et la prolifération des pneumocytes de type II, se sont intéressés au phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse. Ils ont mesuré l'E-cadhérine, marqueur des cellules épithéliales, et la Vimentine, marqueur des cellules mésenchymateuses, telles que les fibroblastes et les myofibroblastes. Durant les cinq mois suivant l'irradiation, ils observent une diminution de l'expression du marqueur épithélial et une augmentation de l'expression du marqueur mésenchymateux. Ils ont également pu observer la co-localisation, dans l'alvéole, du *surfactant protein C*, marqueur des pneumocytes de type II, avec l' α -smooth muscle actin (α -SMA), un marqueur mésenchymateux¹⁰¹. Cette co-localisation est la signature de la transition épithélio-mésenchymateuse. Choi et al, ont quant à eux, mis en avant le phénomène d'endoMT après irradiation thoracique en conditions stéréotaxiques (20, 50 et 90 Gy) et ont étudié son implication dans le développement de la fibrose pulmonaire radio-induite¹²⁶. L'endoMT apparaîtrait avant l'EMT des pneumocytes de type II, au début du développement de la fibrose pulmonaire radio-induite. L'endoMT est induite par l'activation de la voie du TGF- β , dépendant de l'expression d'*Hypoxia Induced Factor 1 α* (HIF-1 α), un facteur de transcription impliqué dans la réponse à l'hypoxie. En inhibant HIF1 α , ils sont parvenus à inhiber l'endoMT et à diminuer les dépôts de collagènes associés à la fibrose¹²⁶. L'hypoxie

pourrait donc déclencher l'endoMT et participer au développement de la fibrose pulmonaire radio-induite. Le *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) stimule également la prolifération des fibroblastes et myofibroblastes¹¹⁸.

L'Interleukine 33 (IL-33) fait partie des interleukines participant à la progression de la fibrose via la dérégulation de la balance entre les protéines dégradant la MEC et leurs protéines inhibitrices^{118,127} : la *Matrix Metalloproteinase 9* (MMP-9) et *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1* (TIMP1)¹²⁸. Les macrophages sécrètent du *Tumor Necrosis Factor α* (TNF- α) qui induit différentes cascades de signalisation conduisant à l'activation cellulaire, la prolifération, la différenciation, la production de cytokines et l'apoptose. Les espèces réactives de l'oxygène, également produites par les macrophages, induisent des lésions cellulaires et interagissent avec le TGF- β ¹¹⁸. Rubin et al ont démontré que le milieu de culture conditionné de macrophages alvéolaires irradiés induisait *in vitro* la prolifération des fibroblastes. Cette expérience a démontré que les cytokines et chimiokines sécrétées par les cellules après irradiation agissent de façon paracrine. De plus, ils ont montré que les macrophages alvéolaires produisent du TGF- β et du TGF- α dans une moindre proportion *in vivo*, après irradiation et ce jusqu'à un mois post-irradiation. Les macrophages possèdent également deux phénotypes d'activation : ils peuvent être polarisés selon un phénotype M1 ou un phénotype M2¹²⁹. Les macrophages M1 sont plutôt pro-inflammatoires et expriment la *Nitric Oxide synthase* (iNOS). Les macrophages M2 sont plutôt impliqués dans les processus de cicatrisation et expriment l'*arginase-1* (Arg-1). Le passage d'un phénotype à l'autre est un phénomène continu et dynamique, qui évolue tout au long de la réponse à l'irradiation. Cette activation phénotypique des macrophages est impliquée dans le développement de la fibrose pulmonaire radio-induite. En effet, De Leve et al ont mis en avant une déplétion très importante et précoce des macrophages alvéolaires après irradiation à 15 Gy en thorax entier. Les macrophages exprimant le marqueur Arg-1, associé au phénotype M2, forment des clusters durant la phase fibrotique de la réponse à l'irradiation et expriment des médiateurs pro-fibrotiques, dont le TGF- β et α -SMA⁹⁹. Zhang et al ont quant à eux observé l'augmentation de l'expression du marqueur M1 iNOS 8 à 24h après l'irradiation en thorax entier à une dose de 12 Gy, puis un retour à la valeur contrôle. Le marqueur M2 Arg-2 était, lui, exprimé de manière importante à partir de 16 semaines post-irradiation. Son expression est maintenue jusqu'à 24 semaines, temps de fin de l'étude. Ces changements de phénotype des macrophages pointent leur possible implication dans la régulation des processus d'inflammation et de fibrose¹³⁰. Plus récemment, Meziani et al ont caractérisé le rôle des

macrophages pulmonaires dans le développement de la fibrose pulmonaire radio-induite. Sur des prélèvements effectués sur des patients ayant reçu une dose totale comprise entre 35 et 60 Gy, ayant développé une fibrose pulmonaire, ils ont pu observer l'augmentation du nombre de macrophages de phénotype M2. Ainsi les macrophages de phénotype M2 seraient associés au développement de la fibrose pulmonaire¹³¹. Chez la souris, l'irradiation en thorax entier à 16 Gy a induit une déplétion des macrophages alvéolaires jusqu'à 15 jours post-irradiation. Les macrophages infiltrant ont vu leur nombre augmenter à 6 jours et 20 semaines post-irradiation. En présence d'une fibrose, l'expression du marqueur M2 Arg-1 était 40 fois plus importante dans les macrophages infiltrants que dans les macrophages alvéolaires, et 400 plus importante par rapport au poumon sain. L'irradiation a donc un impact différent sur les macrophages alvéolaires et infiltrants. De plus les macrophages infiltrants sont capables, *in vitro*, d'activer les myofibroblastes. Leur neutralisation par un anticorps anti-*colony-simulating factor receptor-1* (CSFR1) a eu un effet anti-fibrotique¹³¹.

L'ensemble de ces mécanismes (**Figure 16**) conduit à la perte d'élasticité des alvéoles. Les alvéoles deviennent fibreuses et perdent leur capacité à mener les échanges gazeux.

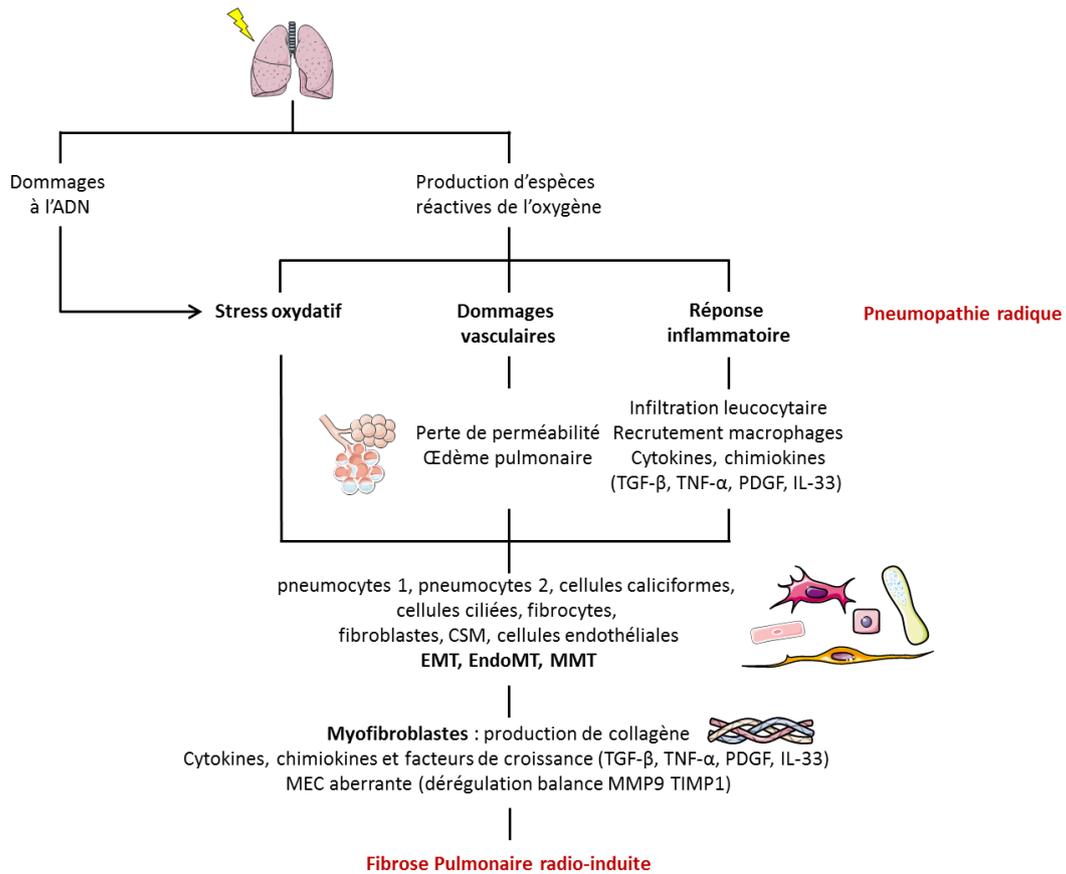


Figure 16 : Mécanismes physiopathologiques des lésions pulmonaires radio-induites : la pneumopathie radique et la fibrose pulmonaire radio-induite.

CSM : cellules souches mésenchymateuses, EMT : transition épithélio-mésenchymateuse, EndoMT : transition endothélio-mésenchymateuse, MMT : transition mésenchymo-mésenchymateuse, TGF- β : Transforming Growth Factor β , TNF- α : Tumor Necrosis Factor α , PDGF : Platelet-derived Growth Factor, IL-33 : Interleukine 33, MMP9 : metalloproteinase 9 ; TIMP1 : Tissue Inhibitor of metalloproteinase 1 (inspiré de Weiskirchen et al¹¹⁸)

Chapitre V : Outils diagnostiques, pronostiques et prise en charge thérapeutique de la pneumopathie radique

La pneumopathie radique (PR) concerne potentiellement tous les patients dont le tissu pulmonaire sain a été irradié. La sévérité de la PR varie de la présence de signes radiologiques sans symptômes à un pronostic vital engagé. Les symptômes cliniques comme radiologiques de la PR et de la fibrose pulmonaire radio-induite sont non spécifiques. Son diagnostic peut donc être délicat et un diagnostic différentiel doit être effectué. Les modifications du tissu pulmonaire visibles à la scanographie corréleront avec les changements physiopathologiques et se développent généralement dans le champ d'irradiation. Certains facteurs peuvent prédire l'apparition de la PR. La présence de facteurs de risque chez les patients augmente la probabilité de développer une PR. La prise en charge thérapeutique de la PR est généralement efficace alors que la fibrose pulmonaire radio-induite est considérée comme irréversible. Cependant des traitements anti-fibrotiques émergent.

1. Diagnostic de la pneumopathie radique

La PR peut être diagnostiquée de différentes façons : la radiologie est majoritairement utilisée mais des tests fonctionnels, ainsi que la recherche de marqueurs sériques et de facteurs de risque peuvent être réalisés. Ces deux derniers points seront abordés dans les sections suivantes.

La scanographie (tomodensitométrie haute résolution) est préférée à la radiographie pour le diagnostic de la PR. En effet, la tomodensitométrie haute résolution est plus sensible et permet de détecter des modifications du tissu pulmonaire plus précocement que la radiographie. Les changements observés après radiothérapie stéréotaxique apparaissent plus tardivement que ceux observés après radiothérapie conventionnelle. Les lésions pulmonaires radio-induites après irradiation en conditions stéréotaxiques se développent entre 3 et 6 mois après la fin du traitement contre 4 semaines après traitement conventionnel. La radiothérapie stéréotaxique diffère de la radiothérapie conventionnelle de bien des manières par la dose délivrée, la façon de délivrer la dose, la distribution de la dose, les effets biologiques et le temps de traitement. Les changements d'apparence tissulaire sont influencés par ces paramètres et diffèrent donc entre la radiothérapie conventionnelle et stéréotaxique. Les données sur les changements d'aspect des tissus à la scanographie n'ont donc pas pu être extrapolées à partir des données de la radiothérapie conventionnelle. Linda et al ont décrit les changements précoces et tardifs associés aux lésions pulmonaires radio-induites après irradiation en conditions stéréotaxiques¹³². Les changements de morphologie précoces, associés à la PR se traduisent à la scanographie par 5 motifs possibles (**Figure 17**) :

- Une absence de changement : aucun signe d'augmentation de la densité dans la région du volume cible.
- Une opacité en verre dépoli : zones irrégulières de densification au milieu du parenchyme pulmonaire normal, ne remplissant pas complètement la zone du volume cible.
- Une condensation disparate associée à une opacité en verre dépoli : augmentation de la densité du parenchyme pulmonaire par zones inégalement denses ne remplissant pas totalement la zone ayant reçu une forte dose
- Une opacité diffuse en verre dépoli : augmentation de la densité du parenchyme pulmonaire, avec préservation des marges bronchiques et vasculaires, remplissant complètement la zone irradiée à forte dose.
- Une forte opacité diffuse : forte augmentation de la densité du parenchyme pulmonaire diffuse et homogène qui obscurcit le bord des vaisseaux et des voies respiratoires dans la zone du volume cible. Un bronchogramme aérien est souvent détecté. C'est un signe radiologique dû à un contraste trop grand sur l'image entre la bronche, remplie d'air et le parenchyme pulmonaire, dont les alvéoles sont remplies d'un exsudat et de cellules.

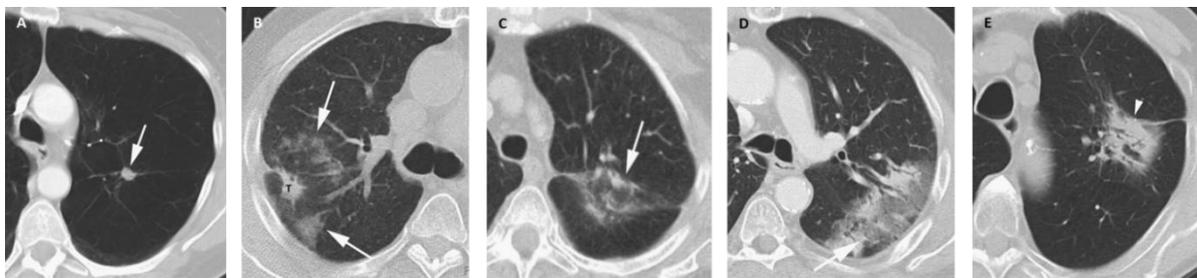


Figure 17 : les différents motifs de modifications précoces du parenchyme pulmonaire après irradiation stéréotaxique (source Linda et al 2011¹³²)

A/ Tomodensitométrie obtenue 4 mois après traitement ne montrant aucun changement B/ Tomodensitométrie obtenue 4 mois après radiothérapie stéréotaxique montrant des zones éparses en verre dépoli dans le parenchyme pulmonaire normal C/ Tomodensitométrie obtenue 5 mois après radiothérapie stéréotaxique montrant des zones éparses plus denses au sein d'une zone en verre dépoli, ne remplissant pas totalement le volume cible D/ Tomodensitométrie obtenue 5 mois après traitement montrant une opacité en verre dépoli diffuse : densification accrue du parenchyme pulmonaire au niveau du site tumoral E/ Tomodensitométrie 5 mois après traitement par radiothérapie stéréotaxique présentant une augmentation forte de la densité limitée à la zone du volume cible.

Ces lésions peuvent se résorber progressivement et sans séquelles. Elles peuvent également progresser en fibrose pulmonaire, se traduisant par des changements tardifs du motif du parenchyme pulmonaire, généralement dans les 6 à 9 mois suivant le traitement. La fibrose peut également se développer chez des individus n'ayant pas développé de modifications radiologiques précoces. La fibrose se stabilise généralement 2 ans après le traitement.

Ces changements tardifs observés sur les images scanner ont été classés en 4 motifs distincts¹³² (**Figure 18**) :

- Pas de changement : aucune augmentation de la densité au niveau du volume cible.
- Motif cicatriciel : opacité linéaire dans la région tumorale associée à une perte de volume
- Motif de masse : condensation focale limitée au site tumoral d'origine
- Motif conventionnel modifié : condensation, perte de volume, bronchectasie, semblable au motif de la fibrose pulmonaire radio-induite observée en radiothérapie conventionnelle mais moins étendue

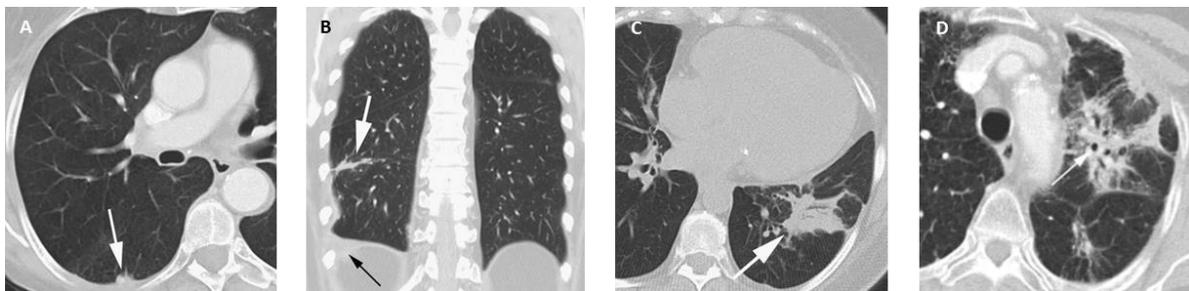


Figure 18 : Les différents motifs de modifications tardives du parenchyme pulmonaire après irradiation en conditions stéréotaxiques (source : Linda et al 2011¹³²)

A/ Tomodensitométrie obtenue 22 mois après traitement sans signe d'augmentation de la densité dans la région de la tumeur B/ Tomodensitométrie obtenue 10 mois après traitement présentant une fibrose cicatricielle : une bande linéaire de fibrose ressemblant à une cicatrice C/ Tomodensitométrie obtenue 11 mois après traitement montrant une fibrose en masse : densification en masse avec une bronchectasie au niveau du volume cible D/ Tomodensitométrie obtenue 7 mois après traitement montrant une zone irrégulière de densification avec bronchectasie dans la zone du volume cible, associée à une perte de volume du poumon gauche

La forme de ces lésions radio-induites diffère entre radiothérapie conventionnelle et radiothérapie stéréotaxique. Les lésions observées après radiothérapie conventionnelle sont linéaires, avec des marges distinctes et apparaissent en quelques semaines pour les modifications tissulaires induites par la PR. Les lésions observées après radiothérapie stéréotaxique sont plutôt sphériques et suivent surtout la forme de la tumeur. Elles apparaissent à partir de 3 mois post-irradiation, au niveau du volume cible et la zone ayant reçue une dose supérieure ou égale à 40 Gy. La forme des lésions pulmonaires radio-induites par irradiation en conditions stéréotaxiques fait que, notamment dans le cas des lésions à motif de masse, la lésion peut être confondue avec une récurrence tumorale. Dans ce cas, la scanographie sur laquelle la lésion est présente doit être comparée avec le plan de traitement, les images acquises avant le traitement. Le temps depuis le traitement doit être pris en compte, c'est l'un des facteurs principaux permettant de distinguer les lésions pulmonaires radio-induites des autres pathologies possibles. Une bronchoscopie et une tomодensitométrie par émission de positons, avec injection de Fluorodésoxyglucose (PET-scan FDG) peuvent être réalisées pour écarter le diagnostic d'une récurrence tumorale. Les symptômes cliniques des lésions pulmonaires radio-induites sont non spécifiques et peuvent être non seulement le signe d'une récurrence tumorale mais également d'une infection, de pathologies pulmonaires (BPCO) ou cardio-vasculaires. Un diagnostic différentiel et des examens complémentaires sont parfois nécessaires, notamment quand le motif observé à la scanographie est inhabituel. Une bronchoscopie ou des tests de la fonction pulmonaire peuvent être réalisés. Les lésions pulmonaires radio-induites sont associées à une diminution du volume pulmonaire, de la compliance (élasticité pulmonaire), de la capacité vitale forcée (CVF, volume d'air qui peut être expulsé de force après une inspiration complète) et de la capacité de diffusion (absorption du CO₂ à partir d'une seule inspiration dans un temps standard de dix secondes)¹¹⁶. Dans le cas d'une infection présumée, le temps auquel les opacités apparaissent à la scanographie peut guider le diagnostic : si les opacités apparaissent avant la fin du traitement, elles seront sûrement causées par une infection. De même si les symptômes apparaissent de manière soudaine : la PR est une pathologie lente et progressive, l'apparition soudaine des symptômes doit faire suspecter une infection¹³³. Si les opacités présentes à la scanographie se trouvent en dehors du champ d'irradiation, elles peuvent être le signe d'une infection ou du développement de nodules. La présence de cavitations dans les zones fibrotiques peut indiquer un processus infectieux, mais également une nécrose pulmonaire post-irradiation ou une récurrence tumorale. La disparition d'une broncheectasie observée sur les images scanner

précédentes, due à un remplissage des voies respiratoires nécessite une bronchoscopie pour en déterminer l'origine : une infection ou une récurrence tumorale¹³³.

Finalement, le diagnostic des lésions pulmonaires radio-induites est basé sur l'historique du traitement (volume cible, dose et technique), associé aux symptômes, au temps dans lequel ces symptômes se développent, aux modifications tissulaires observées à la scanographie, aux autres examens complémentaires éventuels (bronchoscopie et tests fonctionnels) et à l'exclusion des autres causes de pathologie pulmonaire.

2. Marqueurs sériques des lésions pulmonaires radio-induites

Comme vu précédemment, différentes cytokines et protéines sont impliquées dans le développement des lésions pulmonaires radio-induites. Elles peuvent servir de marqueurs sanguins pour prédire le risque de développer une PR après traitement. Ces cytokines et protéines sont, entre autres, le TGF- β , le *Krebs von den Lungen-6* (KL-6) et le *surfactant protein D* (Sft-PD).

En effet, dans les années 2000, certaines études se sont intéressées à la valeur prédictive du taux de TGF- β circulant dans le cadre de la radiothérapie conventionnelle. Comme vu à la section 6 du chapitre 4, le TGF- β joue un rôle central dans le développement de la fibrose pulmonaire en stimulant les fibroblastes et les myofibroblastes, en diminuant la dégradation de la matrice extracellulaire et en inhibant la prolifération des cellules épithéliales. Les données suivantes proviennent de traitement par radiothérapie conventionnelle. Anscher et son équipe sont les premiers à s'être intéressés au potentiel prédictif du taux sérique de TGF- β 1 chez des patients subissant un traitement par radiothérapie¹³⁴. Ils associent un taux de TGF- β moins élevé avant le traitement à un risque plus élevé de PR : en effet, les patients ayant développé une PR avaient des taux de TGF- β avant traitement moins élevés que ceux n'en ayant pas développé. De plus, ils ont mis en évidence que le retour à un taux normal après traitement permettait d'identifier les patients qui ne développeront pas de PR avec une sensibilité et une valeur prédictive positive de 90%¹³⁴. D'autres études ont confirmé qu'un taux sérique élevé et persistant de TGF- β 1 après traitement était associé au développement de lésions pulmonaires radio-induites^{135,136}. Zhao et al confirment que l'élévation du taux de TGF- β 1 circulant pendant le traitement est associé à un risque accru de développer des lésions pulmonaires radio-induites¹³⁷. En y associant la dose moyenne aux poumons, leur modèle permet une meilleure prédiction du risque de PR. Cependant, ils soulignent également que certaines équipes ne retrouvent pas ce résultat¹³⁷.

Evans et al constatent que le taux sérique de TGF- β n'est généralement pas prédictif de la PR¹³⁸. Finalement, les résultats concernant le taux sérique de TGF- β 1 en tant que facteur prédictif de la PR divergent, mais celui-ci semble prometteur.

Toujours dans le but d'améliorer la prédiction des lésions pulmonaires radio-induites dans le cadre de la radiothérapie conventionnelle, Stenmark et al ont étudié la dynamique plasmatique de différentes interleukines impliquées dans les lésions pulmonaires radio-induites ainsi que celle du TGF- β 1¹³⁹. Ils mettent en avant qu'un taux d'interleukine 8 bas est fortement associé au risque de lésions pulmonaires radio-induites, alors que l'élévation du taux sérique de TGF- β 1 pendant le traitement reste faiblement associé à ce risque. L'IL-8 est un chimioattractant des cellules polynucléées neutrophiles sécrété par les monocytes activés, les fibroblastes et les cellules endothéliales¹⁴⁰. Ils montrent également que l'intégration du taux d'IL-8, de TGF- β 1 et de la dose moyenne aux poumons dans un modèle prédictif permet d'améliorer la prédiction du risque de lésion pulmonaire radio-induite comparé à chaque variable seule¹³⁹. Ces résultats ont été confirmés par Wang et al¹⁴¹. Cependant, ces données proviennent de traitements par radiothérapie conventionnelle et l'extrapolation des données à la radiothérapie stéréotaxique n'est pas certaine. Une étude sur des patients traités par radiothérapie stéréotaxique serait donc nécessaire.

Afin de caractériser des facteurs prédictifs pour la PR après radiothérapie stéréotaxique, Yamashita et al se sont intéressés aux taux sériques de *Krebs von den Lungen-6* (KL-6) et de *surfactant protein D* (Sft-PD)¹⁴². Le KL-6 est une glycoprotéine tapissant la surface des pneumocytes de type II et des cellules bronchiolaires, présente dans le liquide alvéolaire. Sa sécrétion augmente en cas d'hyperplasie des pneumocytes de type II. L'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins en cas de lésion radio-induite permet au KL-6 de passer de l'alvéole à la circulation sanguine. Il en est de même pour le Sft-PD qui est sécrété par les pneumocytes de type II. Yamashita et al montrent une corrélation positive entre le risque de développer une PR de grade 4 ou 5 et un taux sérique élevé de KL-6 et de Sft-PD¹⁴². Les patients ayant un taux sérique élevé de KL-6 et de Sft-PD risquent donc de développer une PR aiguë sévère. Ils se sont servi de ces données pour mieux sélectionner les patients pour la radiothérapie stéréotaxique, ce qui a permis de diminuer le taux de PR de grade 4 ou 5 dans leur institut, de 18,8% avant 2006 à 3,5% après 2006¹⁴². Le taux de KL-6 permet d'évaluer le risque de PR de façon spécifique (96,3%) et sensible (93,9%). Les taux de Sft-PD et Sft-PA, sont eux un peu moins sensibles et spécifiques^{61,142}.

L'augmentation du taux de *Soluble Intracellular Adhesion Molecule 1* (sICAM-1) dans le sang, une glycoprotéine de surface exprimée par les cellules endothéliales et les cellules immunitaires, est également corrélée à une augmentation du risque de PR¹⁴³. Cependant, cette étude a été menée chez des patients ayant reçu une radiothérapie conventionnelle. Une autre glycoprotéine transmembranaire des cellules endothéliales peut servir à prédire le risque de PR : la thrombomoduline. Elle diminue en cours de traitement chez les patients ne développant pas de PR et reste stable chez ceux développant une PR⁶¹. Ces données proviennent de patients traités par radiothérapie conventionnelle.

En 2018, Groves et al ont mis en évidence un potentiel biomarqueur pour prédire le risque de fibrose pulmonaire radio-induite chez la souris en irradiation corps entier à 5 Gy suivi d'une irradiation thorax entier à 2,5 Gy, 7,5 Gy ou 10 Gy afin de déclencher une réponse systémique ainsi qu'induire une fibrose pulmonaire radio-induite¹⁰⁷. Ils se sont intéressés à la *Club Cell Secretory Protein* (CCSP) et au Sft-PD. La CCSP est sécrétée par les cellules club présentes dans les bronchioles terminales. Ils ont observé l'élévation du taux plasmatique de CCSP après irradiation et pendant la phase fibrotique chez la souris C57bl/6. De plus leurs résultats indiquent que le ratio CCSP/Sft-PD plasmatique est corrélé au développement de la fibrose pulmonaire et détectable précocement. De plus, il est spécifique des lésions radio-induites¹⁰⁷. Le ratio CCSP/Sft-PD pourrait donc être un bon marqueur sérique pour la prédiction du risque de fibrose pulmonaire radio-induite après radiothérapie.

Finalement, KL-6 et Sft-PD sont de bons marqueurs sériques prédictifs de la PR après radiothérapie stéréotaxique. Pour le TGF- β , une étude chez des patients traités par radiothérapie stéréotaxique serait nécessaire pour sa validation en tant que marqueur sérique prédictif de la PR après radiothérapie stéréotaxique. Le ratio CCSP/Sft-PD sérique est un marqueur prometteur. D'autres facteurs permettent de prédire le risque de lésions pulmonaires après radiothérapie stéréotaxique comme les facteurs de risque liés au patient, à la tumeur ou les paramètres dosimétriques.

3. Facteurs de prédisposition à la pneumopathie radique après radiothérapie stéréotaxique

Le risque de développer des lésions pulmonaires radio-induites après traitement par radiothérapie stéréotaxique est influencé par différents paramètres liés au patient, à la tumeur ou aux paramètres dosimétriques du traitement. Différentes études se sont intéressées à l'influence de ces paramètres sur l'incidence de la PR. Les résultats de ces études sont

hétérogènes et parfois contradictoires. Ceci est dû à la variabilité des paramètres de ces études comme le nombre de patients inclus, le traitement reçu, le type de facteur de risque considéré, la façon de définir les différents facteurs, la variabilité liée à la classification de la PR, le type d'analyse statistique réalisé et bien d'autres, déjà mentionnés précédemment.

Parmi les facteurs liés au patient, l'âge semble être un facteur de risque pour la PR. En effet, différentes études rapportent qu'un âge avancé augmente le risque de PR^{61,116,144-146}. Certains établissent un seuil : 50 ans¹¹⁶, 63 ans¹⁴⁶ et d'autres non^{61,144,145}. Cependant, d'autres études ne trouvent pas de corrélation significative entre l'âge le développement d'une PR^{86,147}. Le genre pourrait également influencer l'apparition de la PR, cependant les données sont contradictoires¹⁴⁴. Les femmes seraient plus susceptibles de développer une PR après radiothérapie stéréotaxique^{61,148}. Ce résultat ne fait pas l'unanimité^{145,147}. Le facteur tabagisme est également un facteur de risque très controversé. En effet, le tabagisme est considéré comme un facteur prédictif de PR. Cependant, certaines études ont mis en avant un effet protecteur du tabagisme actif. Le tabagisme actif diminuerait le risque de développer une PR car le volume fonctionnel pulmonaire est diminué^{61,144}. Mais le tabagisme par lui-même engendre une diminution de la survie. Par contre, les patients atteints de pathologie pulmonaire interstitielle, de BPCO ou présentant d'autres comorbidités sont hautement à risque de développer une PR^{61,87,116,142,144,148,149}. Un autre paramètre à prendre en compte dans la réponse aux rayonnements ionisants est la radiosensibilité individuelle du patient due à la présence de certaines mutations génétiques ou de polymorphismes d'un nucléotide (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) dans certains gènes⁹⁰. Les patients porteurs d'une mutation sur le gène *ataxia telangectasie mutated* (ATM) ou porteurs de SNP sur ce gène ont des capacités de réparation de l'ADN altérées et sont donc beaucoup plus susceptibles de développer une PR de grade 3 ou plus à la suite d'une radiothérapie^{150,151}. Un SNP dans le gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase est également associé à une augmentation du risque de PR¹⁵². D'autres polymorphismes nucléotidiques de certains gènes sont associés au risque de PR comme ceux de la *heat shock protein b1*, *PRKCE*, *DDX58* ou *TNFSF7*¹⁴⁴.

Trois paramètres liés à la tumeur sont corrélés au risque de développer une PR : les volumes cibles, la taille de la tumeur et sa localisation. Les différents volumes cibles, notamment le GTV et le PTV^{61,86,146,148,153} sont significativement associés au risque de PR. Toutefois, certaines études ne retrouvent pas cette corrélation^{87,145,147,149,154}. La taille de la tumeur est un facteur de risque pour la PR : plus la taille de la tumeur est importante, plus le risque de PR est élevé^{145,147}, avec un seuil à 2 cm car plus la taille de la tumeur sera

importante, plus le volume cible sera important. De plus, plus le ratio volume tumoral/volume de tissu sains pulmonaire augmente, plus le risque de PR augmente^{61,148}. Les lobes inférieur et moyen des poumons seraient plus radiosensibles que le lobe supérieur. Une tumeur située dans le lobe inférieur ou moyen augmenterait donc le risque de développer une PR après traitement^{61,116,144}. Ceci pourrait être expliqué par une meilleure oxygénation des lobes moyens et inférieurs grâce à une perfusion et une ventilation pulmonaire augmentées. Barriger et al ne retrouvent pas ce résultat⁸⁷. La localisation de la tumeur en central ou en périphérique n'influe pas le risque de PR après traitement^{86,145,147,154}. En effet, l'adaptation des protocoles de radiothérapie stéréotaxique pour les tumeurs centrales avec une Biological Effective Dose ou $BED_{10Gy} > 100$ Gy et une $BED_{3Gy} < 210$ Gy ont permis de diminuer les toxicités liées à la localisation centrale de la tumeur⁶¹.

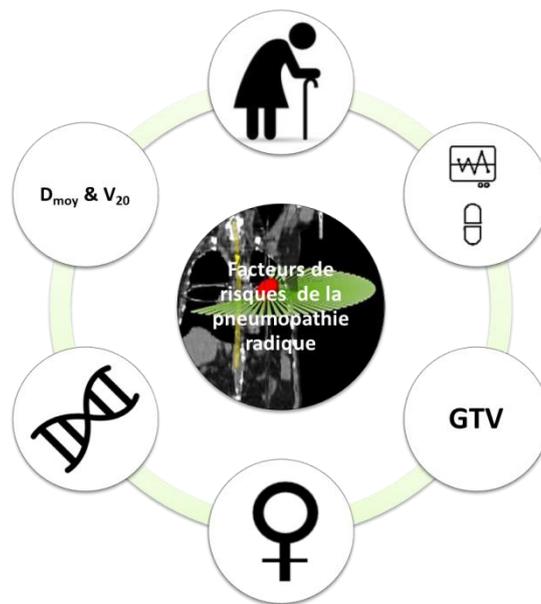


Figure 19 : Les facteurs de risque de la pneumopathie radique : l'âge, la présence de comorbidités, le GTV, le sexe féminin, les facteurs génétiques et les paramètres dosimétriques de dose moyenne au poumon et le volume ayant reçu 20 Gy.

En ce qui concerne les paramètres dosimétriques, le volume ayant reçu une certaine dose est un facteur prédictif de PR mais la dose reçue par ce volume varie selon les études. Globalement, plus le volume de tissu sain recevant une certaine dose est important, plus le risque de PR est élevé. Pour diminuer le risque de PR, il faut donc diminuer la dose reçue par

le tissu pulmonaire sain. La définition des volumes considérés pour les paramètres dosimétriques est variable d'une étude à l'autre, ce qui rend difficile l'homogénéisation de ces paramètres. En effet, selon les études, le volume de tissu sain pulmonaire peut comprendre le poumon ipsilatéral, le poumon controlatéral ou les deux poumons, plus ou moins le volume tumoral. Cependant, deux facteurs dosimétriques sont recommandés et font consensus pour diminuer le risque de PR : un volume ayant reçu 20 Gy inférieur à 10% ($V_{20Gy} < 10\%$) et une dose moyenne aux poumons inférieure à 6 Gy ($D_{moy} < 6$ Gy). Les différents paramètres dosimétriques prédictifs de la PR recensés dans différentes études sont résumés dans le **tableau 4**.

Enfin, les principaux facteurs prédictifs de la PR après radiothérapie stéréotaxique liés au patient sont l'âge, la présence de pathologie pulmonaire interstitielle, de bronchopneumopathie chronique obstructive et d'autres comorbidités. Ceux liés à la tumeur sont sa taille (> 2 cm) et le GTV. Pour les paramètres dosimétriques, il est recommandé de garder une dose moyenne aux poumons en dessous de 6 Gy et un volume ayant reçu 20 Gy en dessous de 10% du volume pulmonaire pour éviter le risque de PR (**Figure 19**).

Auteurs	Type de cancer	Nombre de patients	Traitement	Définition des volumes	Facteurs prédictifs de pneumopathie radique
Shi et al ¹⁴⁷	CBNPC T1	67	5x10 Gy (périphérique) 10x6 Gy (central)	Non précisé	Univarié : D_{moy} , $V_{2,5Gy}$ - V_{50Gy} Multivarié : $V_{10Gy} < 19\%$
Chang et al ¹⁵⁴	CBNPC T1	130	4x12,5 Gy	Poumon controlatéral	Univarié : V_{5Gy} - V_{40Gy} et D_{moy} Multivarié : $D_{moy} \geq 9,14$ Gy
Baker et al ¹⁴⁸	CBNPC et CBPC T1-T2-T3	263	40 à 60 Gy en 4 ou 8 fractions	Poumons - ITV	Univarié : V_{5Gy} , V_{13Gy} , V_{60Gy}
Nakamura et al ¹⁵³	CBNPC périphérique	56	4x12 Gy (36%) 4x13,5 Gy (3%) 4x14 Gy (61%)	Poumons - GTV	Univarié : D_{moy} , V_{5Gy} - V_{50Gy} Multivarié: $V_{25Gy} > 3,4\%$
Zhao et al ¹⁴⁵	CBNPC stade précoce	7752 ¹	Non précisé ¹	Poumons ou poumon ipsilatéral	D_{moy} V_{20Gy}
Barriger et al ⁸⁷	CBNPC T1-T2	143	3x20 Gy (39%) 3x22 Gy (15%) 3x18 Gy (13%) 4x12 Gy (13%) 3x16 Gy (4%) 3x14 Gy (4%) Autres (13%)	Poumons - GTV	PR \geq 2 $V_{20Gy} > 4\%$ $D_{moy} > 4$ Gy
Chang et al ¹⁵⁵	CBNPC T1 ou récidives localisation centrale	100	4x12,5 Gy (82%) 10x7 Gy (18%)	Poumons et poumon ipsilatéral	PR 2 ou 3 Multivarié, poumons : $D_{moy} > 6$ Gy $V_{20Gy} > 12\%$ Poumon ipsilatéral : $V_{30Gy} > 15\%$

Tableau 4 : Facteurs dosimétriques prédictifs de la pneumopathie radique après traitement par radiothérapie stéréotaxique thoracique. 1 : analyse regroupée de 88 études

4. Prise en charge thérapeutique des lésions pulmonaires radio-induites

Les complications observées après radiothérapie stéréotaxique sont le plus souvent asymptomatiques, cependant, certaines nécessitent une prise en charge thérapeutique. Le traitement spécifique à la radiothérapie stéréotaxique de ces complications n'existe pas. La prise en charge thérapeutique de ces patients doit être discutée au cas par cas par une équipe multidisciplinaire⁹⁰. Toutefois, il existe un traitement de référence pour la PR. A l'heure actuelle, aucun traitement n'est disponible pour la fibrose pulmonaire radio-induite. Différentes pistes thérapeutiques, ayant pour cible les différents processus physiopathologiques impliqués dans les lésions pulmonaires radio-induites, sont explorées dans des études précliniques et cliniques.

Parmi les stratégies préventives possibles, l'amifostine est le seul radioprotecteur utilisé en clinique, notamment en cas de risque de néphrotoxicité liée au cisplatine, de risque de neutropénie due aux cyclophosphamide-cisplatine et de risques de xérostomie dans les cancers ORL. C'est un thiophosphate, commercialisé sous le nom d'Ethyol[®], qui permet la protection des tissus sains contre la cytotoxicité des rayonnements ionisants et des produits de chimiothérapie sans protéger les cellules tumorales. Ce cytoprotecteur est un capteur des espèces réactives de l'oxygène. Son efficacité dans le cadre des lésions pulmonaires radio-induites reste mitigée^{156,157} et l'amifostine n'est actuellement pas recommandé pour la prévention des lésions pulmonaires radio-induites⁹⁰. Une autre stratégie préventive possible est l'administration d'*Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitor*, ou inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, dont le captopril. Il bloque la synthèse d'Angiotensine II, un vasoconstricteur stimulant la production d'aldostérone, son action est donc anti-hypertensive. Ward et son équipe ont testé les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine chez le rat sur un modèle d'irradiation hémithoracique. Ils ont mis en évidence que le captopril améliore la dysfonction endothéliale après irradiation et atténue la fibrose pulmonaire radio-induite en diminuant le dépôt de fibres de collagène¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Dans une étude rétrospective chez des patients traités par radiothérapie 3D-CRT menée par Kharofa et al, le captopril a permis de diminuer l'incidence de la PR¹⁶¹. L'essai clinique prospectif RTOG 0123 ayant pour but de tester l'utilité du captopril pour limiter les lésions pulmonaires après radiothérapie n'a pas pu être mené à terme à cause d'un nombre insuffisant de patients. Cependant, cette étude a permis de mettre en avant l'innocuité des inhibiteurs de l'ACE administrés en début de radiothérapie¹⁶². Deux essais cliniques prospectifs se sont également intéressés au traitement par pentoxifylline. La pentoxifylline est un vasodilatateur

artériel inhibant l'agrégation des plaquettes. Des actions immunomodulatrices et anti-inflammatoires ont également été rapportées pour la pentoxifylline via l'inhibition du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-1⁹⁰. La première étude prospective randomisée contre placebo après radiothérapie 3D-CRT pour un cancer du sein ou du poumon a rapporté une diminution de l'incidence de PR de grade 2 ou 3 avec une meilleure diffusion du CO₂ lors des épreuves fonctionnelles dans le groupe traité avec la pentoxifylline¹⁶³. Le deuxième essai clinique prospectif randomisé s'est intéressé à l'association pentoxifylline et vitamine E après radiothérapie pulmonaire 3D-CRT. Cette association a permis de diminuer l'incidence de la PR¹⁶⁴. La pentoxifylline diminuerait donc les toxicités pulmonaires après radiothérapie et permettrait de préserver la fonction pulmonaire.

Quand la PR symptomatique s'est développée, sa prise en charge thérapeutique consiste en une corticothérapie : un glucocorticoïde, la prednisone, est administré à 1mg/kg/j pendant 2 à 4 semaines puis la dose est progressivement et lentement diminuée pendant plusieurs semaines^{90,116,121}. Ce traitement permet de soulager les symptômes et de résorber les signes radiologiques de la PR. En cas de contre-indication pour les glucocorticoïdes, des immunosuppresseurs peuvent être administrés : l'azathioprine et la cyclosporine⁹⁰. Les glucocorticoïdes et les anti-inflammatoires sont inefficaces en cas de fibrose pulmonaire radio-induite. Cependant un traitement de support peut être mis en place, semblable à celui mis en place pour la BPCO avec une kinésithérapie, l'administration de bronchodilatateurs et une oxygénothérapie en cas d'insuffisance respiratoire. Dans le cadre de la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI), l'association de la pirfenidone et de la nintedanib a été approuvée comme traitement¹⁶⁵. En effet, cette association permet de diminuer le taux de déclin de la fonction pulmonaire et augmente la survie chez les patients atteints de FPI. La pirfenidone est une pyridone de synthèse avec des propriétés immunosuppressives, anti-fibrotiques et anti-inflammatoires. C'est également un anti-oxydant. Après irradiation pulmonaire chez la souris (irradiation thorax entier), la pirfenidone augmente la survie des animaux, atténue les signes radiologiques des lésions pulmonaires radio-induites, diminue l'infiltration des cellules inflammatoires, diminue le dépôt de collagène et inhibe la signalisation du TGF- β ¹⁶⁶. Un essai clinique (NTC03902509) vient d'être lancé pour tester l'innocuité et l'efficacité de la pirfenidone pour le traitement des lésions pulmonaires radio-induites. Le nintedanib a pour cible les récepteurs au VEGF, au FGF et au PDGF. Il interfère ainsi avec les processus fibrotiques tels que la prolifération, la migration et la différenciation des fibroblastes et la sécrétion de la matrice extracellulaire. Une étude préclinique chez la souris a montré que le

traitement par nintedanib permettait de diminuer la fibrose et l'inflammation interstitielle mais également la fibrose et l'inflammation périvasculaire induites par l'irradiation avec un collimateur de 5 mm. Ce traitement a permis de résorber l'œdème alvéolaire, l'infiltration des lymphocytes et la vascularite déclenchés par l'irradiation¹⁶⁷. Toutefois, le nintedanib n'affecte pas l'épaississement des septa alvéolaires et l'infiltration des macrophages. Ce traitement prometteur n'a pas encore été testé chez l'homme dans le cadre des complications pulmonaires radio-induites.

L'un des premiers effets des rayonnements ionisants sur la matière organique est la production d'espèces réactives de l'oxygène via la radiolyse de l'eau. Ces espèces réactives de l'oxygène sont à l'origine de la plupart des dommages à l'ADN et sont extrêmement cytotoxiques. Les cellules sont cependant équipées de machineries enzymatiques permettant de prendre en charge ces espèces réactives de l'oxygène comme les *superoxydes dismutases* (SOD) et les *glutathion peroxidase* (GPx). Les *superoxydes dismutases* catalysent la dismutation de l'ion superoxyde (O_2^-) en dioxygène et peroxyde d'hydrogène ($O_2^- + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$). La glutathion peroxydase catalyse la réaction de neutralisation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) via l'oxydation du glutathion ($2GSH + H_2O_2 \rightarrow GS-SG + 2 H_2O$, GSH : glutathion réduit, GS-SG : glutathion oxydé). Epperly et al ont mis en évidence que la surexpression de la manganèse SOD chez la souris permet leur protection contre la fibrose pulmonaire radio-induite en thorax entier¹⁶⁸. Quant à la glutathion peroxidase, certaines études ont mis en avant le lien entre un taux diminué de GPx et le risque de PR chez l'homme¹⁶⁹. D'autres molécules anti-oxydantes sont étudiées comme la génistéine, une isoflavone du soja. C'est un inhibiteur non spécifique des protéines kinases à tyrosine, bloquant notamment l'action du *Nuclear Factor kappa B* (NFκB), et un capteur des espèces réactives de l'oxygène. La génistéine permet de diminuer l'infiltration et l'activation des macrophages alvéolaires et des neutrophiles après irradiation pulmonaire chez la souris¹⁷⁰. Elle diminue également le taux de *Nitric Oxyde Synthase 2* (NOS2), un marqueur des macrophages M1 pro-inflammatoires et augmente le taux d'*Arginine-1* (Arg-1), un marqueur des macrophages M2 anti-inflammatoires. Ces résultats suggèrent que la génistéine est capable de changer le phénotype des macrophages, les faisant passer d'un phénotype pro-inflammatoire à un phénotype anti-inflammatoire¹⁷⁰. Une étude de Calveley et al chez le rat a mis en évidence la capacité de la génistéine à diminuer les dommages à l'ADN produits par les espèces réactives de l'oxygène¹⁷¹. Les macrophages sont une cible thérapeutique très intéressante. En effet, Meziani et al ont récemment démontré l'implication des macrophages

et notamment des macrophages interstitiels dans le développement des lésions pulmonaires radio-induites après irradiation à forte dose en thorax entier¹³¹. La déplétion spécifique des macrophages interstitiels grâce à un anticorps anti-*Colony-Stimulating Factor Receptor-1* (anti-CFSR1) permet de diminuer la fibrose pulmonaire radio-induite. Ils ont également écrit une revue en 2018 le rôle des macrophages en tant que nouvelle cible thérapeutique pour le traitement des lésions pulmonaires radio-induites¹⁷².

Les statines, en dehors de leur activité d'hypolipémiants, auraient un intérêt dans la prise en charge des toxicités pulmonaires après irradiation. En effet, différentes études ont mis en avant que les statines permettent d'améliorer le fonctionnement des cellules endothéliales, ont un effet anti-oxydant, immunomodulateur et anti-inflammatoire vasculaire^{90,169}. L'une des statines la plus étudiée est la lovastatine, un inhibiteur non spécifique de l'expression du *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) impliqué dans la migration des macrophages. La lovastatine améliore la survie dans un modèle murin d'irradiation thoracique à forte dose, diminue l'infiltration des macrophages et atténue la PR¹⁷³. Une autre piste thérapeutique potentielle ayant pour cible les cellules inflammatoires est l'utilisation d'un anticorps anti-CD40. Le CD40 fait partie de la famille des récepteurs au *Tumor Necrosis Factor* (TNF) présent chez les lymphocytes B, les macrophages et les cellules dendritiques. Ces cellules sont activées par les cellules porteuses du ligand du CD40 : les lymphocytes T, les mastocytes et les éosinophiles. L'interaction du CD40 avec son ligand déclenche une réponse pro-inflammatoire. En bloquant cette interaction grâce à un anticorps dans un modèle murin, Adawi et al ont réussi à améliorer la survie des animaux, à limiter l'infiltration des macrophages et à minimiser le dépôt de collagène et l'épaississement des septa alvéolaires après irradiation thoracique¹⁷⁴.

Le TGF- β est une cytokine centrale dans le développement de la fibrose, ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante. L'halofuginone est une molécule inhibitrice du TGF- β qui serait capable de diminuer la fibrose pulmonaire radio-induite en diminuant la synthèse de collagène¹⁷⁵. Des anticorps anti-TGF- β seraient également efficaces sur la fibrose pulmonaire radio-induite chez la souris⁹⁰. L'imatinib est une molécule inhibitrice du PDGF permettant donc l'inhibition indirecte de la voie de signalisation du TGF- β dans les fibroblastes. Cette molécule permet de diminuer la fibrose pulmonaire radio-induite chez la souris⁹⁰. Ces molécules inhibitrices du TGF- β n'ont pas encore été testées chez l'homme, probablement à cause de l'implication du TGF- β dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Le TNF- α ¹⁶⁹, IL-1¹⁶⁹, IL-13¹⁷⁶, le facteur de transcription STAT3¹¹⁶,

l'anticorps anti-CTGF FG3019¹⁷⁷ et le récepteur au TGF- β ¹⁶⁹ sont également des cibles thérapeutiques prometteuses pour atténuer les toxicités pulmonaires après radiothérapie. Les inhibiteurs de la synthèse du collagène comme la colchicine, la pénicillamine et l'Interféron- γ (INF- γ) sont également des pistes thérapeutiques intéressantes mais qui restent à être étudiées chez l'homme dans le contexte de la fibrose pulmonaire radio-induite⁹⁰.

Les micro-ARNs (miRNA) sont des séquences régulatrices d'ARN simple brin composées de 21 à 24 nucléotides impliquées dans de nombreux processus physiologiques mais également dans l'oncogénèse. Les miRNAs sont de ce fait des cibles thérapeutiques potentielles contre le cancer par leurs actions radiosensibilisantes pour les tumeurs¹⁷⁸. Kwon et al ont utilisé un modèle pré-clinique imitant la radiothérapie stéréotaxique pulmonaire, avec un collimateur de 3 mm et une dose de 90 Gy, chez la souris C57bl/6 et analysé les micro-ARN. Ils ont remarqué l'augmentation de l'expression de miR-21 au niveau des dépôts de collagène. L'inhibition de miR-21 a permis de diminuer l'expression des collagènes par les fibroblastes pulmonaires et donc de diminuer la fibrose pulmonaire radio-induite¹⁷⁹. Différents processus régulés par les miRNA, dont miR-34a et miR-21, sont impliqués dans les processus physiopathologiques des lésions radio-induites, ce qui en fait des cibles thérapeutiques potentielles intéressantes^{178,179}.

Les cibles thérapeutiques les plus prometteuses pour la prise en charge des complications pulmonaires radio-induites sont les espèces réactives de l'oxygène, les cellules inflammatoires, les cytokines et les collagènes. En effet, ce sont les acteurs centraux de la pathogénèse des lésions pulmonaires radio-induites. Une autre avancée thérapeutique prometteuse est l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) et des cellules progénitrices dans le cadre de la thérapie cellulaire. La thérapie cellulaire, avec l'utilisation de CSM, a montré son efficacité dans le cas des lésions radio-induites à l'intestin¹⁸⁰ et pourrait être une piste thérapeutique pour l'atténuation des lésions pulmonaires radio-induites. L'utilisation des CSM fait l'objet d'essais cliniques dans le cadre de la fibrose pulmonaire idiopathique¹⁸¹⁻¹⁸³. Maria et al ont apporté la preuve que l'utilisation des CSM était possible dans un contexte de lésion pulmonaire radio-induite. Ils ont irradié, en thorax entier, des rats à 16 ou 20 Gy. Ils ont ensuite dissocié les cellules du tissu pulmonaire et les ont mises en co-culture avec des CSM. Les CSM se sont alors différenciées en cellules club et en pneumocytes de type II (à 40 et 50% pour la dose de 16 Gy et à 30 et 40% respectivement à 20 Gy)¹⁸⁴. Différents pourcentages de MSC adoptent le phénotype des cellules club ou des pneumocytes de type II en fonction de la dose administrée : cela est probablement lié à la

sévérité des lésions radio-induites. En ce qui concerne les essais cliniques, un seul s'est intéressé à l'utilisation des CSM pour le traitement de la fibrose pulmonaire radio-induite : le NCT02277145 « *A Study on Radiation-induced Pulmonary Fibrosis Treated With Clinical Grade Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells* » (clinicaltrials.gov). Les résultats n'ont pas encore été publiés.

Chapitre VI : Radiobiologie des doses ablatives

La comparaison des bénéfices d'un traitement et de ses risques est appelée balance bénéfique/risque. Dans le cadre de la radiothérapie, cela consiste à administrer une dose de rayonnements ionisants suffisante pour détruire les cellules tumorales, sans que cette dose n'induisse de toxicité aux tissus sains. La compréhension des mécanismes sous-jacents à l'efficacité clinique de la radiothérapie stéréotaxique implique une bonne connaissance des processus radiobiologiques et radiopathologiques de la réponse aux rayonnements ionisants de la tumeur et des tissus sains. Dans ce chapitre, nous allons voir les mécanismes de base de la radiobiologie et comment ceux-ci entrent en jeu dans la réponse aux fortes doses par fraction ainsi que les spécificités radiobiologiques de cette réponse aux fortes doses par fraction.

1. Les 5Rs

Le fractionnement de la dose en radiothérapie, à 2 Gy/fraction et 1 fraction par jour (normo-fractionnement), permet d'épargner les tissus sains tout en obtenant une réponse tumorale suffisante pour atteindre le contrôle local de la maladie. La différence observée entre ces deux réponses (tumeur vs tissus sains) et donc la probabilité d'atteindre le contrôle local après radiothérapie normo-fractionnée est basée sur 4 phénomènes radiobiologiques décrits en 1975 par Withers. Ce sont les 4R de la radiothérapie¹⁸⁵ :

- Réparation des dommages sublétaux dans les cellules saines et tumorales
- Ré-oxygénation de la tumeur
- Redistribution dans le cycle cellulaire
- Régénération des cellules saines et des cellules tumorales entre les fractions

Withers précise cependant que d'autres facteurs pourraient avoir un rôle dans cette réponse différentielle entre cellules saines et cellules tumorales comme la conservation de l'intégrité de l'architecture du tissu sain, le volume de tissu irradié ou l'immunocompétence du patient¹⁸⁵.

a. Réparation des dommages à l'ADN

L'interaction des rayonnements ionisants avec la macromolécule d'ADN va induire des dommages à l'ADN : altération ou perte de bases, cassures simple brin et cassures double brin, pontages inter et intra-brin. Ces dommages à l'ADN peuvent être directement létaux pour la cellule ou sublétaux, c'est-à-dire que la cellule peut réparer son ADN et reprendre sa progression dans le cycle cellulaire. La réparation des dommages sublétaux est un processus

complexe impliquant différentes machineries enzymatiques. La capacité de réparation varie donc d'un tissu à l'autre et varie d'un type de tumeur à l'autre. Plus la machinerie de réparation de l'ADN est efficace, plus les cellules seront résistantes aux rayonnements ionisants. L'altération ou la perte de base peuvent être réparées par excision de l'anomalie et resynthèse du brin altéré par complémentarité avec le brin intact. Lors de cassures simple brin, la réparation se fait également par complémentarité avec le brin intact. En cas de cassure double brin, la réparation se fait par recombinaison homologue (RH), c'est-à-dire que la portion endommagée est échangée avec la portion correspondante du chromosome homologue pour que celui-ci serve de matrice. La cassure est ensuite réparée par complémentarité des bases de l'ADN. Un autre processus de réparation de la cassure double brin, plus rapide mais moins précis, peut également être mis en place : la réparation par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ). Les deux bouts de la molécule d'ADN sont joints, sans séquence ADN homologue. Ce processus de réparation génère souvent de petites insertions ou délétions au niveau du site de cassure. Le processus de réparation, quelle que soit la lésion, est mis en place rapidement, environ 30 minutes après irradiation¹⁸⁶. Les tissus tumoraux et les tissus sains à réponse rapide à l'irradiation sont des tissus proliférant rapidement, d'où l'expression rapide des dommages. En effet, s'ils sont mal réparés, les dommages à l'ADN entraîneront la mort cellulaire au moment de la division. Le fractionnement de la dose en radiothérapie est mis en place pour protéger les tissus sains. Il permet aux cellules de réparer les dommages sublétaux radio-induits et donc d'augmenter la survie cellulaire. Le différentiel tumeurs/tissus sains est basé sur la capacité de réparation des dommages plus importante que possèdent les tissus sains par rapport aux tumeurs. Le temps entre chaque fraction laissera donc l'opportunité aux cellules saines de réparer leurs dommages sublétaux, protégeant ainsi le tissu.

b. Réoxygénation

L'oxygène joue un rôle majeur dans le développement des dommages cellulaires radio-induits. En effet, les rayonnements ionisants vont interagir avec les molécules d'eau présentes dans la cellule et induire la radiolyse de l'eau. Cette radiolyse de l'eau va engendrer des espèces réactives de l'oxygène : O_2^- , $H\cdot$, $HO\cdot$, H_2O_2 qui vont oxyder les différents composants cellulaires comme l'ADN, les protéines et les lipides, induisant ainsi des dommages cellulaires indirects. Les tumeurs solides sont très souvent partiellement hypoxiques. En effet, la distance à laquelle les cellules tumorales vont se trouver par rapport aux vaisseaux sanguins tumoraux va jouer sur la disponibilité de l'oxygène. Les cellules

tumorales hypoxiques sont donc radio-résistantes dans le sens où elles subiront moins de dommages cellulaires liés à la génération d'espèces réactives de l'oxygène qu'une cellule tumorale normoxique. Lorsqu'une tumeur est irradiée à une dose suffisante, toutes les cellules oxygénées meurent, la fraction hypoxique augmente très transitoirement, représentant la quasi-totalité de la tumeur, puis immédiatement après, la fraction hypoxique chute : c'est réoxygénation^{186,187} (**Figure 20**). La ré-oxygénation varie selon les tumeurs et sa vitesse varie de quelques heures à quelques jours après l'irradiation. Le niveau d'hypoxie des cellules peut être plus élevé ou plus faible après ré-oxygénation qu'avant l'irradiation¹⁸⁶. Cette ré-oxygénation des cellules tumorales a lieu via différents mécanismes : la recirculation du sang dans les vaisseaux qui étaient fermés ou obstrués par des cellules tumorales, la diminution de la respiration cellulaire (donc augmentation de la diffusion de l'oxygène) à cause de la mort cellulaire. La mort cellulaire réduit également la taille de la tumeur et donc la distance entre les cellules et les vaisseaux sanguins tumoraux¹⁸⁶. La ré-oxygénation de la tumeur pendant un traitement par radiothérapie fractionnée est avantageuse car les cellules tumorales ré-oxygénées deviennent plus radiosensibles¹⁸⁵. La ré-oxygénation permet donc d'augmenter l'efficacité thérapeutique d'un traitement fractionné par rapport à une dose unique. Ce phénomène de ré-oxygénation des cellules tumorales entre les fractions est supporté en clinique par le fait que le contrôle local de la maladie peut être atteint en 30 à 35 fractions de 2 Gy, en accord avec les données de la fraction survivante à 2 Gy obtenue sur des cellules tumorales oxygénées¹⁸⁶.

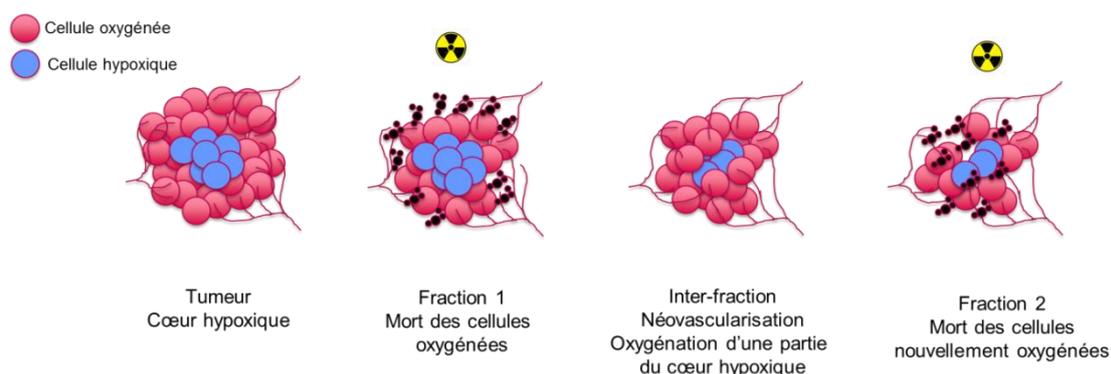


Figure 20 : Ré-oxygénation de la fraction de cellules tumorales hypoxiques après irradiation

c. Redistribution dans le cycle cellulaire

La radiosensibilité des cellules varie selon la phase du cycle cellulaire dans laquelle elles se trouvent au moment de l'irradiation^{185,186}. Ceci concerne toutes les cellules. Le cycle cellulaire est composé de 4 phases :

- la phase G1, correspondant à une phase de croissance de la cellule
- la phase S, pendant laquelle l'ADN va être répliqué
- la phase G2, pendant laquelle le centrosome va être répliqué
- la phase M, pendant laquelle a lieu la mitose et la séparation des deux cellules filles.

La phase M et la phase G2 sont les deux phases les plus radiosensibles car les dommages sublétaux radio-induits ne sont pas réparés après le passage du checkpoint G2-M, ce qui mène à la mort des cellules par catastrophe mitotique. Le début de la phase G2 est un peu moins radiosensible car la réparation par recombinaison homologue est encore possible. La phase S est plus radio-résistante, particulièrement à la fin de la phase. En effet, la réplication de l'ADN a lieu pendant la phase S, l'ADN est donc décondensé, ce qui facilite l'accès aux machineries enzymatiques chargées de la réparation de l'ADN telles que les enzymes nécessaires à la recombinaison homologue. Avec l'irradiation, une partie des cellules perd son intégrité reproductive. Le nombre de cellules conservant cette intégrité est plus important pendant la phase S. Après irradiation, la fraction survivante est donc partiellement synchronisée. Avec le temps, la fraction survivante progressera dans le cycle cellulaire et retrouvera la même distribution dans les différentes phases du cycle cellulaire qu'avant l'irradiation. C'est le phénomène de redistribution des cellules dans le cycle cellulaire (**Figure 21**). Les cellules tumorales ont une vitesse de progression dans le cycle très hétérogène, la synchronisation partielle observée après irradiation est très vite perdue et la redistribution est donc rapide. Le fractionnement de la dose en radiothérapie permet donc aux cellules tumorales en phase radio-résistante du cycle et ayant survécu à la première fraction, de progresser dans le cycle cellulaire et d'être dans une phase plus radiosensible lorsqu'une autre fraction est administrée. En ce qui concerne les tissus sains, la redistribution dans le cycle cellulaire se fera assez rapidement pour les tissus sains à réponse précoce. Effectivement, ces tissus sains à réponse rapide sont des tissus à renouvellement rapide. Pour ces tissus, la redistribution dans le cycle cellulaire est un facteur contribuant à l'augmentation de la mort cellulaire après irradiation. Par contre, pour les tissus sains à réponse tardive, le temps de

renouvellement du tissu est plus long ainsi que la durée de vie des cellules. La redistribution dans le cycle cellulaire a donc peu d'influence¹⁸⁸. Du point de vu des tissus sains, la régénération du tissu sain permet d'augmenter sa tolérance aux rayonnements ionisants, notamment quand le temps du traitement augmente. Ce mécanisme concerne surtout les tissus sains à réponse rapide et a peu d'influence sur les tissus sains à réponse tardive¹⁸⁶. Les mécanismes de régénération des tissus sains à réponse rapide reposent sur la prolifération des cellules souches et mettent un certain temps à se mettre en place. Les cellules souches permettent le renouvellement du tissu grâce à leur division asymétrique : une cellule souche se divise en une cellule souche et une cellule qui va se différencier. Après irradiation, cette asymétrie des divisions est perdue, de manière complète ou non, ce qui permet de compenser la perte cellulaire du compartiment souche. Cette perte de l'asymétrie des divisions diminue le temps pour lequel elles complètent un cycle cellulaire : il y a accélération du cycle cellulaire. Ainsi le compartiment souche est régénéré et permet la régénération du tissu.

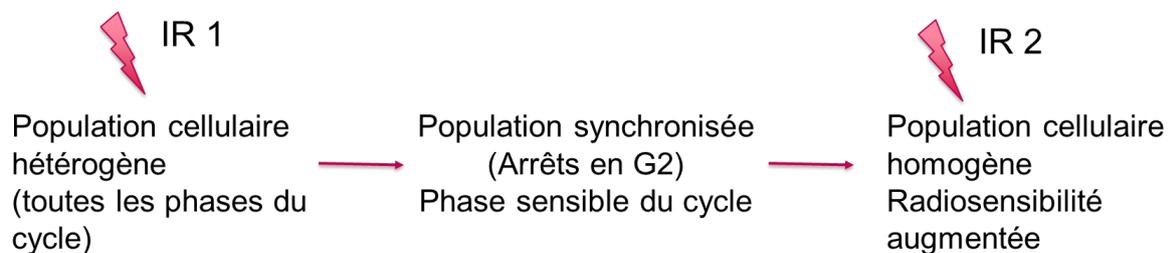


Figure 21 : Redistribution des cellules dans le cycle cellulaire

d. Régénération

A chaque fraction du traitement, la population de cellules tumorales clonogènes, c'est-à-dire des cellules tumorales capables de donner naissance à un clone puis à une tumeur, diminue. En réaction à cette dépopulation, le tissu peut répondre par régénération ou repopulation. Les cellules clonogènes survivantes vont proliférer et ainsi régénérer la tumeur. Le taux de régénération varie selon les tissus. Cette régénération peut donc avoir lieu pendant le traitement ou après. Si cette régénération arrive pendant le traitement ou si le temps entre les fractions permet à la tumeur de se régénérer, l'efficacité du traitement diminuera. Il faudra une dose totale plus importante pour atteindre le contrôle local de la maladie. La réoxygénation serait impliquée dans la régénération des cellules tumorales ainsi que la prolifération^{189,190}.

En 1989, Steel et al, ajoute un paramètre à ces 4 facteurs influençant l'efficacité de la radiothérapie fractionnée : la radiosensibilité intrinsèque des différents types de tumeurs¹⁹¹. Les 4R de la radiobiologie deviennent les 5R de la radiobiologie (**Figure 22**). Cette radiosensibilité intrinsèque est mise en avant par les différentes pentes observées sur les courbes de survie réalisées avec des lignées cellulaires établies à partir de tumeurs répondant à la radiothérapie. Cette radiosensibilité intrinsèque influe évidemment sur l'efficacité de la radiothérapie fractionnée.

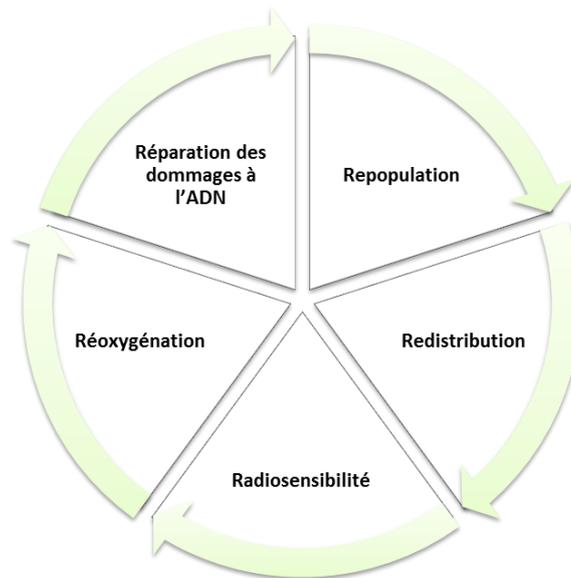


Figure 22 : Les 5 R de la radiobiologie

Aujourd'hui, les 5R sont un rationnel biologique majeur pour le traitement des tumeurs par radiothérapie normo-fractionnée. Par contre, leur rôle dans la réponse à l'hypofractionnement sévère, dans le cadre de la radiothérapie stéréotaxique est discuté. En effet, lors d'un traitement par radiothérapie stéréotaxique l'irradiation est plus longue car la dose par fraction est plus importante. La réparation des dommages sublétaux à l'ADN se met donc en place pendant l'irradiation^{192,193}. Cette réparation des dommages sublétaux au sein des cellules tumorales pendant l'irradiation pourrait entraîner une diminution de l'effet biologique du traitement¹⁹⁴. Certains auteurs estiment que si le temps d'irradiation dépasse trente minutes cela pourrait diminuer l'effet biologique du traitement de façon significative cliniquement^{195,196}, de l'ordre de 10%¹⁹⁷. Cependant, les données cliniques manquent et ce phénomène nécessite d'être étudié. Les fortes doses par fraction entraînent l'apoptose par la

voie des céramides des cellules endothéliales et des dommages vasculaires tumoraux. Ces mécanismes seront décrits dans la suite de ce chapitre, section 4. La réoxygénation des cellules tumorales hypoxiques est donc compromise. Par contre, avec la mort cellulaire, la taille de la tumeur diminue et la consommation d'oxygène diminue : la diffusion de l'oxygène augmente ce qui pourrait permettre la réoxygénation des cellules tumorales survivantes^{192,193}. Ces mécanismes restent à élucider. En radiothérapie stéréotaxique, la redistribution des cellules tumorales dans les différentes phases du cycle serait inexistante^{192,193}. En effet, après irradiation à forte dose, les cellules restent bloquées dans la phase du cycle cellulaire dans laquelle elles se trouvaient au moment de l'irradiation^{193,198}. Cet arrêt dans le cycle mènerait à l'apoptose et l'entrée en sénescence des cellules¹⁹². En ce qui concerne le phénomène de régénération des cellules clonogènes tumorales, il n'existerait pas en radiothérapie stéréotaxique. En effet, le temps de traitement est raccourci en radiothérapie stéréotaxique : le traitement est administré en moins de 15 jours alors que les phénomènes de régénération en radiothérapie normofractionnée sont observés deux à trois semaines après le début du traitement¹⁹³. D'autres se demandent si la régénération des cellules clonogènes pourrait être présente aux fortes doses par fraction et apparaître plus tôt que lors d'un traitement normofractionné. De plus, d'autres mécanismes, détaillés dans la section 4, spécifiques des fortes doses par fraction ne sont pas compris dans les 5R comme l'apoptose des cellules endothéliales et l'immunité anti-tumorale accrue^{192,193,199}.

2. Le fractionnement en radiothérapie

A travers l'histoire de la radiothérapie, trouver l'étalement et le fractionnement optimaux du traitement a été l'une des principales préoccupations des radiothérapeutes. L'optimisation des protocoles de radiothérapie tient de la relation entre la dose totale et la dose par fraction¹⁸⁶. En effet, le principe du fractionnement est basé sur la différence de réponse entre les tissus sains à réponse précoce, les tissus sains à réponse tardive et la réponse tumorale. Thames et al ont mis en évidence cette dissociation des réponses précoces et tardives pour les tissus sains avec la dose par fraction en 1982²⁰⁰.

La première radiothérapie anticancéreuse de l'histoire, réalisée par Victor Despeignes, est déjà un traitement fractionné. Avec une séance tôt le matin et une séance tard le soir, Victor Despeignes a fractionné le traitement plus pour des raisons pratiques pour s'accommoder de son emploi du temps de médecin de campagne que pour des raisons

radiobiologiques ou radiopathologiques²⁰¹. Le principe du fractionnement en radiothérapie trouve son origine notamment dans les travaux de Regaud, sur la stérilisation des testicules de lapin en dose fractionnée, permettant ainsi d'éviter le développement de lésions cutanées. Henri Coutard participa également activement au développement du principe de fractionnement de la dose en clinique, avec son papier princeps de 1932 sur le traitement de cancers oto-rhino-laryngés²⁰². Dans ce papier, il rapporte non seulement la rémission de ses patients mais décrit également les réactions radio-induites de la peau et des muqueuses. Il montre ainsi que ces réactions dépendent de doses spécifiques sur la durée totale du traitement²⁰³. Henri Coutard y soumet également l'idée d'administrer deux fractions par jour quand le traitement ne dépasse pas 18 jours. Le principe du fractionnement en radiothérapie a toujours le même but aujourd'hui : obtenir une réponse tumorale suffisante pour éradiquer la tumeur tout en épargnant les tissus sains pour éviter les réactions radio-induites. Le fractionnement conventionnel, tel qu'on le connaît aujourd'hui, à 2 Gy par fraction, 5 fractions par semaine semble être né des discussions entre Regaud et Coutard à l'Institut du Radium (l'ancien nom de l'Institut Curie) dans les années 1920/1930^{202,204} : Regaud avec son idée de réduire l'étalement du traitement pour éradiquer la tumeur et Coutard avec son idée de fractionner la dose pour protéger les tissus sains. Ce fractionnement conventionnel est encore largement utilisé en clinique aujourd'hui. La dose totale administrée lors de ces protocoles dépend de la radiosensibilité de la tumeur et des organes à risque avec comme contrainte, le taux de contrôle local et l'incidence des toxicités aux tissus sains.

Le terme d'hyperfractionnement décrit un traitement dont la dose par fraction a été diminuée par rapport aux 2 Gy par fraction administrés en fractionnement conventionnel. Le nombre de fractions est alors augmenté. Généralement ces traitements hyperfractionnés consistent en l'administration de deux fractions par jour. Le rationnel de l'hyperfractionnement est basé sur la différence d'effet de la dose par fraction sur la tumeur par rapport aux tissus sains à réponse tardive. En effet, une modification de la dose par fraction aura peu d'effet sur la réponse tumorale alors qu'elle aura un effet important sur l'incidence et la sévérité des toxicités des dommages tardifs aux tissus sains. Cette réponse différentielle entre tissus sains à réponse tardive et la tumeur provient de leur capacité différente à réparer les dommages sublétaux à l'ADN entre les fractions¹⁸⁶. En clinique, l'hyperfractionnement permet une escalade de dose, c'est-à-dire une augmentation de la dose totale par rapport au protocole conventionnel. Ceci a pour but d'augmenter le taux de contrôle local de la tumeur tout en évitant une augmentation du taux de complications tardives.

Le terme d'hypofractionnement décrit un traitement pour lequel la dose par fraction est supérieure aux 2 Gy par fraction administrés en radiothérapie conventionnelle. Par conséquent, le nombre total de fractions est diminué. Selon les lois de la radiobiologie, un tel traitement devrait mener à un contrôle local moins bon et plus de toxicité tardive pour un même temps de traitement par rapport au traitement conventionnel si le ratio α/β de la tumeur est beaucoup plus élevé que celui des tissus sains à réponse tardive. Dans ce cas, la dose totale administrée est légèrement diminuée par rapport à la dose totale qui aurait été administrée en fractionnement conventionnel. Mais cette diminution de la dose totale pourrait diminuer le taux de contrôle local. Toutefois l'hypofractionnement permet de diminuer le temps total du traitement ce qui permet de contrebalancer cette diminution de la dose totale : la diminution du temps de traitement devrait augmenter le taux de contrôle local tumoral en diminuant le temps disponible pour que la repopulation des cellules clonogènes tumorales se mette en place¹⁸⁶. Cependant l'hypofractionnement se révèle être une meilleure option thérapeutique pour les tumeurs possédant un ratio α/β bas comme les tumeurs prostatiques, mammaires, certains mélanomes ou liposarcomes¹⁸⁶. L'hypofractionnement possède également un côté pratique pour les radiothérapeutes et les patients via la réduction du nombre de fractions : le patient doit se déplacer moins souvent et les radiothérapeutes peuvent traiter plus de patients sur la même machine.

Quoiqu'il en soit une modification du fractionnement du traitement doit forcément entraîner un ajustement de la dose totale : la dose équivalente (ou iso-efficace) doit être calculée. L'histoire nous apprend que quand cet ajustement n'est pas effectué, les conséquences peuvent être désastreuses avec un excès de toxicité tardive important. C'est ce qu'il s'est passé dans les années 1970 avec l'utilisation de la *Nominal Single Dose* (NSD), tristement célèbre pour avoir engendré d'importantes toxicités tardives suite à son utilisation en clinique²⁰². Cette formule a été développée pour calculer la dose totale équivalente entre différents protocoles de fractionnement. Cette formule, développée par Ellis, est en fait basée sur deux hypothèses fausses selon lesquelles l'étalement du traitement n'a pas d'effet sur la tumeur et que le fractionnement n'induit pas de réponse différentielle entre la tumeur et les tissus sains. Comme le disent Jean-Marc Cosset, Françoise Mornex et François Eschwège, Ellis n'a lu ni Regaud, ni Coutard²⁰². La facilité d'application de cette formule a fait qu'elle fut rapidement adoptée par les radiothérapeutes de l'époque leur permettant ainsi de délaissier le fractionnement conventionnel pour l'hypofractionnement, et donc traiter plus de patients. Pour passer d'un fractionnement à 2 Gy par fraction, 5 fractions par semaine, à un

hypofractionnement à 3 fractions de 3,3 Gy, l'ajustement de la dose totale calculé par la NSD était tellement minime que certains s'en passaient²⁰². Il en résulte une augmentation de l'incidence des complications tardives mais également une augmentation de la gravité des complications observées.

Dans le cas de la radiothérapie stéréotaxique, l'hypofractionnement est extrêmement sévère avec de fortes doses par fraction. Son développement a été encouragé par les bons résultats cliniques pour les lésions cérébrales non cancéreuses. Les améliorations de l'imagerie et de la balistique ainsi que l'émergence de systèmes de contention du patient ont rendu possible son application pour des localisations extracrâniennes. En effet, l'amélioration des techniques permet aujourd'hui de délivrer de fortes doses à la tumeur avec une précision submillimétrique et une exactitude permettant d'épargner au maximum les tissus sains. Cependant, il y a un manque crucial de données radiobiologiques aux fortes doses par fraction. De plus, alors qu'en fractionnement conventionnel, le modèle linéaire quadratique, un modèle mathématique, permet la prédiction des effets et des risques d'une modification du fractionnement, celui-ci est très controversé aux fortes doses par fraction. Son utilisation aux fortes doses par fraction est très débattue et la Société Française de Radiothérapie Oncologique limite son utilisation à des doses par fraction allant de 1 à 6 Gy.

3. Les modèles prédictifs en radiobiologie

La modification des schémas de fractionnement, que ce soit pour l'hypofractionnement ou l'hyperfractionnement, nécessite la prédiction du risque et des effets d'une telle modification ainsi que l'ajustement de la dose totale administrée pour compenser l'augmentation ou la diminution de la dose par fraction. Cette prédiction du risque et des effets et le calcul des doses équivalentes sont possibles grâce à l'utilisation de modélisations mathématiques de l'effet des rayonnements ionisants sur les cellules. D'un point de vue radiobiologique, les modèles prédictifs permettent l'analyse et la comparaison des différentes données acquises *in vitro* et *in vivo* sur la réponse aux rayonnements ionisants.

La réponse à la radiothérapie, que ce soit celle des tissus sains ou celle de la tumeur, est basée sur la capacité des rayonnements ionisants à induire la mort cellulaire via entre autres l'induction de dommages à l'ADN. Le contrôle tumoral dépendra notamment de la survie ou non de cellules tumorales clonogènes : en effet, si l'éradication des cellules

tumorales clonogènes par l'irradiation est complète, le contrôle local est atteint. Les récurrences tumorales sont dues à la persistance de cellules tumorales dites clonogènes après radiothérapie. Les cellules clonogènes sont des cellules capables de former une colonie de cellules, composée de plus de 50 cellules, dans un certain environnement de croissance. Ces cellules sont donc responsables du phénomène de régénération (ou repopulation), que ce soit pour les tissus sains ou le tissu tumoral. En 1956, Puck et Marcus mettent au point une méthode permettant de mesurer le potentiel reproductif, donc la clonogénicité, des cellules de mammifères afin d'étudier les mécanismes d'action des rayonnements ionisants : le test de clonogénicité²⁰⁵. Ils décrivent ainsi les effets de l'irradiation sur l'intégrité reproductrice individuelle des cellules HeLa. Les cellules HeLa sont des cellules cancéreuses humaines immortalisées issues d'un carcinome du col de l'utérus. Les cellules sontensemencées de façon à ce que les cellules soient espacées les unes des autres. Elles sont ensuite irradiées puis incubées pendant différents temps. Les colonies de plus de 50 cellules sont alors comptées et la fraction survivante est déterminée. Ils tracent ainsi les premières courbes de survie après irradiation pour les cellules de mammifères. Les courbes de survie obtenues permettent de déterminer la radiosensibilité des cellules tumorales et des cellules saines. Une courbe de survie représente graphiquement la relation entre la fraction survivante (S) d'une population cellulaire donnée et la dose (D) (**Figure 23**). Si l'échelle est linéaire, la courbe obtenue a la forme d'une sigmoïde : un épaulement est suivi d'une courbe dont l'asymptote s'approche de la survie nulle. Cependant les courbes de survie sont tracées avec une échelle logarithmique, d'une part pour faciliter la comparaison des survies très faibles nécessaires pour atteindre le contrôle tumoral et d'autre part pour mettre en évidence que la mort cellulaire n'est pas aléatoire¹⁸⁶. En effet si la mort cellulaire est aléatoire, la survie cellulaire en fonction de la dose prendra la forme d'une exponentielle, ce qui donnera une droite en échelle logarithmique.

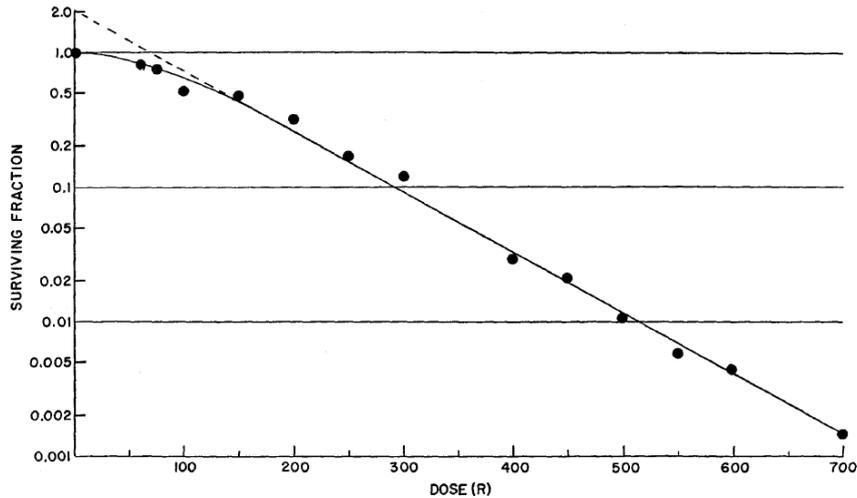


Figure 23 : Survie de la capacité de reproduction des cellules HeLa en fonction de la dose de rayons X. Les points correspondent à l'équation $S = [1 - (1 - e^{-D/96})^2]$ dans les limites d'incertitude de la procédure expérimentale. (source : Puck et Marcus, 1956²⁰⁵)

L'épaulement initial dépendra de la lignée cellulaire. Puck et Marcus décrivent cette courbe et donc la fraction survivante de la manière suivante :

$$S = [1 - (1 - e^{-D/D_0})^n]^m$$

Avec S la fraction survivante, D la dose, D_0 la dose diminuant la survie à 37%, n le nombre représentant le nombre de cibles (1 pour les cellules haploïdes, 2 pour les cellules diploïdes et 3 pour les triploïdes) et m le « nombre d'unités » représentant le nombre des différentes structures génétiques dont l'inactivation entraînera la mort²⁰⁵.

Différents modèles ont été mis au point pour essayer d'expliquer l'aspect de ces courbes de survie et donc la relation entre la survie cellulaire et la dose de rayonnements ionisants. Ces modèles sont basés, pour le modèle des cibles, sur le nombre de cibles inactivées ; sur les interactions entre les dommages cellulaires radio-induits et les capacités de réparation des cellules pour le modèle dommages létaux/potentiellement létaux (LPL)²⁰⁶ ; ou pour le modèle de saturation de réparation, la dose-dépendance du taux de réparation¹⁸⁶.

Cependant, la forme des courbes de survie en échelle logarithmique, avec un épaulement puis une forme d'exponentielle inverse, peut être décrite mathématiquement par un polynôme de second degré, avec une origine constante, de manière à ce que la fraction survivante à 0 Gy soit de 1. C'est le modèle linéaire quadratique (MLQ), proposé en 1972 par

Kellerer et Rossi²⁰⁷. Un an plus tard, Chadwick et Leenhouts publient une théorie pour expliquer l'effet des rayonnements ionisants sur la survie cellulaire²⁰⁸ :

- Les rayonnements ionisants cassent les liaisons moléculaires
- Ces lésions peut être réparées
- La molécule cible est l'ADN
- La mort cellulaire est induite par les cassures double brin
- Un certain nombre de cassures double brin induisent la mort cellulaire

La survie cellulaire est alors décrite par la formule :

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

Où S est la survie, D est la dose totale, α représente les cassures double brin non réparables et β les cassures simple brin réparables (à cette date, seul le mécanisme de réparation des cassures simple brin est connu). En fait, α représente la composante linéaire du MLQ, correspondant aux dommages directement létaux et β représente la composante quadratique et correspond à l'accumulation des dommages sublétaux (**Figure 24**). Le MLQ, par sa simplicité, sa description (la moins fausse) des courbes de survie cellulaire et les mécanismes radiobiologiques sous-jacents, s'impose comme modèle prédictif que ce soit en radiobiologie ou en clinique. Quand l'irradiation est fractionnée, la formule est légèrement modifiée, avec n le nombre de fractions et d la dose par fraction. C'est cette formule qui est utilisée en clinique :

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

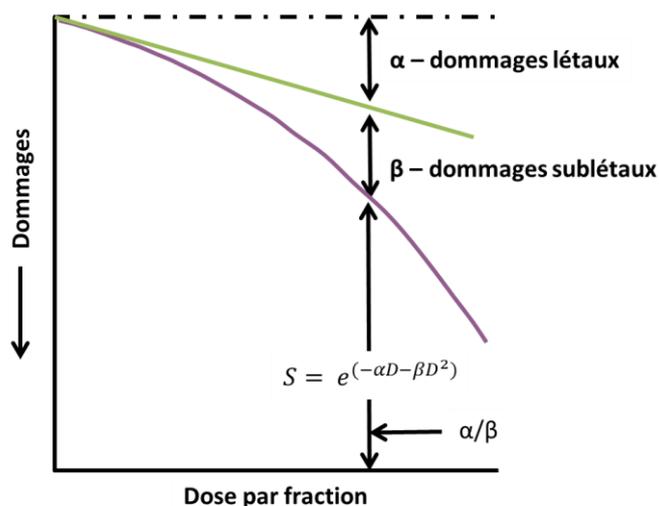


Figure 24 : Le Modèle linéaire-Quadratique, un modèle de prédiction des effets et des risques d'une modification du fractionnement de la dose

Différents paramètres radiobiologiques découlent du modèle linéaire quadratique dont le ratio α/β , la *Biological Effective Dose* (BED) et la Dose Equivalente à 2 Gy (EQD2), largement utilisés en clinique. Le ratio α/β correspond à la dose à laquelle la contribution linéaire aux dommages, soit α , est égale à la contribution quadratique. La composante α est exprimée en Gy^{-1} et la composante β en Gy^{-2} , le ratio α/β s'exprime donc en Gy. Le ratio α/β reflète la sensibilité au fractionnement de la dose^{186,202}, ce qui est essentiel en clinique. Ainsi, un ratio α/β élevé, pouvant aller de 7 à 20 Gy^{186} , indique une sensibilité à la dose par fraction faible. C'est le cas des tissus exprimant les dommages radio-induits rapidement et de la plupart des tumeurs. Au contraire, un ratio α/β bas, généralement de 0,5 Gy à 6 Gy^{186} , indique une sensibilité à la dose par fraction importante. C'est le cas des tissus à réponse tardive. La BED, quant à elle, est une dose conceptuelle permettant la comparaison de l'effet biologique de différents protocoles de fractionnement. C'est la combinaison d'une dose par fraction et d'une dose totale administrée à un tissu caractérisé par un ratio α/β particulier. C'est la dose totale délivrée en un nombre infini de fraction de taille infinitésimale pour obtenir le même effet biologique que le schéma de fractionnement de référence. D'après le MLQ, la mort cellulaire E peut s'écrire :

$$\ln(S) = E = n(\alpha d + \beta d^2)$$

Si d (la dose par fraction) tend vers 0 (fraction de taille infinitésimale), le paramètre β devient négligeable et $E = nad = \alpha D$

Donc
$$BED = D = \frac{E}{\alpha} = \frac{n(\alpha d + \beta d^2)}{\alpha} = nd \left(1 + \frac{d}{\alpha/\beta} \right)$$

En clinique, pour simplifier les calculs, la BED est convertie en dose équivalente à 2 Gy puisque que le protocole de référence en radiothérapie conventionnelle est une dose par fraction de 2 Gy. Cette dose équivalente à 2 Gy permet la comparaison de schémas de fractionnement iso-efficaces.

$$BED = D \left(1 + \frac{2}{\alpha/\beta} \right) \quad \text{donc} \quad D = \frac{BED}{\left(1 + \frac{2}{\alpha/\beta} \right)}$$

Ces deux formules dépendent du ratio α/β et montrent à quel point le choix de ce ratio est important. En effet le ratio α/β doit correspondre spécifiquement au tissu considéré.

Pour résumer, le MLQ est une modélisation satisfaisante de la relation entre la dose totale iso-efficace et une dose par fraction d'intérêt. Le ratio α/β décrit la réponse tissulaire au fractionnement, avec un ratio bas pour les tissus à réponse tardive et un ratio élevé pour les tissus à réponse rapide ainsi que la plupart des tumeurs. La dose équivalente à 2 Gy est un outil simple et efficace pour la comparaison d'un protocole à un protocole de référence en fractions de 2 Gy. Par contre elle nécessite une estimation précise et correcte du ratio α/β . Cependant le MLQ n'est pas une modélisation parfaite et possède des limites. Le MLQ ne serait valable que pour des doses de 1 à 8/10 Gy par fraction. En effet, aux faibles doses par fraction, c'est-à-dire pour une fraction de moins de 1 Gy, une hyper-radiosensibilité a été mise en évidence par Joiner et al²⁰⁹. Cette radiosensibilité accrue est suivie d'une phase de radorésistance relative. Ils suggèrent une implication des mécanismes de réparation à ces très faibles doses avec peu ou pas de réparation suivi d'une activation des mécanismes de réparation. Ainsi, le MLQ sous-estime très largement l'effet biologique induit par les doses de moins de 1 Gy. En ce qui concerne les doses par fraction supérieures à 8 Gy, ce qui est le cas des doses dites ablatives utilisées en radiothérapie stéréotaxique, la validité du MLQ est fortement remise en cause et porte à controverse. En effet, aux fortes doses par fraction, le MLQ s'éloigne des données *in vivo* et *in vitro* : la courbe de survie calculée par le MLQ est incurvée vers le bas (quasiment jusqu'à la verticale) aux fortes doses or les courbes de survie cellulaire sont plutôt linéaires aux fortes doses par fraction (en échelle logarithmique). La

validité du MLQ aux fortes doses par fraction est remise en cause, entre autres, par Kirkpatrick et al^{210,211} et Wang et al²¹². Pour Kirkpatrick et al, le MLQ est inapproprié aux fortes doses par fraction car il surestime la mort cellulaire directe et que les données proviennent de données acquises *in vitro*. Ils reprochent donc à ces données de ne pas prendre en compte la réaction des tissus de soutien ainsi que des dommages vasculaires induits par les fortes doses responsables d'une mort cellulaire indirecte, au-dessus de 10 Gy, ni la réaction des cellules clonogènes tumorales. Aux fortes doses par fraction, les dommages à l'ADN ne sont plus les seuls responsables de la mort cellulaire. De plus, ils soulignent que les données cliniques ne correspondent pas aux données calculées par le MLQ: les doses ablatives sont plus efficaces que les doses équivalentes calculées par le MLQ, qui sous-estime donc l'efficacité des protocoles car il ne tient pas compte de la mort cellulaire indirecte²¹⁰. Wang et al, quant à eux, reprochent au MLQ de ne pas prendre en compte la conversion des dommages sublétaux accumulés en dommages létaux ce qui entraîne une surestimation des dommages sublétaux et donc une surestimation de la mort cellulaire directe aux fortes doses par fraction²¹². Le MLQ a aussi ses défenseurs : Brenner^{211,213}, Brown et al¹⁹⁹ et Chapman et Gillespie²¹⁴. Brenner souligne le fait que le MLQ est une approximation de modèles exacts mais bien plus complexes²¹¹. Il met également en lumière que la courbe de survie des cellules CHO, déterminée par cytométrie en flux par Bartkowiak et al²¹⁵, correspond exactement à la courbe du MLQ. Cela indiquerait donc la validité du MLQ pour la prédiction de la survie au-delà de 7 Gy. D'autres études²¹⁶ ont également mis en évidence que la correspondance du MLQ aux fortes doses par fraction est bonne jusqu'à 15 Gy. En ce qui concerne les données *in vivo*, Brenner cite plusieurs études dont les prévisions du MLQ concordent avec les données *in vivo*, notamment chez la souris et ce jusqu'à 20-24 Gy²¹³. Il finit par conclure que finalement le MLQ est un modèle mécanistique basé sur un rationnel biologique, pratique, bien documenté, valide jusqu'à 10 Gy par fraction et raisonnablement utilisable jusqu'à 18 Gy par fraction²¹³. En accord avec Brenner, Brown et al, mettent également en avant les travaux de Fowler²¹⁷. Fowler remet en question le besoin de linéariser le MLQ aux fortes doses par fraction pour que celui-ci corresponde aux courbes de survie. En effet, en augmentant simplement le ratio α/β , il obtient une meilleure correspondance du MLQ. Brown met également en avant la simplicité du MLQ avec ces 2 variables, α et β alors que les différents modèles modifiés pour les fortes doses par fraction en ont 5¹⁹⁹. Il s'interroge notamment sur l'apport de ces variables supplémentaires dans la modélisation et sur la pertinence clinique de ces modèles alternatifs : est-ce que ces modèles apportent réellement une meilleure estimation des paramètres cliniquement pertinents par rapport au MLQ¹⁹⁹ ? Il finit par conclure que le

MLQ est raisonnablement prédictif pour des doses de 1,8 Gy à 20 Gy et qu'il n'est pour l'instant pas possible de savoir si les différents modèles alternatifs au MLQ sont plus performants que ce dernier. Il souligne également le manque de données cliniques permettant d'estimer si le MLQ doit vraiment être adapté ou non¹⁹⁹. Song et al font remarquer que la mort cellulaire indirecte induite par les fortes doses, conséquence notamment de l'apoptose des cellules endothéliales, n'est prise en compte ni par le MLQ ni par les modèles alternatifs²¹⁸. Ils conseillent donc d'appliquer le MLQ ou les modèles alternatifs de manière prudente.

En 2004, Guerrero et Li mettent au point un MLQ modifié dans le but de mieux modéliser la réponse cellulaire à l'irradiation²¹⁹. Ils introduisent un nouveau paramètre basé sur la survie cellulaire *in vitro* et la survie animale *in vivo*, δ . Ils rapportent une meilleure estimation par leur MLQ modifié des données d'iso-effet *in vivo* et *in vitro* par rapport au MLQ. En 2008, Park et al propose une méthode alternative pour prédire les effets et les risques de la radiothérapie stéréotaxique. Ils ont construit un modèle hybride associant le MLQ, pour la gamme de dose correspondant à l'épaule des courbes de survie et le modèle multi-cible pour les doses ablatives au-delà de l'épaule²²⁰. En effet le modèle multi-cible, qui est un modèle explicatif et non mécanistique, s'approche de l'asymptote aux fortes doses par fraction. Ce modèle correspond mieux aux données expérimentales aux fortes doses par fraction. Ce modèle hybride s'appelle l'*Universal Survival Curve* (USC) et permet de garder les avantages du MLQ (simplicité et rationnel mécanistique) et d'obtenir un ajustement des données aux fortes doses par fraction via le modèle multi-cible. Ils déterminent une dose de transition D_T à laquelle la transition entre le MLQ et le modèle multi-cible se fait en toute fluidité. Ils introduisent le concept de dose équivalente à une seule fraction (SFED) comme étant la dose délivrée en une fraction qui aurait le même effet biologique que le schéma de fractionnement de référence. La BED reste valable dans leur modèle. Ces deux doses sont applicables à tous les schémas de fractionnement, que ce soit pour la radiothérapie conventionnelle ou stéréotaxique. Ils obtiennent une meilleure description des courbes de survie pour la lignée de cellules H460 issues de CBNPC avec leur modèle USC pour toute la gamme de dose²²⁰ ainsi que pour des données cliniques et *in vitro* de la littérature. Ils concluent que le modèle USC peut être utilisé pour comparer les protocoles de fractionnement en radiothérapie conventionnelle et en radiothérapie stéréotaxique via la BED et la SFED. Il permet d'obtenir une meilleure description des courbes de survie cellulaire aux fortes doses. Toujours en 2008, Astrahan propose de son côté

le modèle linéaire-quadratique-linéaire (MLQL) pour faire coïncider au mieux les courbes de survie cellulaire et le modèle mathématique²²¹. Cette idée avait déjà été émise par Jean Dutreix en 1990²²² mais était passée inaperçue²⁰². Il détermine une dose de transition D_T à laquelle le MLQ redevient linéaire (aux fortes doses) et γ , le logarithme exponentiel de la mort cellulaire par Gy dans la partie linéaire terminale de la courbe de survie²²¹. Wang et al proposent à leur tour une modification du MLQ pour l'adapter aux fortes doses par fraction en 2010 : le MLQ généralisé (MLQg)²¹². Ce modèle se base sur le fait que le MLQ ne prend pas totalement en compte la conversion des dommages sublétaux accumulés en dommages létaux. C'est-à-dire que cette conversion est prise en compte par une augmentation des dommages létaux (donc du paramètre α) sans diminuer en conséquence les dommages sublétaux (donc le paramètre β) : il y a donc une surestimation de la mort cellulaire aux fortes doses par fraction. Ils décomposent donc le paramètre β en deux paramètres β_1 et β_2 : β_1 représentant les dommages sublétaux et β_2 représentant la conversion des dommages sublétaux accumulés en dommages létaux afin d'avoir une meilleure interprétation des données.

$$\beta = \frac{\beta_1 \beta_2}{2}$$

Ils reconnaissent cependant les limites de leur modèle qui ne prend pas en compte les phénomènes de redistribution dans le cycle cellulaire, de réoxygénation et de réponse immunitaire anti-tumorale.

Quoiqu'il en soit, aucun de ces modèles prédictifs n'est capable de décrire avec exactitude la réponse aux fortes doses par fraction car cette réponse est extrêmement complexe et certains pans restent à élucider. En effet, ces modèles ne prennent pas en compte les nouveaux processus biologiques de la réponse tumorale qui ont été mis en lumière récemment comme la mort cellulaire tumorale indirecte induite par les dommages vasculaires ou l'immunité anti-tumorale qui se met en place après irradiation à forte dose. De plus, nous avons vu précédemment que les phénomènes de réoxygénation, de repopulation et de redistribution dans le cycle cellulaire ne sont pas identiques à fortes ou faibles doses. Pourtant l'ensemble de ces phénomènes devrait impacter fortement la réponse tumorale et des tissus sains à l'irradiation. Cependant, ces modèles de prédiction de la réponse à l'irradiation, en association avec les données cliniques, permettent, ou en tout cas facilitent, la mise au point de protocoles optimaux pour la radiothérapie stéréotaxique.

4. Réponse à l'hypofractionnement sévère

Dans cette section j'ai choisi d'aborder ces phénomènes radiobiologiques mis en lumière récemment que sont la réponse vasculaire et immunitaire aux fortes doses par fraction. En effet, l'efficacité de la radiothérapie stéréotaxique observée en clinique est expliquée par cette « nouvelle radiobiologie » qu'est la réponse tumorale aux fortes doses par fraction dont les mécanismes diffèrent de ceux connus en radiothérapie conventionnelle¹⁹⁹. Les mécanismes de mort cellulaire indirecte causée par les dommages vasculaires et la mise en place d'une immunité anti-tumorale brisent le dogme de la molécule d'ADN comme seule cible des rayonnements ionisants. La mort cellulaire tumorale après irradiation à forte dose ne dépend plus uniquement des dommages à l'ADN mais également de cette mort cellulaire tumorale indirecte. Les dommages vasculaires radio-induits par les fortes doses par fraction concernent également les tissus sains²²³. De plus notre modèle préclinique d'irradiation stéréotaxique mis au point au laboratoire pourrait éventuellement permettre l'étude de ces mécanismes, tout en se rapprochant au maximum des traitements administrés en clinique. Ceci a conforté mon choix de décrire ces nouveaux phénomènes radiobiologiques observés aux fortes doses par fraction, même s'ils concernent la réponse tumorale plus que la réponse des tissus sains étudiée lors de cette thèse.

La radiothérapie conventionnelle a tendance à améliorer, légèrement, la morphologie et la fonctionnalité de la vascularisation tumorale pendant les premières semaines de traitement^{193,224-226}. Les vaisseaux tumoraux sont détruits en même temps que la tumeur régresse. A l'inverse, les fortes doses par fraction utilisées en radiothérapie stéréotaxique entraînent des dommages vasculaires au sein de la tumeur induisant une mort indirecte des cellules tumorales²²⁷. Cette mort indirecte résulte de la dégradation du microenvironnement tumoral suite aux dommages vasculaires : occlusion des vaisseaux²²⁸, thrombose²²⁸, diminution de la perfusion²²⁹, vasodilatation et rupture des vaisseaux²³⁰. Song et son équipe ont beaucoup travaillé à la description de ces changements vasculaires tumoraux après irradiation, dans les années 1970²³¹⁻²³⁴ : diminution ou augmentation du volume vasculaire selon le type de tumeur étudié, diminution du volume vasculaire fonctionnel, changements de perméabilité, augmentation ou diminution du débit sanguin après irradiation. En 2015, Song et al mettent une fois de plus en avant l'importance du microenvironnement tumoral dans la réponse à l'hypofractionnement sévère appliqué en radiothérapie stéréotaxique²²⁷. Ils irradient

des fibrosarcomes implantés en sous-cutané chez la souris C3H avec des doses de 15 à 30 Gy puis mettent les cellules en culture afin d'obtenir des courbes de survie. Ils observent la mort des cellules tumorales augmenter progressivement en 2 à 5 jours après l'irradiation. Ils attribuent cette mort cellulaire tumorale indirecte à la dégradation du microenvironnement tumoral via la diminution de la perfusion sanguine et donc l'augmentation de l'hypoxie²²⁷. Ils soulignent que l'efficacité clinique des fortes doses par fraction est probablement due à cette mort cellulaire indirecte. Ono et al ont réalisé une irradiation spécifique des cellules endothéliales composant les vaisseaux tumoraux avec une dose de 30 Gy via la réaction $^{10}\text{B}(\alpha)^7\text{Li}$ (transformation du ^{10}B en ^7Li). Cette irradiation spécifique a complètement arrêté la croissance tumorale sans irradier les cellules tumorales²³⁵. Ils montrent ainsi que la dégradation de la vascularisation tumorale seule permet la régression tumorale. Par contre, Kioi et al ont pu observer une régénération des vaisseaux après irradiation via la vasculogénèse impliquant les cellules dérivées de la moelle osseuse²²⁹. Cela pourrait impliquer l'existence d'un protocole optimal d'hypofractionnement sévère pour pouvoir engendrer la mort des cellules tumorales de manière indirecte via les effets vasculaires. Kjellsson et al souligne également que la fragilité de la microvascularisation tumorale fait que les vaisseaux peuvent se collapser spontanément. Cela entraîne une privation de nutriments pouvant conduire à la mort indirecte des cellules tumorales ainsi qu'une hypoxie aiguë sévère qui pourrait induire une radiorésistance plus importante que celle induite par l'hypoxie chronique. Cette hypoxie aiguë pourrait être un obstacle au contrôle local de la tumeur²³⁶.

Il faut garder à l'esprit que la microvascularisation tumorale est constituée de cellules endothéliales peu connectées entre elles avec une membrane basale incomplète et avec des péricytes peu présents. L'espace entre les cellules endothéliales tumorales est souvent occupé par des cellules tumorales²³⁷. Les vaisseaux capillaires tumoraux sont donc désorganisés, fragiles et vulnérables au stress. De plus, les cellules endothéliales tumorales sont plus radiosensibles que les cellules endothéliales saines²³⁸. Garcia-Barros et ses collègues ont pu mettre en évidence l'une des causes de ces dommages vasculaires induits par les fortes doses de rayonnements : l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales tumorales à partir de 8/10 Gy en dose unique via l'activation de la sphingomyélinase acide (aSMase) et la production de céramide, un lipide pro-apoptotique²³⁹. La production de céramide dans les cellules endothéliales tumorales après irradiation induit une apoptose rapide qui entraîne la régression tumorale. Ils mettent en évidence que la régression tumorale est principalement portée par l'apoptose des cellules endothéliales aux fortes doses. Grâce à la transplantation

des cellules tumorales dans des souris invalidées pour la sphingomyélinase (l'apoptose via les céramides est inhibée), ils montrent que la régression tumorale est inhibée quand l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales tumorales est inhibée²³⁹ (**Figure 25**).

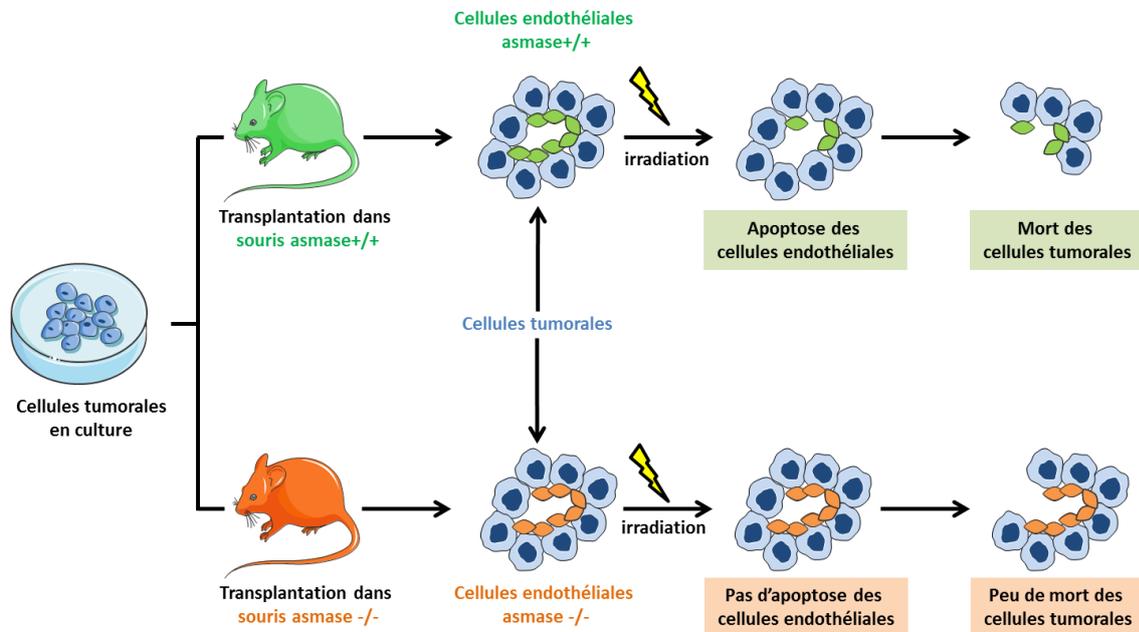


Figure 25 : Implication de l'endothélium dans la régression tumorale après irradiation

(source : Supiot et Paris, 2012²⁴⁰)

Ce mécanisme apoptotique quasi-spécifique des cellules endothéliales est à l'origine de leur radiosensibilité. En effet, les cellules endothéliales auraient une quantité d'aSMase beaucoup plus importante à l'état basal que d'autres types cellulaires, jusqu'à 20 fois supérieur²⁴¹. L'apoptose radio-induite des cellules endothéliales aux fortes doses concerne également le compartiment endothélial des tissus sains. En effet, les travaux de Paris et al²⁴² ont montré que l'apoptose des cellules endothéliales par la voie de l'aSMase et des céramides est l'évènement initiateur du syndrome gastro-intestinal chez la souris. L'apoptose des cellules endothéliales a lieu avant l'apoptose des cellules souches épithéliales après irradiation corps entier à 15 Gy²⁴². Que ce soit dans la lésion radio-induite au tissu sain ou dans la mort cellulaire tumorale indirecte l'apoptose des cellules endothéliales est un mécanisme initiateur qui reste à étudier. Cette apoptose des cellules endothéliales est responsable de

l'augmentation de la perméabilité des capillaires et des dommages radio-induits à la microvascularisation tumorale.

Les fortes doses par fraction ont un effet local, sur les cellules tumorales mais également un effet systémique, rare mais observé en clinique et en préclinique, sur des lésions se situant à distance de la lésion irradiée. Cet effet systémique est appelé effet abscopal, du latin *ab-*, « loin de » et du grec ancien *skopos*, « la cible » : littéralement effet éloigné de la cible. En clinique, cet effet abscopal a été observé chez un total de 46 patients de 1969 à 2014, reviewés par Abuodeh et al en 2016²⁴³. Cet effet abscopal de l'irradiation a été observé pour des carcinomes hépatocellulaires, des adénocarcinomes (pulmonaires²⁴⁴, œsophagiens et d'origine inconnue), un cancer de la thyroïde, un carcinome des cellules de Merkel, un cancer utérin, des lymphomes, des leucémies, des carcinomes des cellules rénales et des mélanomes²⁴⁵⁻²⁴⁷. L'effet abscopal ne serait pas déclenché par l'irradiation aux fortes doses seule, mais en association avec une immunothérapie : cette synergie permettrait de déclencher une réponse immunitaire innée et adaptative suffisamment forte pour éliminer les cellules tumorales dans le champ d'irradiation et dans l'ensemble de l'organisme²⁴⁸⁻²⁵¹ (**Figure 26**).

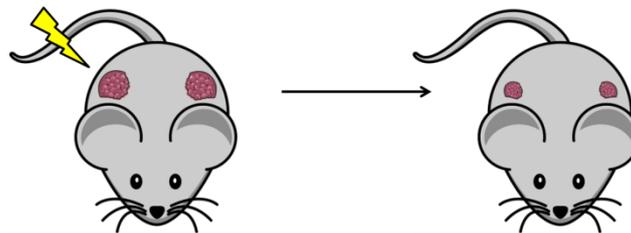


Figure 26 : Illustration de l'effet abscopal chez la souris. Les fortes doses, le plus souvent en association avec une immunothérapie, induisent une réaction immunitaire anti-tumorale sur la lésion irradiée mais également sur les métastases ou autres lésions tumorales non irradiées

Le microenvironnement tumoral est donc composé entre autres du stroma avec la vascularisation tumorale mais également des cellules immunitaires²⁵²⁻²⁵⁴, de cytokines et de chimiokines. Ce microenvironnement tumoral est connu pour être immunosuppresseur à des doses utilisées en radiothérapie conventionnelle, c'est-à-dire inhibant la mise en place d'une immunité anti-tumorale, en induisant notamment la mort des lymphocytes²⁵⁵. En effet, des fractions rapprochées induisent des dommages radio-induits aux cellules immunitaires, notamment les lymphocytes, ce qui compromet leur efficacité. Ces cellules ne migrent donc pas au niveau des lésions tumorales, il n'y a pas d'immunité anti-tumorale systémique²⁴⁹.

L'irradiation à forte dose par fraction déclenche une réponse immunitaire anti-tumorale qui a une action dans le champ d'irradiation mais également à distance du volume d'irradiation^{245,249,250,256} en entraînant la régression de métastases non irradiées par exemple. Ce sont les cellules immunitaires ainsi que les cytokines et chimiokines qui participent à l'effet abscopal. Les mécanismes de cette immunité anti-tumorale mise en place aux fortes doses restent à élucider, cependant certains mécanismes émergent. L'un d'entre eux serait que l'hypofractionnement sévère agit comme un vaccin tumoral *in situ* : les fortes doses induisent une mort cellulaire tumorale massive qui entraîne le relargage et la circulation dans le microenvironnement tumoral d'antigènes tumeur-spécifiques^{249,257}, cytokines, chimiokines et autres facteurs solubles. Ces molécules forment le *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMP). Le DAMP recrute les cellules dendritiques au niveau du microenvironnement tumoral ainsi que d'autres cellules présentatrices d'antigènes. L'irradiation active les cellules dendritiques qui sont maturées et qui acquièrent leur phénotype de cellules présentatrices d'antigènes^{249,258,259}. Les cellules dendritiques migrent alors vers les ganglions lymphatiques drainant la tumeur et amorcent les lymphocytes T CD₈⁺ (lymphocytes cytotoxiques ayant une activité lytique) qui réagissent aux antigènes tumoraux^{249,250}. Une fois activés, ces lymphocytes T CD₈⁺ migrent vers les sites tumoraux et s'y infiltrent pour exercer leur activité cytotoxique anti-tumorale (**Figure 27**). Les travaux de Lee et al et Demaria et al ont montré que la déplétion en lymphocytes T CD₈⁺ (par implantation de tumeurs chez des souris *nude* ou par l'utilisation d'anticorps) supprime l'effet abscopal chez la souris, que celui-ci soit induit par l'irradiation seule ou en combinaison avec un agent d'immunothérapie inhibant les checkpoints immunitaires et de l'irradiation^{250,260}. Les lymphocytes T CD₈⁺ sont donc essentiels à la mise en place de la réponse immunitaire anti-tumorale. Ces lymphocytes T CD₈⁺ anti-tumoraux produisent de l'*interferon* γ (IFN- γ)²⁶¹ qui joue un rôle important pour leur circulation et la reconnaissance des cellules tumorales²⁶².

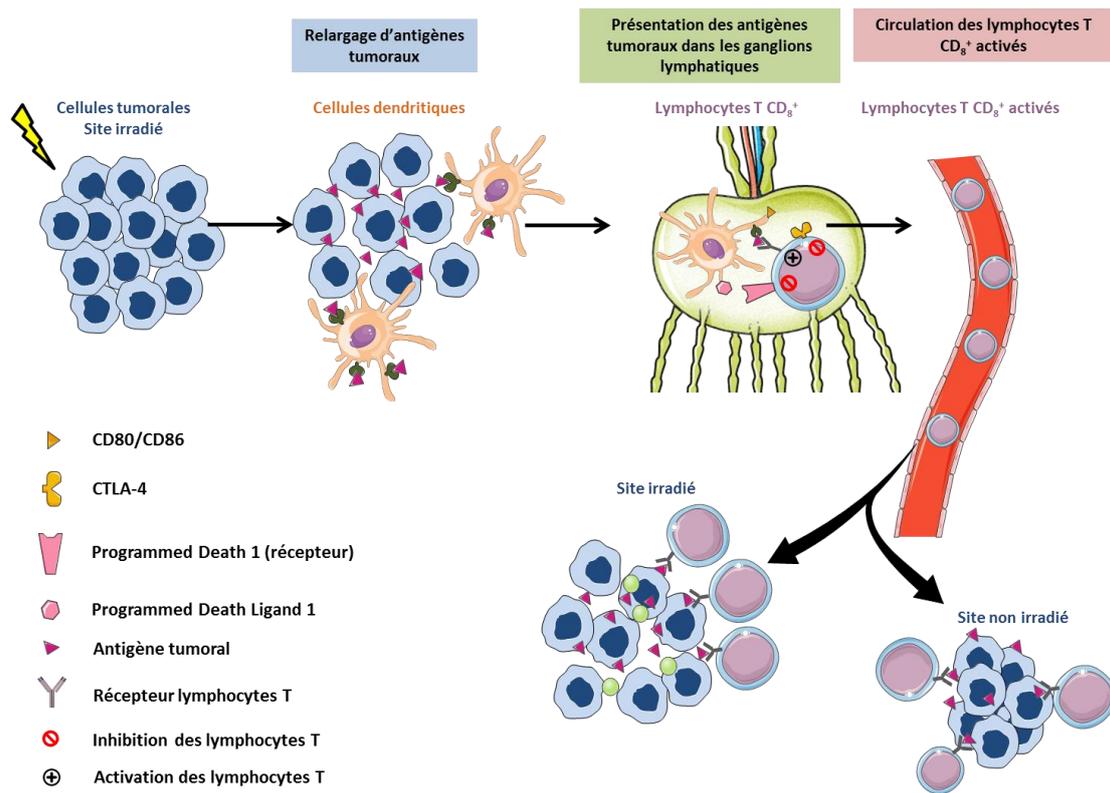


Figure 27 : Mise en place de l'immunité anti-tumorale aux fortes doses par fraction.

Twynman et al ont lancé un essai clinique de phase I avec 22 patients atteints de mélanome métastatique. Ils ont traité les patients avec une radiothérapie stéréotaxique sur l'une des lésions tumorales en association avec une immunothérapie consistant en l'administration d'un anticorps anti-CTLA4, connu sous le nom d'ipilimumab. L'ipilimumab est un anticorps qui interagit avec l'antigène 4 des lymphocytes cytotoxiques (CTLA4). Le récepteur CTLA4 inhibe l'activation des lymphocytes T cytotoxiques. L'ipilimumab permet donc la potentialisation de la réponse immunitaire en activant les lymphocytes T, permettant leur circulation et leur infiltration dans la tumeur. Ce traitement a déjà montré son efficacité en clinique et en préclinique^{244–246,260}. Ils remarquent cependant la résistance de certains patients à ce traitement. Ils ont donc reproduit cette observation clinique dans un modèle murin en utilisant des cellules tumorales B16-F10 de mélanome²⁶³. Ils ont pu mettre en évidence que la résistance des souris au traitement était liée à une augmentation de l'expression du gène du ligand *Programmed Death Ligand 1* (PD-L1) par les cellules tumorales. La liaison du ligand sur son récepteur *Programmed Death 1* (PD-1) entraîne l'inactivation des lymphocytes T. Cette surexpression de PD-L1 est associée à un épuisement

des lymphocytes T. Ils ont retrouvé cette surexpression de PD-L1 chez les patients résistants au traitement. L'inhibition de PD-L1 via un anticorps, associé à la radiothérapie stéréotaxique et au traitement par ipilimumab permet d'obtenir une réponse immunitaire via différents mécanismes (**Figure 27**). Ces travaux illustrent bien la complexité de la réponse immunitaire anti-tumorale qui peut se mettre en place après irradiation à forte dose.

Un autre mécanisme impliqué dans la réponse immunitaire anti-tumorale est la régulation des fragments d'ADN présents dans le cytoplasme suite aux cassures double brin radio-induites²⁶⁴. En effet suite aux dommages radio-induits à l'ADN, des fragments peuvent se retrouver dans le cytoplasme des cellules tumorales. En activant la voie de signalisation de l'*interferon* (IFN), ceux-ci sont détectés par les récepteurs *Toll-like*, récepteurs de signaux de danger portés par les cellules immunitaires, et déclenchent la sécrétion d'*interferon* β (IFN- β). L'expression de l'exonucléase Trex1 est induite par l'irradiation à partir de 12 à 18 Gy selon les lignées cellulaires cancéreuses. Cette exonucléase va débarrasser le cytoplasme des cellules cancéreuses des fragments d'ADN et donc empêcher l'activation des lymphocytes T CD₈⁺ tumeur-spécifiques dans les ganglions lymphatiques. L'immunogénicité de la tumeur est ainsi fortement diminuée. L'effet abscopal ne peut pas se mettre en place et la tumeur progresse. Au contraire, si la dose de rayonnements reçue est en dessous de ce seuil de 12 à 18 Gy, Trex1 n'est pas induit. Les fragments d'ADN s'accumulent dans le cytoplasme des cellules tumorales et entraînent le recrutement, via les récepteurs *Toll-like*, des cellules dendritiques. Ces cellules amorcent ensuite les lymphocytes T CD₈⁺²⁶⁴. Cela est illustré par les différents protocoles testés dans cette étude : l'effet abscopal a été induit par le protocole administrant 3 fractions de 8 Gy, alors que les doses uniques de 20 et 30 Gy n'ont pas réussi à déclencher d'effet abscopal, les trois protocoles étant associés à l'administration d'ipilimumab. Ces travaux suggèrent l'existence d'un protocole d'irradiation optimal afin de déclencher les mécanismes nécessaires à la mise en place de la réponse anti-tumorale. Les doses seuil d'induction de l'expression de Trex1 pourraient guider le choix de la dose et du fractionnement de ce potentiel protocole optimal, associé à l'immunothérapie. Ces travaux confirment ceux de Dewan et al qui se sont demandé quel type de protocole de radiothérapie était optimal pour potentialiser l'inhibition de CTLA4²⁶¹. Ils ont pu mettre en évidence que le protocole administrant 24 Gy en 3 fractions (3x8 Gy) était le protocole le plus efficace, suggérant donc bien l'existence d'un protocole optimal de radiothérapie stéréotaxique à associer avec l'immunothérapie pour la potentialisation de la réponse immunitaire anti-tumorale et donc le déclenchement d'un effet abscopal.

Problématique & objectifs

En clinique, la radiothérapie stéréotaxique pulmonaire est une excellente alternative thérapeutique pour les patients inopérables atteints d'un CBNPC de stade précoce. Son efficacité clinique est incontestable. Elle est d'ailleurs en train de se faire une place de choix dans l'arsenal thérapeutique contre le cancer bronchopulmonaire non à petites cellules, mais pas uniquement. Il ne faut cependant pas oublier que l'irradiation stéréotaxique est un cas d'hypofractionnement extrêmement sévère et que le poumon est un tissu sain à réponse tardive. Or, l'histoire nous a déjà montré que l'hypofractionnement peut avoir des effets catastrophiques sur ce type de tissu. Les mécanismes radiobiologiques et physiopathologiques impliqués dans le développement des lésions pulmonaires radio-induites ont été mis en lumière par de nombreuses équipes à travers le monde grâce à l'utilisation de modèle précliniques d'irradiation en thorax entier ou en hémithorax. Mais le manque de données radiobiologiques aux fortes doses par fraction sur de petits volumes reste problématique. De plus, peu de données précliniques concernant l'irradiation en conditions stéréotaxiques sont disponibles.

Le laboratoire a donc mis en place un modèle préclinique unique au monde d'irradiation stéréotaxique, guidée par l'image, en arc-thérapie, chez la souris. Le SARRP, un irradiateur du petit animal, nous permet de réduire le volume de tissu sain irradié, de manière à se rapprocher le plus possible des pratiques cliniques. Ce modèle préclinique nous permet de suivre le développement des lésions pulmonaires radio-induites jusqu'à 12 mois post-irradiation, ce qui est totalement nouveau.

L'objectif de ces travaux de thèse est l'étude de la réaction du tissu sain pulmonaire aux fortes doses par fraction. Cela passe par, *in vivo*, l'acquisition de données originales en radiopathologie pulmonaire en prenant en compte l'impact du volume d'irradiation, de la dose totale, du fractionnement de la dose et du temps d'étude grâce à notre modèle préclinique. *In vitro*, l'objectif est de déterminer l'impact de la dose par fraction sur différents types cellulaires pulmonaires.

Résultats

Preclinical model of arc therapy stereotactic ablative lung irradiation in the mouse: volume and dose effects. Soumis à *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*

**Preclinical model of arc therapy stereotactic ablative lung irradiation in the mouse:
volume and dose effects.**

Annaïg Bertho¹, Morgane Dos Santos², Valérie Buard¹, Vincent Paget¹, Olivier Guipaud¹, Georges Tarlet¹, Fabien Milliat¹ and Agnès François¹.

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, France.

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, France.

This work was supported by the ROSIRIS program, IRSN funding.

Corresponding author: Agnès François, IRSN, PSE-SANTE/SERAMED/LRMed, 31 Avenue de la Division Leclerc, 92260 Fontenay-aux-Roses, France. agnes.francois@irsn.fr; Tel: 01 58 35 80 45; fax: 01 58 35 84 67

Abstract

Objectives: Stereotactic body radiation therapy is a therapeutic option offered to high surgical risk cancer patients with early stage non-small cell lung cancer. Focal lung irradiation in mice is a new preclinical model to help understand the development of lung damage in the context of these new radiation exposure modalities. Here we developed a mouse model of lung stereotactic arc therapy and monitored the development of lung tissue damage while varying the volume and dose delivered.

Material and methods: C57BL/6J mice were exposed to 90 Gy focal irradiation centered on the left lung, using 1 mm diameter, 3 x 3 mm², 7 x 7 mm² or 10 x 10 mm² beam collimation for volume effect, and using 3 x 3 mm² beam collimation delivering 20 to 120 Gy for dose effect. Lung damage was monitored until 12 months post-exposure, with micro-CT imaging together with anatomopathological and gene expression measurements in the injured patch and the ipsilateral and right lungs.

Results: Focal lung irradiation generates patchy acute tissue inflammation and long-term scarring and consolidation. Radiation exposure to 90 Gy using 7 x 7 or 10 x 10 mm² beam collimation generates severe bronchiolitis obliterans incompatible with long-term survival of the mice. Both 1 mm diameter and 3 x 3 mm² beam collimation allow long-term studies but only 3 mm beam collimation generates radiation-induced lung fibrosis after 90 Gy exposure. Dose effect studies revealed a dose of 60 Gy as the minimum to obtain radiation-induced lung fibrosis.

Conclusion: Arc therapy offers skin sparing allowing long-term studies and dose escalation. Preclinical lung stereotactic irradiation in mice necessitates 3 x 3 mm² beam collimation to a minimal single dose of 60 Gy to obtain radiation-induced lung fibrosis. This model shows radiation effects on the ipsilateral and right lungs and offers good prospects for future mechanistic studies.

1. Introduction

Lung cancer remains the most frequently diagnosed cancer type in the world and is still associated with a high mortality rate (1). Non-small cell lung cancer (NSCLC) represents 85% of lung tumors. Among these, up to 25% are early stage lung cancers. While surgery remains the cornerstone treatment for early stage localized NSCLC (2), other therapeutic options should be offered to high surgical risk patients or to those who refuse surgery, which is the case especially in the elderly. Today, therapeutic management of such tumors remains a challenge, even if considerable progress has been made in treatment options, especially concerning radiation therapy delivery. Protracted conventionally fractionated radiation therapy delivering small fraction sizes of 1.8 to 2 Gy is associated with poor tumor control. This explains why, since 1991 and the report of Blomgren et al. (3), and particularly over the past two decades, stereotactic body radiation therapy (SBRT) has been offered to most frail patients (4,5). SBRT consists in delivering image-guided highly conformal irradiation, allowing the use of ablative fraction doses to the tumor (from 6 to 20 Gy) while preserving surrounding normal tissues with steep falloff of radiation dose (6). This treatment modality is suitable for small tumor volumes (stage I-II lung tumors, < 50 mm) and in these cases is associated with excellent tumor control rates (7).

The lung is a good candidate for SBRT because of its organization in parallel, authorizing hot spots on small volumes. However, SBRT for bronchopulmonary tumors may generate lung toxicity such as radiation pneumonitis or radiation-induced lung fibrosis (8). As often happens, clinical radiation therapy preceded radiation biology, and little is known about the consequences of such new treatment modalities on normal tissues. Changing fractionation protocols is not trivial, and history has forced radiation therapists to face up to dramatic late normal tissue damage when using hypofractionation, especially with schemes including large volumes or critical organs (9). The low α/β ratio of late-responding tissues exposes them to increased damage when incrementing fraction size, exposing patients to unexpected late after-effects. During the past two decades, the ballistic accuracy of novel radiation therapy machines has allowed the return of severe hypofractionation schemes in a safer context. However, and despite the sharp reduction in the volume of exposed healthy tissues, side-effects persist. Until now, a

technological block has prevented pre-clinical modeling of SBRT in small animals. Yet, adapted preclinical models are essential to increase understanding of such new treatment modalities. This technological block was overcome about 10 years ago, thus allowing the use of high single or even fractionated doses of radiation exposure on very small volumes of mouse lung (10-14) and studies on tumor-bearing mice (15). However, in numerous studies, there is a lack of information concerning precise dose deposition and lung damage volume, often because of an absence of treatment planning systems allowing organ contouring.

Our objective in the present study was to monitor dose and volume effects of stereotactic radiation exposure centered on the mouse left lung using arc therapy dose delivery (16). We show that this model allowed focal irradiation and the development of an injury patch evolving through tissue scarring and consolidation, characterized by impact on lung type II pneumocytes and club cells. Long-term studies necessitate beam collimation to 3 x 3 mm² to ensure survival and the scarring process, which can be monitored by micro-CT imaging. With this size of field, a dose of at least 60 Gy must be given to guarantee lung tissue fibrosis. Smaller collimation induces acute tissue response undetectable on imaging. Larger irradiation fields can strongly compromise survival at such high doses.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and irradiation procedure

Male C57BL/6Jrj mice from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) were used for all experiments. Animals were housed in the IRSN animal facilities accredited by the French Ministry of Agriculture for performing experiments on rodents. Animal experiments were performed in compliance with French and European regulations on protection of animals used for scientific purposes (EC Directive 2010/63/EU and French Decree 2013-118). All experiments were approved by Ethics Committee #81 and authorized by the French Ministry of Research under the reference APAFIS#13021-2018011217442982 v1 (internal project number P17-13). For irradiation, mice were

anesthetized with 100 mg/kg ketamine (Imalgene 1000, Merial, Lyon, France) and 10 mg/kg xylazine (Rompun® 2%, Bayer Healthcare, Loos, France).

Focal irradiation was performed on the SARRP (small animal radiation research platform, XSTRAHL Ltd., UK) using arc therapy as described in detail before (16). Anesthetized mice were immobilized on the treatment bed and the isocenter was placed on the left lung on the CBCT image using the treatment planning system Muriplan®. Irradiations were performed at 220 kV and 13 mA with inherent and additional filtrations of about 0.8 and 0.15 mm of beryllium and copper, respectively. For volume effect studies, the left lung was exposed to a 90 Gy single dose using four different collimators: 1 mm diameter, 3 x 3 mm², 7 x 7 mm² and 10 x 10 mm². For reasons of convenience, these collimators will be called 1, 3, 7 and 10 mm, respectively. The 7 mm collimator was not provided by Xstrahl in our standard configuration of the SARRP, so in order to irradiate the entire left lung, but the right lung as little as possible, we designed a home-made 7 x 7 mm² collimator. This collimator and validation of the experimental dosimetry are described in the supplementary material and methods.

For the volume effect, lung tissue was harvested 1, 3, 6 and 12 months following radiation exposure. For dose-effect studies, mice were irradiated using 3 mm collimation, at single doses of 20, 40, 60, 80, 100 and 120 Gy. Lung tissue was harvested at 1 and 6 months post-exposure. To avoid variations in the structural/cellular constitution of different areas of the lung, control/unirradiated mice were included for lung imaging and histological analyses and measurements were performed in matched areas between irradiated and non-irradiated mice.

2.2. microCT imaging

Mice were anesthetized by inhalation of 1.5% isoflurane. Mouse lung imaging was performed at the "Plateforme d'imagerie du vivant, Université Paris Descartes, Faculté de chirurgie dentaire" using a micro-CT scanner (Quantum FX, PerkinElmer) with respiratory gating as already described (16). Using semi-automatic segmentation, the

main bronchi, injury patch, left and right lungs were manually contoured to quantify the intensity, in Hounsfield units (HUs), in the desired volume.

2.3. Lung tissue treatment

For histology, right and left lungs were removed and fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Five-micrometer paraffin tissue sections were used for hematoxylin-eosin-saffron (HES) and Masson trichrome staining and for immunohistological studies. For mRNA preparation, lung tissues (injury patch, ipsilateral lung and contralateral lung) were frozen in RNAlater™ RNA Stabilization Reagent (Qiagen, Valencia, CA) until analysis.

HES and Masson trichrome-stained tissue sections were used to assess lesion severity. Measurements of the thickness of the alveolar septa, bronchiole diameter, and cell counts were performed using the Visiol@b™2000 image analysis software (Biocom SA, Les Ulis, France).

2.4. Immunostaining

Sections were incubated with antibodies to pro-surfactant protein C, uteroglobin or von Willebrand factor, all in co-immunostaining with alpha-smooth muscle actin to facilitate structure visualization and to look for possible epithelial- or endothelial-to-mesenchymal transition. All antibodies were from Abcam, Paris, France. Samples were then incubated with Alexa fluor-conjugated corresponding secondary antibodies (Life Technologies, Saint Aubin, France). Sections were mounted in Vectashield mounting medium with DAPI (Eurobio/Abcys, Courtaboeuf, France). Uteroglobin-positive cells were counted in three different bronchioles per sample in the injured area and expressed as a percentage of the total cells counted along the epithelial axis. Pro-surfactant protein C-positive cells were counted in 10 successive fields (objective 40) near the injury patch and close to the pleural area (far from the patch).

2.5. Tissue RNA extraction and quantitative real-time PCR

Total RNA was prepared with the mirVana isolation kit (Thermo Fisher Scientific, France). After quantification on a NanoDrop ND-1000 apparatus (NanoDrop Technologies, Rockland, DE), reverse transcription was performed with 1 µg of RNA using a reverse transcription kit from Applied Biosystems (Courtaboeuf, France). Relative mRNA was quantified using the $\Delta\Delta CT$ method with 18S as housekeeping gene. Genes were chosen as lung cell markers or according to their proven role in lung tissue inflammatory response to radiation exposure. mRNA levels were not measured following irradiation with 10 mm collimation given the severity of radiation damage and the short duration of the experimental period due to anticipated euthanasia. For 1 and 3 mm collimation, mRNA was measured in the injured patch, in the ipsilateral lung and in the right lung. For 7 mm collimation, the injury patch included all the left lung, and so mRNA was measured in the left lung and right lungs.

2.6. Statistical analyses

Data are given as means \pm SEM. Statistical analyses were performed by ANOVA (Tukey multiple comparison post-test) or Student's t-test, with a level of significance of $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Volume effect of 90 Gy single-dose exposure

3.1.1. Bronchiolitis obliterans limits mouse survival at large volumes

Isodose curves and the dose-volume histogram (DVH) for 1, 3 and 10 mm collimators are shown figure 1A. An example of ballistic performance is given in supplemental figure 1 showing gamma H2AX immunostaining of both lungs harvested 15 min after 5 Gy irradiation with 3 mm collimation. Immunoreactivity was observed in the irradiated area only, materialized by the blue circle. As shown in figure 1A, increasing the size of beam collimation moved the DVH of each contoured organ (right lung, left lung and heart) closer to the DVH of the target area. Examples of mean doses calculated for the left lung, right lung and heart (excluding the

target volume) for 1, 3 and 10 mm beam collimations are given in figure 1B. Increasing target volume affected survival of the mice, i.e. animals exposed to 90 Gy with 7 or 10 mm collimation necessitated anticipated euthanasia at 2 months and 21 days, respectively (figure 1C). Large volume irradiation was associated with bronchiolitis obliterans, which can be considered as the clinical consequence that limits volume increase. Bronchiolitis obliterans was characterized by strong lung opacification on scanner images, and dense/fatal fibrin and leukocyte exudate in the bronchiolar lumen (figure 1D, left panel). Bronchiolitis obliterans was never observed at 1 mm, rare at 3 mm and constant at 7 and 10 mm collimation (figure 1D, right panel).

3.1.2. Both 1 mm and 3 mm collimation allow long-term studies, but only 3 mm generates tissue fibrosis

As mentioned previously, 90 Gy irradiation using 7 or 10 mm beam collimation centered on the left lung was incompatible with long-term survival. Figure 2A shows representative images of Masson trichrome-stained left lung sections 1, 1.5 and 2 months following 7 mm collimation and 21 days following 10 mm collimation (bottom line). Tissue damage was very severe and characterized by total parenchymal disruption concerning more than 50% of the total tissue section for 7 mm collimation and the entire section for 10 mm collimation. Both configurations were associated with increased thickness of the alveolar septa (used as a proxy for the parenchymal response to trauma) of the entire left lung (figure 2B).

Radiation exposure to 90 Gy with 1 or 3 mm beam collimation was associated with 100% survival. The use of 1 mm collimation generated an injury patch visible on tissue sections at 1 and 3 months (figure 2A), accompanied by thickened alveolar septa, including in the right lung at 1 month (figure 2B, supplemental figure 2A). Later, no patch was visible on tissue sections, but alveolar septa remained thickened until 12 months post-exposure. The injury patch was never visible on CT scans (figure 2C) and did not change the position of the mean smoothed HU curve (figure 2D).

Irradiation with 3 mm collimation generated an injury patch at 1 month that lasted until 12 months post-exposure. Alveolar septa

were severely thickened and this had repercussions on both the pleural area and the right lung up to 12 months (Figure 2B and supplemental figure 2A for right lung). The injury patch was always observable at CT scan, and stricture occurred with tissue scarring, since the patch volume decreased with time (supplemental figure 2B). Mean smoothed HU curves show increased intensity of the patch from 1 to 12 months, with curve shift signaling increased density of the left lung at 1 month (figure 2D).

3.1.3. Irradiation impacts type II pneumocyte and bronchiolar epithelial cell numbers, depending on the irradiated volume

Uteroglobin (UGB) immunostaining allowed the monitoring of club cells in bronchiolar epithelium located in the damaged area. Figure 3A (left panel) shows representative pictures of UGB immunostaining in control bronchiolar epithelium and cell depletion 3 months after 90 Gy exposure (3 mm collimation). Graphics show UGB-positive cell counts in the injury patch and in the right lung, revealing significant club cell depletion in the injured area with effects in the right lung for 7 and 10 mm beam collimation at all time points. Irradiation with 1 mm collimation had no effect on UGB-positive cell numbers.

SFTPC immunostaining allowed the monitoring of type II pneumocytes in the injury patch and far from the patch, near the pleura. In the right lung, no change in type II pneumocyte numbers was observed (not shown). Figure 3B (left panel) shows an example of SFTPC/alpha-SMA immunostaining in control and irradiated lung, 3 months after 90 Gy exposure (3 mm collimation). Radiation exposure induced an increase in the number of type II pneumocytes with 1 and 3 mm beam collimation, in the injury patch and close to the patch, respectively. Higher irradiated volumes did not allowed pneumocyte multiplication, except for the 1.5 months time point following 7 mm beam collimation in the pleural area.

3.1.4. Acute modifications of inflammatory gene expression levels extend to the contralateral lung whatever the collimation used

Genes representative of tissue inflammatory response and markers of type II pneumocytes and epithelial cells (table 1) were measured in the injury patch, ipsilateral lung and right lung (figure 4). Given the damage generated after 10 mm beam collimation, we decided to exclude these samples from gene measurements. With 7 mm beam collimation, the irradiated area corresponded to the entire left lung; graphs indicate only the left and right lungs. To simplify graph reading, control values were checked for similarity throughout the experimental period (from 1 to 12 months) and pooled to obtain only one value per tissue. Figure 4A shows gene expression of CCSP for club cells and SFTPC for type II pneumocytes, and figure 4B shows examples of inflammation markers, i.e. TNF and IL-6.

Overall, 90 Gy irradiation using 7 mm collimation was associated with severe CCSP down-regulation and no responsive SFTPC up-regulation, following observations made with cell counts. Reducing the irradiated volume to 3 mm preserved CCSP gene expression and induced responsive SFTPC up-regulation in the patch and the ipsilateral and right lungs. Using 1 mm collimation up-regulated CCSP in the injury patch and the right lung at 12 months and induced strong acute responsive SFTPC up-regulation in the injury patch and the ipsilateral and right lungs. Modifications in the expression of Cyp2F2 (for club cells) and Foxj1 (for ciliated cells) showed the same profiles, with less down-regulation or increased responsive up-regulation when the irradiated volume was decreased (supplemental figure 3).

Concerning inflammatory markers, 7 mm collimation induced strong up-regulation of IL-1 β , IL-6, TNF, CXCL2, and EMR1, with down-regulation of ENG (figure 4B and supplemental figure 4). The same profiles were obtained in the right lung, not surprisingly given the size of the irradiation field. Using 1 or 3 mm collimation generated similar profiles of acute (1 month) inflammatory gene expression levels in the injury patch and the ipsilateral and right lungs (figure 4B and supplemental figure 4), except for CXCL2 up-regulation, which was observed only with 3 mm collimation. Interestingly, ENG expression was decreased following irradiation with 7 mm collimation, but increased following 1 or 3 mm collimation.

3.2. Dose-effect of focal exposure using 3 mm collimation

3.2.1. Tissue fibrosis occurs following exposure to 60 Gy or more

Dose-dependent radiation injury was monitored by micro-CT analyses and histology 1 and 6 months post-irradiation. Figure 5A shows micro-CT images and contouring of the right lung, left lung, main bronchi and injury patch following 0, 20, 40, 60, 80, 100 and 120 Gy radiation exposure. Localized lung opacification was observable from 80 Gy at 1 month and from 60 Gy at 6 months. Smoothed mean intensity representation (in HUs) highlights the presence of a dense injury patch at 1 month following 80, 100 and 120 Gy doses (figure 5B, left panel). The 40 and 60 Gy doses generated a slight shift of the corresponding curves, whereas the 20 Gy curve remained similar to controls. At 6 months (figure 5B, right panel), curves are similar to controls after 20 and 40 Gy. The 60 Gy curve clearly joined the "condensed" group of higher doses (80, 100 and 120 Gy). Injury patch volume, represented as a percentage of total lung volume in figure 5C, reflected well the appearance of a visible injury patch 6 months after 60 Gy. Arc therapy using 3 mm beam collimation generates a cylindrical target volume of 21 mm³. Doses of 80 and 100 Gy gave injury patch volumes comparable to the theoretical target volume. Conversely, the 120 Gy dose generated an injury patch 2 times the target volume.

Histological sections confirmed the presence of an injury patch (arrowheads) 1 month after 80, 100 and 120 Gy, with a particularly dense lesion after 120 Gy. Doses of 40 and 60 Gy generated noticeable damage, albeit undetectable with CT scans. At 6 months, a patch clearly appeared after 60 Gy, similar in size and density to patches at other high doses.

Thickness of the alveolar septa was measured as a proxy of lung parenchymal response to trauma (figure 5E). Tissue response occurred from 40 Gy at 1 month, with acute repercussions for the patch in the pleural area and right lung at doses of 80, 100 and 120 Gy. At 6 months, the septa returned to control values at 40 Gy and remained significantly thickened from 60 to 120 Gy, with repercussions on the right lung.

3.2.2. Dose-effect on club cells and type II pneumocytes

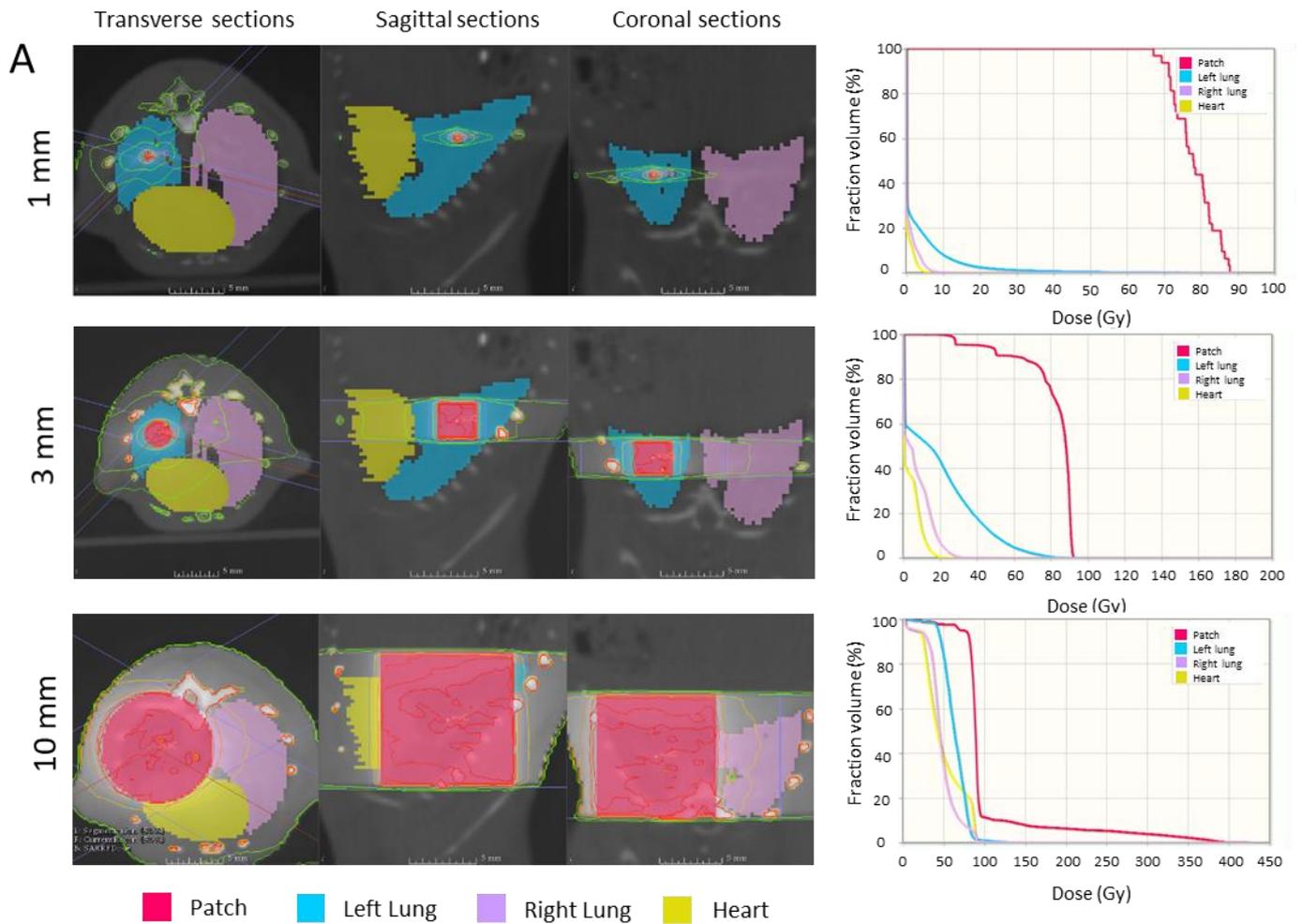
The percentage of UGB-positive cells was measured on bronchiolar epithelium in the injured patch and in the right lung 1 and 6 months post-irradiation (figure 6A). At 1 month, club cells were significantly depleted for doses of 40 Gy and above, with similar depletion after 80, 100 and 120 Gy. No effect was noted in the right lung. The number of cells per 100 µm of bronchiolar epithelium did not change significantly (figure 6B). At 6 months, depletion was noted for all doses from 20 to 120 Gy, with similar severity for each dose (figure 6A). Repercussions occurred in the right lung, with significant cell loss after 100 and 120 Gy. The number of cells per 100 µm decreased significantly from 40 to 120 Gy in the left lung, and after 100 and 120 Gy in the right lung (figure 6B).

Exposure to 60 Gy or less induced type II pneumocyte hyperplasia at 1 month, whereas higher doses of 80, 100 and 120 Gy induced type II pneumocyte depletion (figure 6C). Significant repercussions occurred in the right lung after 120 Gy, with increased type II pneumocyte numbers. At 6 months, the increase in type II pneumocyte numbers was significant after all doses except 20 Gy. No change occurred in the right lung.

3.2.3. mRNA expression

Genes representative of the tissue inflammatory response and markers of type II pneumocytes and epithelial cells (table 1) were measured in the injury patch, ipsilateral lung and right lung after 0, 20, 40, 60, 80, 100 and 120 Gy irradiation with 3 mm collimation. Figure 7A shows CCSP and SFTPC gene expression for club cells and type II pneumocytes, respectively. Irradiation induced a dose-dependent decrease in CCSP gene expression at 1 month in the injury patch. No significant change occurred in the ipsilateral or right lung. At 6 months, CCSP expression levels were similar to control values. This was confirmed by Cyp2F2 (club cells) expression profiles (supplemental figure 5). At 1 month, irradiation decreased SFTPC mRNA expression, especially in the ipsilateral and right lungs. At 6 months, expression returned to control values. Figure 7B gives IL-6 as an example of radiation-induced inflammatory gene modulations. At 1 month, strong overexpression was induced in the

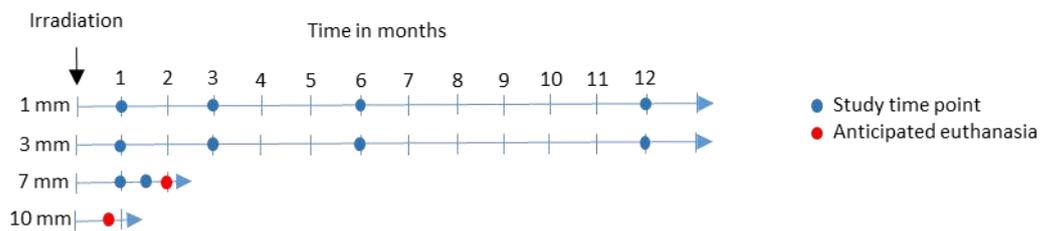
injury patch following the higher doses, i.e. 80, 100 and 120 Gy. An impact on the right lung was visible only after 120 Gy. IL-6 overexpression persisted at 6 months in the patch, with effects on the right lung after 120 Gy. Supplemental figure 6 shows other gene expression modifications, with no large modifications compared to control levels at both time points.



B

	Collimation 1 mm	Collimation 3 mm	Collimation 10 mm
Left Lung	2.50 Gy	19.20 Gy	63.5 Gy
Right Lung	0.70 Gy	6.81 Gy	46.96 Gy
Heart	0.40 Gy	3.74 Gy	48.72 Gy

C



D

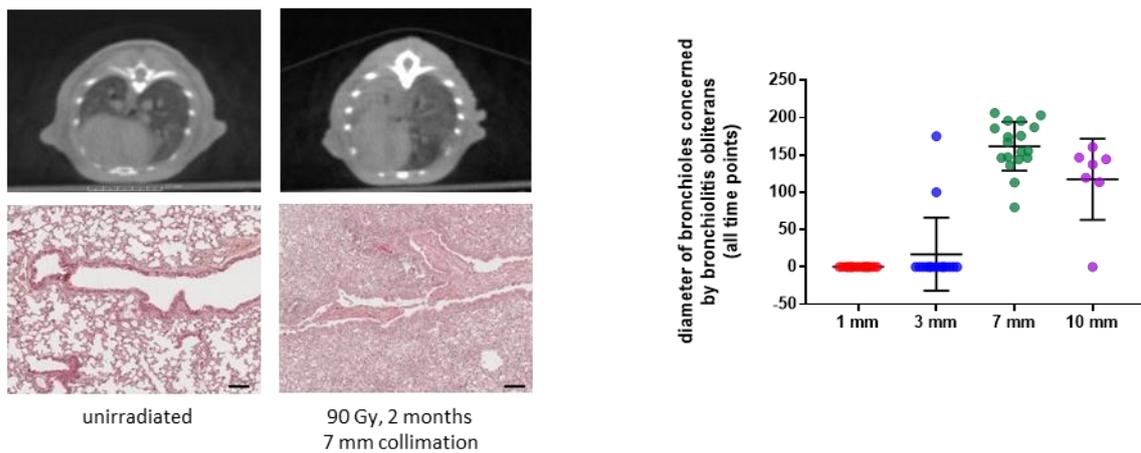


Figure 1: Volume effect of left lung arc therapy. A: Isodose curves, organ contouring and dose-volume histograms obtained using 1, 3 and 10 mm beam collimation and delivering a 90 Gy single dose centered on the left lung of mice. B: examples of mean doses received by the left lung, the right lung and the heart when delivering 90 Gy to the isocenter using 1, 3 or 10 mm collimation. Values are calculated after exclusion of the target volume. C: Experimental schedules showing that 7 and 10 mm beam collimation necessitated anticipated euthanasia at 2 months and 21 days post-exposure, respectively. $4 < n < 8$ per group. D: Example of scanner images and HES-stained tissue sections 2 months following 7 mm 90 Gy exposure showing bronchiolitis obliterans compared to unirradiated tissue. Bar: 100 μ m. Graphic shows the diameter of the bronchioles concerned by bronchiolitis obliterans, including all samples irradiated with each collimator, whatever the time point. Zero means no bronchiole concerned.

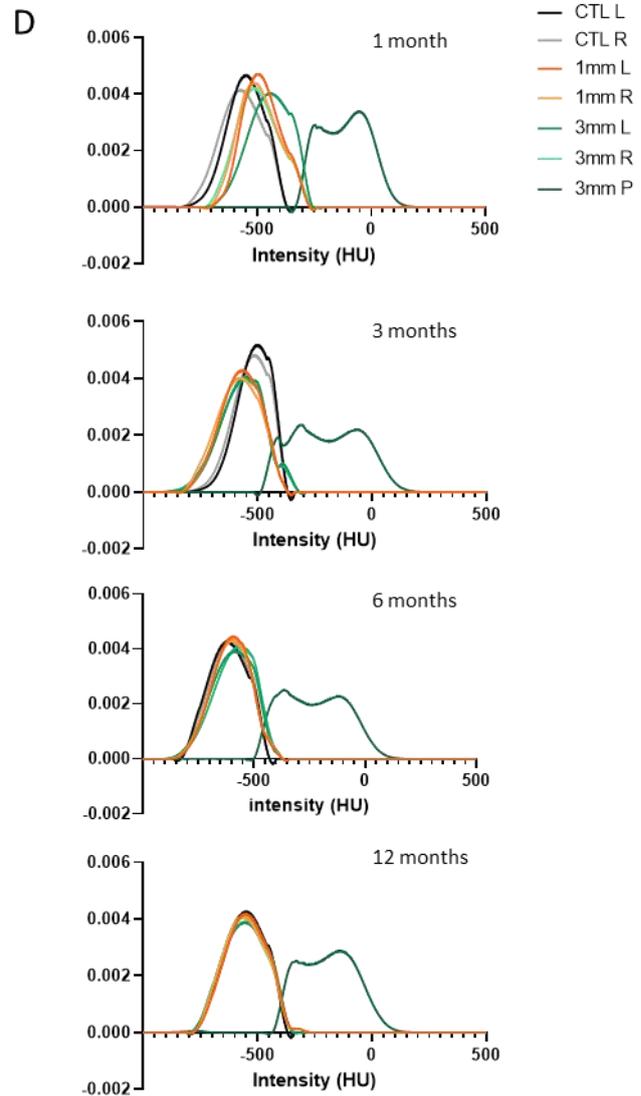
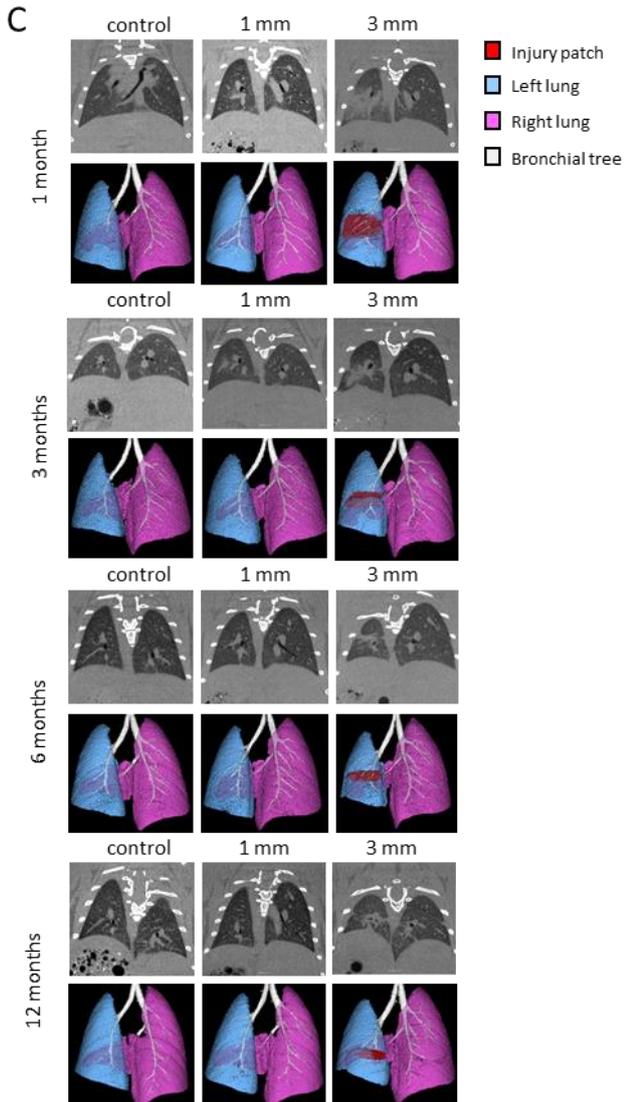
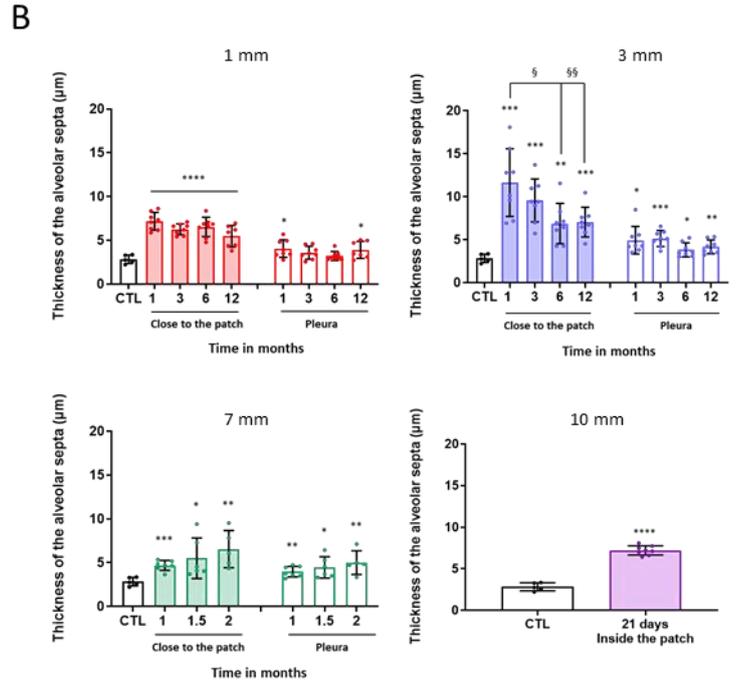
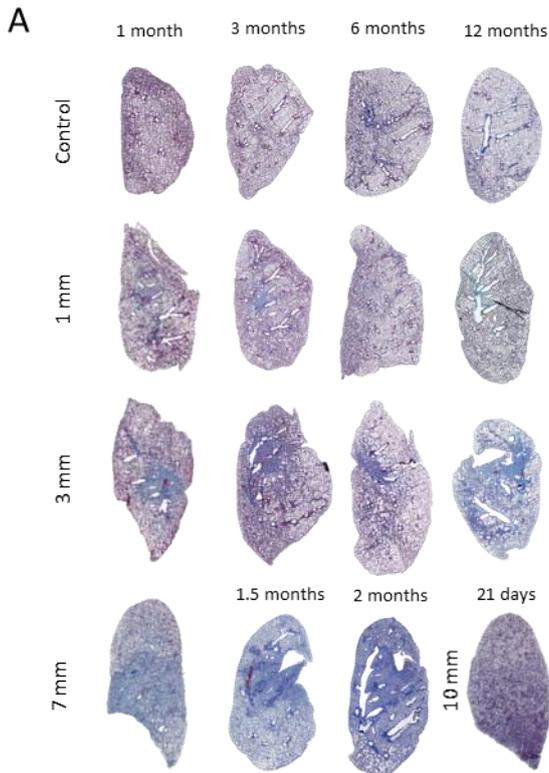
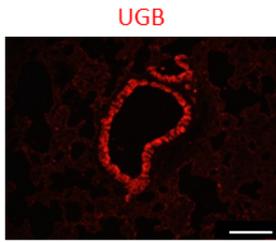
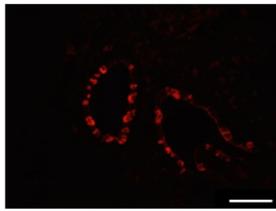


Figure 2: Volume effect: histology and imaging. A: representative left lung histological sections after Masson trichrome staining in controls or following 90 Gy radiation exposure 1 to 12 months post-exposure (1 and 3 mm beam collimation), 1, 1.5 and 2 months post-exposure (7 mm beam collimation) and 21 days post-exposure (10 mm beam collimation). B: Thickness of the alveolar septa measured in controls and close to the injury patch or in the pleural area 1 to 12 months post-exposure (1 and 3 mm beam collimation); 1, 1.5 and 2 months post-exposure (7 mm beam collimation) and 21 days post-exposure (10 mm beam collimation). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. $5 < n < 8$. C: Representative micro-CT images (sagittal plane) and 3D reconstructions (after contouring of injury patch, left lung, right lung and main bronchi) performed in control animals and 1, 3, 6 and 12 months following exposure to 90 Gy using 1 or 3 mm beam collimation. D: Smoothed mean intensity representation, in Hounsfield units (HUs), in the injured area (patch when visible, left lung otherwise) in groups of control mice or mice exposed to 90 Gy using 1 or 3 mm collimation, 1, 3, 6 and 12 months post-exposure.

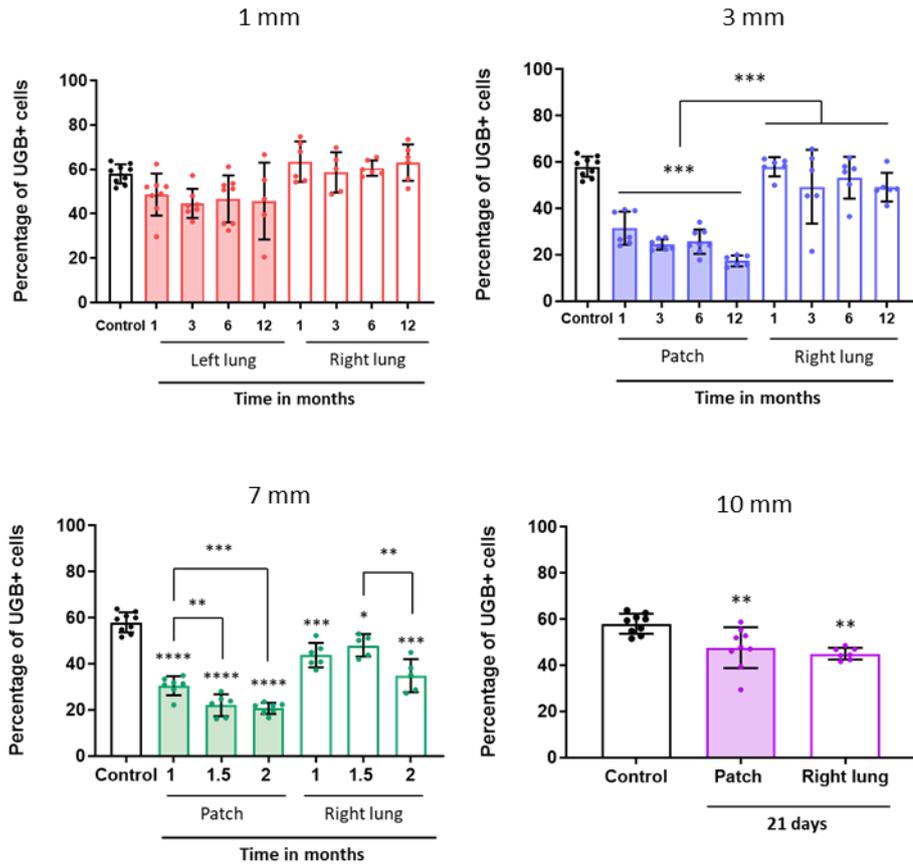
A



Control



90 Gy/3 mm/3 months



4<n<8 per group.

Figure 3A: Volume effect on club cell and type II pneumocyte numbers. Representative picture of uteroglobin immunostaining (club cells) in control lung and irradiated lung 3 months following 90 Gy irradiation using 3 mm collimation. Bar: 100 μ m. Graphics show the percentages of UGB-positive cells in the bronchiolar epithelium in control lungs and in the injury patch and right lung following 90 Gy irradiation using of 1 and 3 mm (1, 3, 6, 12 months time points), 7 mm (1, 1.5 and 2 months time points) or 10 mm beam collimation (21 days time point).

B

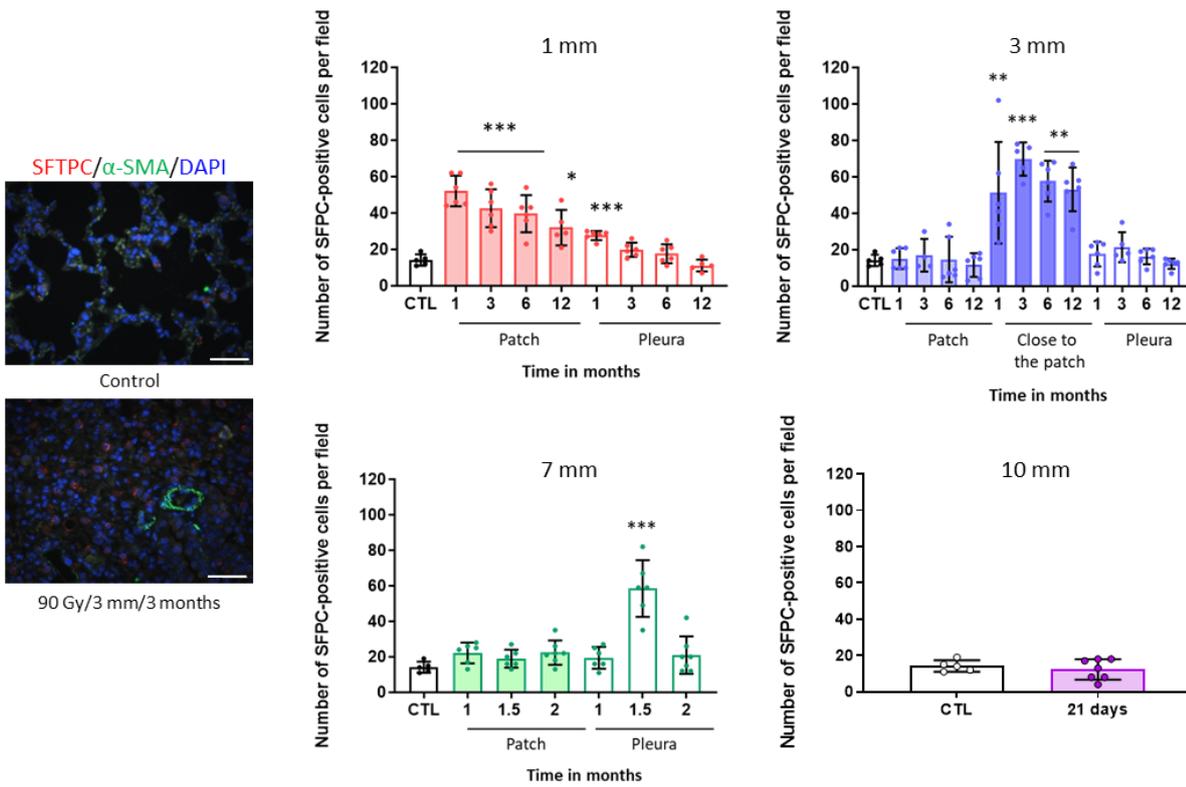


Figure 3B: Volume effect on club cell and type II pneumocyte numbers. Representative picture of pro-surfactant protein C (red, type II pneumocytes)/alpha smooth muscle actin (green) immunostaining in control lung and irradiated lung 3 months following 90 Gy irradiation using 3 mm beam collimation. Bar: 100 μ m. Graphics show the percentages of SFTPC-positive cells per field in the parenchyma of control lungs and in the injury patch and pleural side of the left lung following 90 Gy irradiation using beam collimations of 1 and 3 mm (1, 3, 6, 12 months time points), 7 mm (1, 1.5 and 2 months time points) or 10 mm (21 days time point). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. $n = 6$.

Gene	Reference
clara/club cell secretory protein (<i>ccsp</i>)	Mm00442046
cytochrome p450 2F2 (<i>cyp2f2</i>)	Mm00484087
forkhead box J1 (<i>foxj1</i>)	Mm01267279
surfactant protein C (<i>sftpc</i>)	Mm00488144
endoglin (<i>eng</i>)	Mm00468252
interleukin 1-beta (<i>il-1 beta</i>)	Mm00434228
interleukin 6 (<i>il-6</i>)	Mm00446190
tumor necrosis factor (<i>tnf</i>)	Mm00443258
adhesion G protein-coupled receptor 1 (<i>emr1</i>)	Mm00802529
c-x-c motif chemokine ligand 2 (<i>cxcl-2</i>)	Mm00436450

Table 1: Gene list measured in qRT-PCR analyses.

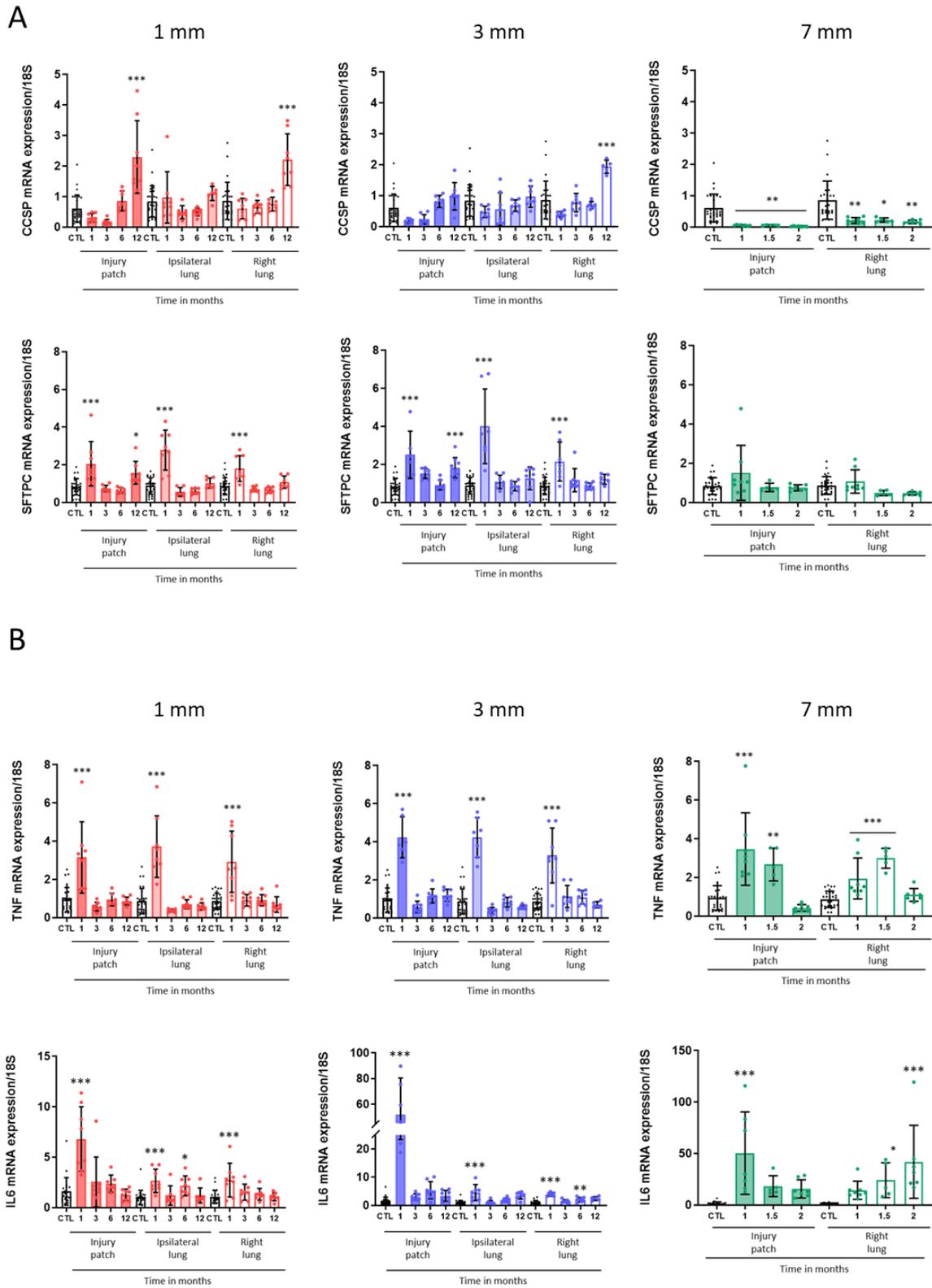


Figure 4: Volume effect on mRNA expression. Changes in gene expression levels compared to control values following 90 Gy radiation exposure in the injury patch, ipsilateral lung and right lung using 1 mm and 3 mm beam collimation (1, 3, 6, 12 months post-exposure) or in the injury patch and right lung using 7 mm beam collimation (1, 1.5 and 2 months following exposure). A: examples of club cell (CCSP) and type II pneumocyte (SFTPC) markers. B: examples of inflammatory mediators. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. $5 < n < 8$.

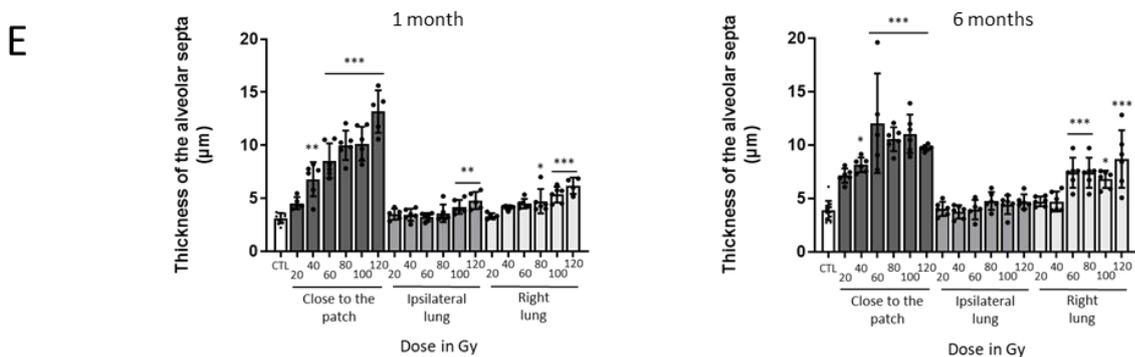
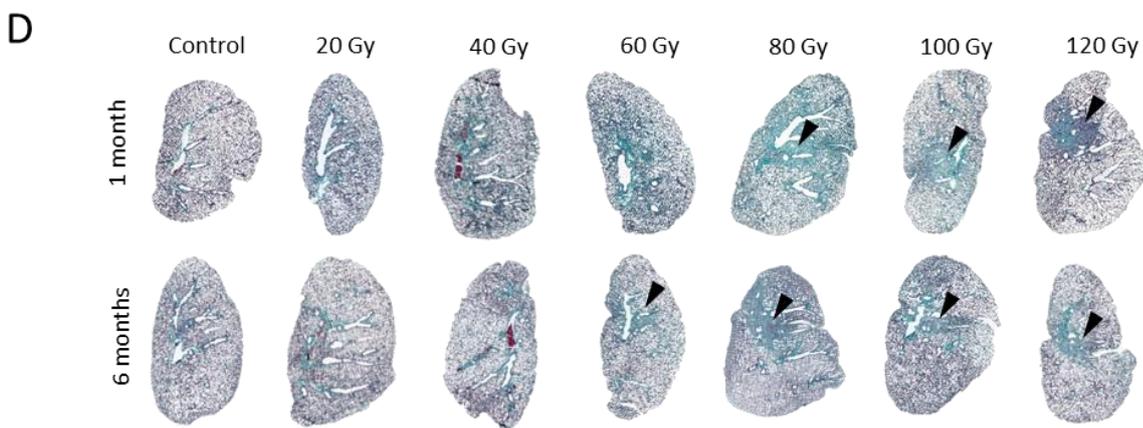
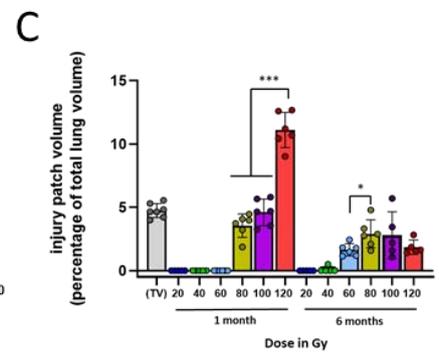
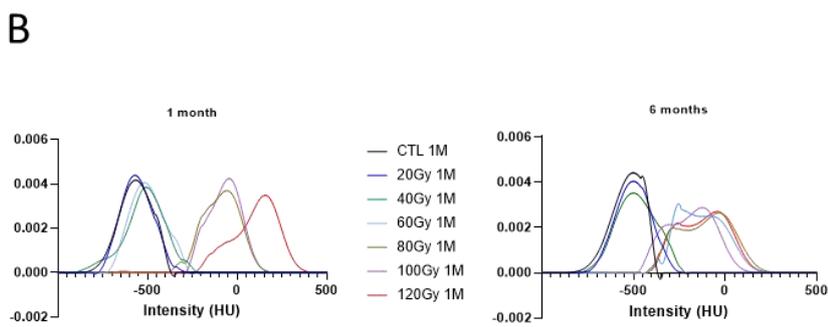
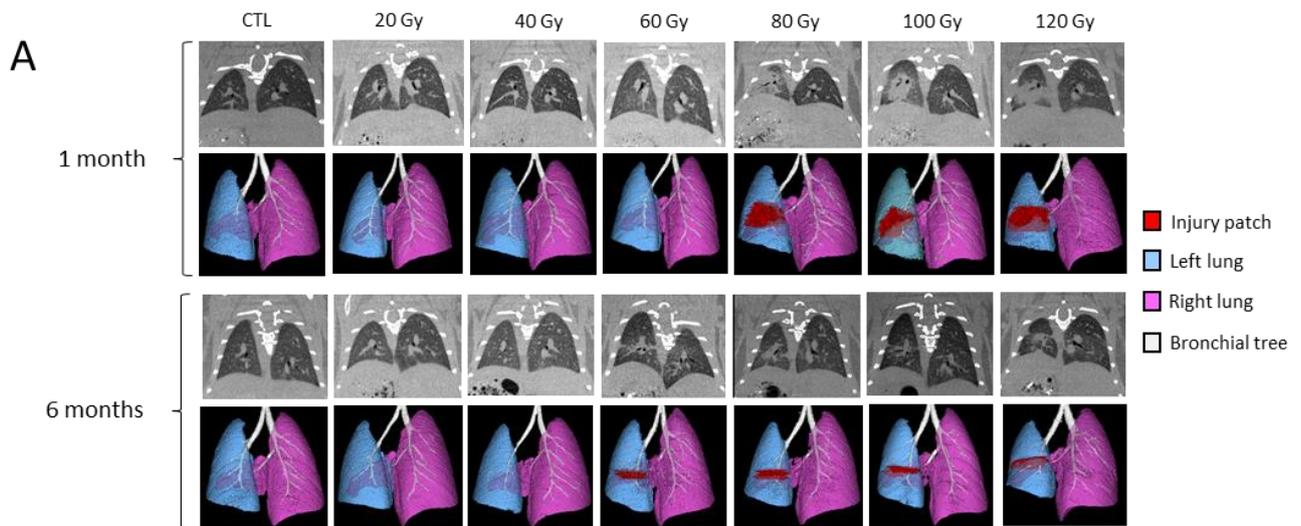


Figure 5: Dose effect of left lung arc therapy. A: Representative micro-CT images (sagittal plane) and 3D reconstructions (after contouring of injury patch, left lung, right lung and main bronchi) performed in control animals and 1 and 6 months following 20, 40, 60, 80, 100 or 120 Gy irradiation using 3 mm collimation. B: Smoothed mean intensity representation, in Hounsfield unit (HUs), in the injured area (patch when visible, left lung otherwise) in groups of mice 1 (left panel) and 6 months (right panel) following 0, 20, 40, 60, 80, 100 or 120 Gy radiation exposure. $4 < n < 7$ per group. C: Volume of the injury patch as a percentage of the total lung volume 1 and 6 months following exposure to 0, 20, 40, 60, 80, 100 or 120 Gy compared to a calculated theoretical target volume. $n = 5$ per point. D: Representative left lung histological sections after Masson trichrome staining, 1 month (upper line) and 6 months (lower line) following 3 mm-collimated exposure to 0, 20, 40, 60, 80, 100 or 120 Gy. Arrowheads indicate visible injury patch. E: Thickness of the alveolar septa measured in the injury patch, the ipsilateral and right lungs at 1 and 6 months following exposure to 0, 20, 40, 60, 80, 100 or 120 Gy. $n = 6$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to control values.

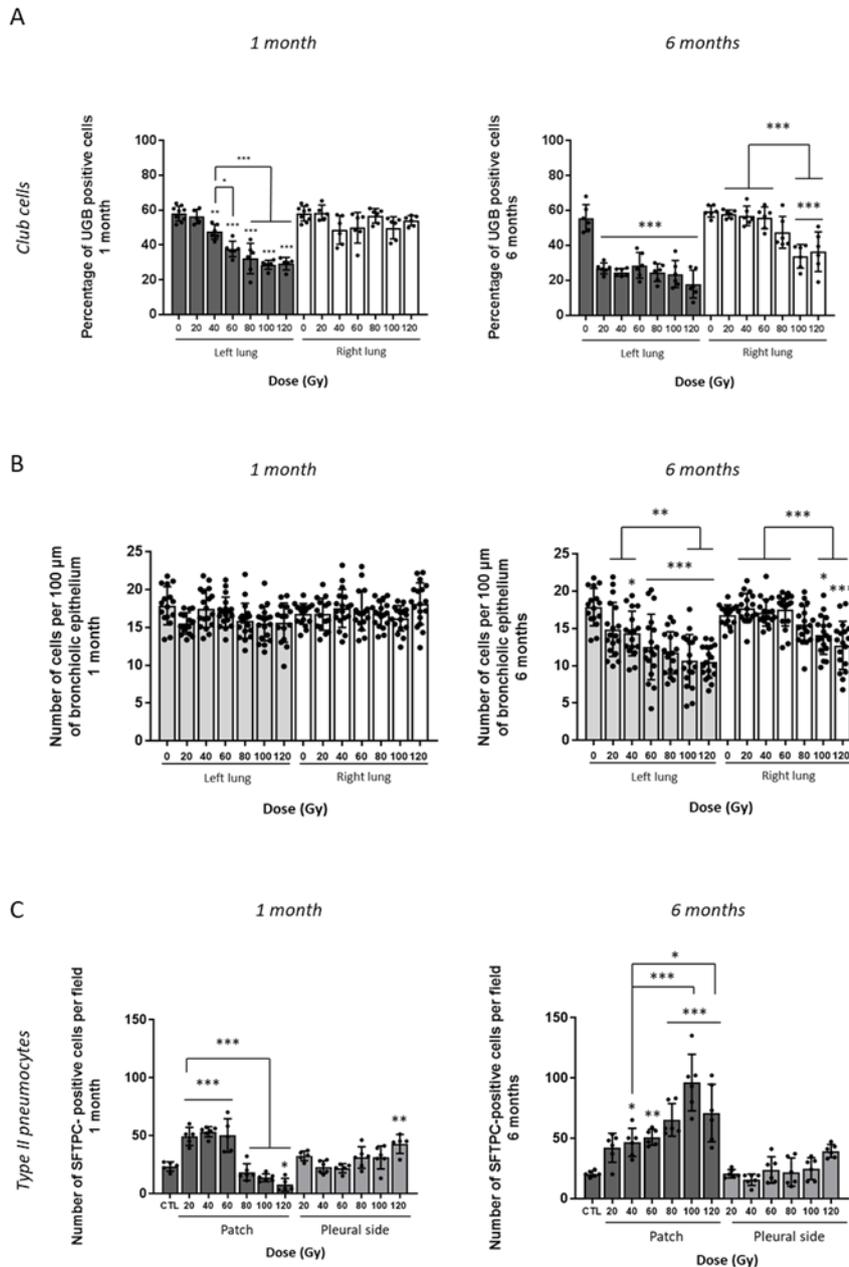


Figure 6: Dose effect on club cell and type II pneumocyte numbers. A: percentages of UGB-positive cells in the bronchiolar epithelium of left and right lungs, 1 month (left panel) and 6 months (right panel) following exposure to 0, 20, 40, 60, 80, 100 or 120 Gy. n=6. B: Number of cells per 100 μm of bronchiolar epithelium measured in the left and right lungs 1 month (left panel) and 6 months (right panel) following exposure to 0, 20, 40, 60, 80, 100 or 120 Gy. 16<n<18. C: Number of surfactant protein C-positive cells per field counted in the injury patch and pleural side 1 month (left panel) and 6 months (right panel) following exposure to 0, 20, 40, 60, 80, 100 or 120 Gy. n=6. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

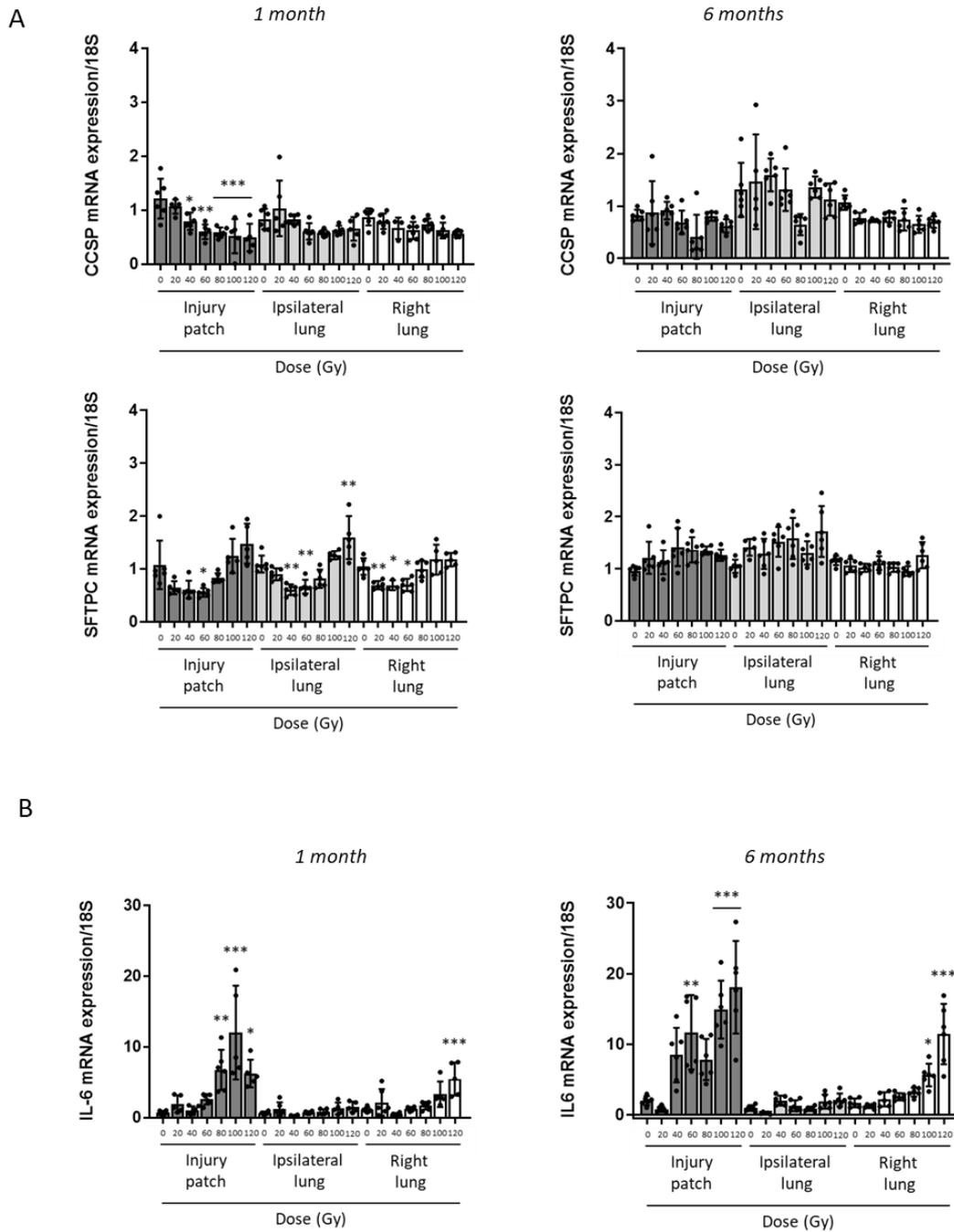


Figure 7: Dose effect on mRNA expression. Changes in gene expression levels compared to control values following 0, 20, 40, 60, 80, 100 and 120 Gy radiation exposure in the injury patch and the ipsilateral and right lungs using 3 mm beam collimation 1 month (left panels) and 6 months (right panels) post-exposure. A: examples of club cell (CCSP) and type II pneumocyte (SFTPC) markers. B: IL-6 expression levels as an example of inflammatory mediator. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. $5 < n < 8$.

4. Discussion

SBRT is guided today more by technical advances than by radiobiological knowledge. In this study, we used our model of focal lung irradiation in mice using arc therapy to yield information on the development of lung damage, depending on dose or volume exposed in this context. These data may help to further studies on lung SBRT-associated after-effects.

To study the volume effect, we chose a single dose of 90 Gy, a dose extensively used in the different reports published since the advent of the technical possibility of focal irradiation of the lung in mice. However, most studies have used 3 mm collimation and were short-term, generally until 4 weeks post-exposure because of severe damage to the skin and/or muscles such as hair loss and dermonecrosis, as reported by Kwon et al. (11,14,17-19). Here we show that, unlike single beam irradiation, arc therapy avoided severe damage to the skin and allowed long-term studies until 12 months post-exposure, at least with 1 or 3 mm beam collimation. Acute lung damage was characterized by dense/hypercellular inflammation, a total disruption of alveolar organization, invasion of foamy and hemosiderin-laden macrophages and immune cell infiltration in the alveolar and bronchiolar spaces as already described (16). The use of 7 or 10 mm beam collimation induced severe life-threatening bronchiolitis obliterans, which was the reason for anticipated euthanasia. Airway obliteration and whole left lung consolidation was also observed using 5 mm collimation (90 Gy) in the study of Hong et al. (14), highlighting the determinant role of irradiated volume in the tolerance of exposure to such high doses. Only 3 mm beam collimation generated lung fibrosis. Lung damage induced with 1 mm collimation was not visible using CT scan and did not modify HU curves. Only 3 mm collimation was associated with visible opacification at CT scan and HU curve shift until 12 months post-exposure. Nonetheless, tissue response occurred with 1 mm collimation as illustrated by alveolar septal thickening until 12 months post-exposure, including far from the target volume in the pleural area at 1 month and increased mRNA expression of inflammatory mediators including in the right lung. Club cells were not affected by irradiation, but the number of type II pneumocytes

increased at 1 month and until 12 months post-exposure. Using 3 mm collimation destroyed a significant number of club cells, but the volume exposed still allowed a type II pneumocyte response. Club cells reside in terminal bronchioles, whereas type II pneumocytes are located in the alveolar space. Both are involved in lung epithelial protection and regeneration. Club cells are quiescent in homeostatic epithelium, but are able to self-renew in cases of damage and generate club, goblet and ciliated cells, or even type I and II alveolar cells (20). Whole thorax radiation exposure to 15 Gy in mice is associated with club cell depletion and reduced CCSP, CYP2F2 (club cells) and FOXJ1 (ciliated cells) mRNA abundance (21). In our study, club cells were chronically depleted (until 12 months) and this depletion was detected when the irradiated volume was sufficient to include a significant proportion of bronchioles, as in the case of 3 mm collimation. Using a transgenic mouse model, chronic conditional club cell depletion has been shown to be responsible for peribronchiolar fibrosis (22) and may also play a significant role in radiation-induced fibrosis in our model.

In the case of injury, type II pneumocytes also show stem cell properties and produce type I pneumocytes to regenerate the lung alveolar space. We previously observed that 17 Gy whole thorax irradiation increased the number of type II pneumocytes, suggesting alveolar reconstruction, as shown also by Almeida et al. (23). Here we show an acute and strong increase in type II pneumocyte numbers following 90 Gy exposure with both 1 mm and 3 mm collimation. This was confirmed by SFTPC mRNA levels. Type II pneumocyte proliferation conditions lung tissue scarring. Impaired type II pneumocyte proliferation and subsequent loss of alveolar repair capacity have been implicated in the development of chronic obstructive pulmonary disease in humans (24). Globally, to obtain lung fibrosis and long-term survival using 90 Gy single-dose exposure in our mouse model necessitates the use of 3 mm collimation to damage a significant number of club cells while preserving the regenerating capacity of type II pneumocytes.

To further describe the 3 mm collimation configuration, we decided to study the dose effect of focal left lung exposure. A limited irradiated volume using 3 mm beam collimation and arc therapy allowed dose

escalation to 120 Gy, while preserving the skin and thoracic wall from severe damage. All animals survived in good clinical conditions until 6 months post-exposure. This time point was the authors' choice and was not dictated by the animals' clinical status. Using beam collimation of 3 mm is a prerequisite to such dose escalation, since 100 Gy irradiation using 5 mm beam collimation has been associated with a short survival time of 22 days (10). We noted opacification at 1 month for doses of 80, 100 and 120 Gy only, associated with severe alveolar septal thickening, strong loss of club cells and also loss of acute type II pneumocytes. Type II pneumocyte response was visible at 6 months for such high doses, suggesting delayed scarring. At 6 months, an injury patch appeared for the 60 Gy dose, and was confirmed by a shift in the HU curve. Exposure to 20 Gy did not generate any club cell loss or alveolar septal thickening, but increased type II pneumocyte number. Absence of sufficient club cell loss, perhaps like after 40 Gy exposure, may explain the absence of tissue fibrosis at 6 months. Granton et al. observed lung opacification 39 weeks after 20 Gy exposure using 5 mm beam collimation and parallel-opposed fields centered on the right lung (12). Discrepancies may be explained by differences in irradiated volume (loss of club cells is probably more severe with 5 mm beam collimation) or in observation time (39 weeks vs 6 months in our case). Globally, using 3 mm beam collimation, long-term tissue fibrosis occurs for doses of 60 Gy or more. Lower doses are interesting in studying acute lung response, but do not generate tissue fibrosis. Very high doses generate acute opacification and rapid tissue fibrosis. The 60 Gy dose may be very interesting as it generates a severe acute tissue response, with progression to fibrosis. The objective was not to obtain tissue fibrosis as quickly as possible, but a model in which pathological mechanisms take time to occur and organize.

In conclusion, our work gives information on lung response to stereotactic arc therapy radiation exposure, depending on the volume and dose. The crux to the understanding of new radiobiology associated with SBRT is the development of appropriate preclinical models. Such models necessitate doses high enough to induce lung fibrosis, in a limited volume to ensure long-term survival, but also sufficient to

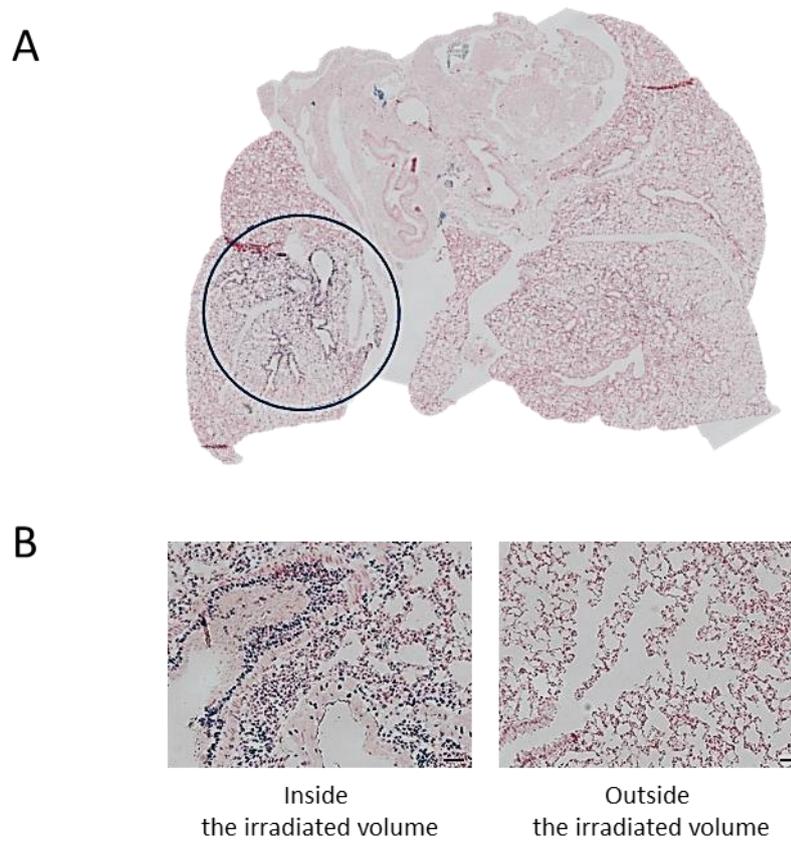
offer working material and compatible with clinical indications for lung SBRT for large tumors.

References

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49:1374-403.
2. Vansteenkiste J, Crino L, Doooms C, et al. 2nd esmo consensus conference on lung cancer: Early-stage non-small-cell lung cancer consensus on diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* 2014;25:1462-74.
3. Blomgren H, Lax I, Naslund I, et al. Stereotactic high dose fraction radiation therapy of extracranial tumors using an accelerator. Clinical experience of the first thirty-one patients. *Acta Oncol* 1995;34:861-70.
4. Palma DA, Senan S. Early-stage non-small cell lung cancer in elderly patients: Should stereotactic radiation therapy be the standard of care? *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2012;84:1058-9.
5. Abratt RP, Bogart JA, Hunter A. Hypofractionated irradiation for non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2002;36:225-33.
6. Shah JL, Loo BW, Jr. Stereotactic ablative radiotherapy for early-stage lung cancer. *Seminars in radiation oncology* 2017;27:218-228.
7. Chi A, Liao Z, Nguyen NP, et al. Systemic review of the patterns of failure following stereotactic body radiation therapy in early-stage non-small-cell lung cancer: Clinical implications. *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 2010;94:1-11.
8. Thompson M, Rosenzweig KE. The evolving toxicity profile of sbrt for lung cancer. *Translational lung cancer research* 2019;8:48-57.
9. Cosset JM, Mornex F, Eschwege F. [hypofractionation and radiotherapy: "The eternal return"]. *Cancer radiotherapie: journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique* 2013;17:355-62.

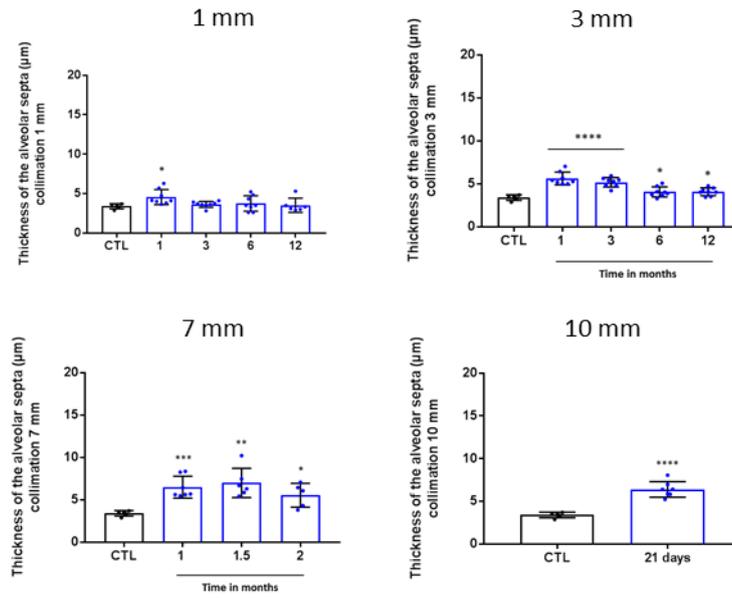
10. Cho J, Kodym R, Seliounine S, et al. High dose-per-fraction irradiation of limited lung volumes using an image-guided, highly focused irradiator: Simulating stereotactic body radiotherapy regimens in a small-animal model. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2010;77:895-902.
11. Hong ZY, Eun SH, Park K, et al. Development of a small animal model to simulate clinical stereotactic body radiotherapy-induced central and peripheral lung injuries. *Journal of radiation research* 2014;55:648-57.
12. Granton PV, Dubois L, van Elmpt W, et al. A longitudinal evaluation of partial lung irradiation in mice by using a dedicated image-guided small animal irradiator. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2014;90:696-704.
13. Hong ZY, Song KH, Yoon JH, et al. An experimental model-based exploration of cytokines in ablative radiation-induced lung injury in vivo and in vitro. *Lung* 2015;193:409-19.
14. Hong ZY, Lee CG, Shim HS, et al. Time, dose, and volume responses in a mouse pulmonary injury model following ablative irradiation. *Lung* 2016;194:81-90.
15. Du S, Lockamy V, Zhou L, et al. Stereotactic body radiation therapy delivery in a genetically engineered mouse model of lung cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2016;96:529-37.
16. Lavigne J, Suissa A, Verger N, et al. Lung stereotactic arc therapy in mice: Development of radiation pneumopathy and influence of hif-1alpha endothelial deletion. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2019;104:279-290.
17. Kwon OS, Kim KT, Lee E, et al. Induction of mir-21 by stereotactic body radiotherapy contributes to the pulmonary fibrotic response. *PloS one* 2016;11:e0154942.
18. Choi SH, Hong ZY, Nam JK, et al. A hypoxia-induced vascular endothelial-to-mesenchymal transition in development of radiation-induced pulmonary fibrosis. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2015;21:3716-26.
19. Jin H, Jeon S, Kang GY, et al. Identification of radiation response genes and proteins from mouse pulmonary tissues after high-dose per fraction irradiation of limited lung volumes. *International journal of radiation biology* 2017;93:184-193.
20. Nadkarni RR, Abed S, Draper JS. Stem cells in pulmonary disease and regeneration. *Chest* 2018;153:994-1003.
21. Manning CM, Johnston CJ, Hernady E, et al. Exacerbation of lung radiation injury by viral infection: The role of clara cells and clara cell secretory protein. *Radiation research* 2013;179:617-29.
22. Perl AK, Riethmacher D, Whitsett JA. Conditional depletion of airway progenitor cells induces peribronchiolar fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011;183:511-21.
23. Almeida C, Nagarajan D, Tian J, et al. The role of alveolar epithelium in radiation-induced lung injury. *PloS one* 2013;8:e53628.
24. Skronska-Wasek W, Mutze K, Baarsma HA, et al. Reduced frizzled receptor 4 expression prevents wnt/beta-catenin-driven alveolar lung repair in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2017;196:172-185.

Supplemental data

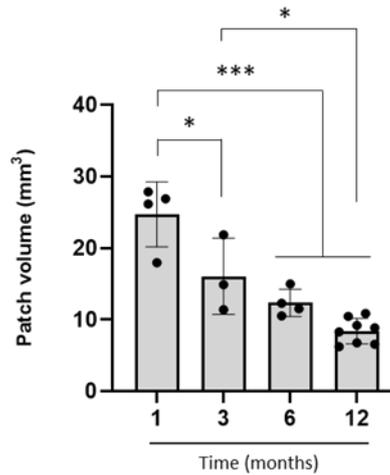


Supplemental figure 1: Gamma H2AX immunostaining. Example of 3 mm beam collimation. A: overview of both lungs harvested 15 min after 5 Gy focal exposure, stained with gamma H2AX, showing immunoreactivity localized to the target volume area in the left lung, materialized by a 3 mm-diameter circle. B: Higher magnification showing gamma-H2AX-positive cells inside the irradiated volume, and no immunoreactivity outside the irradiated volume. Barr=100 μ m.

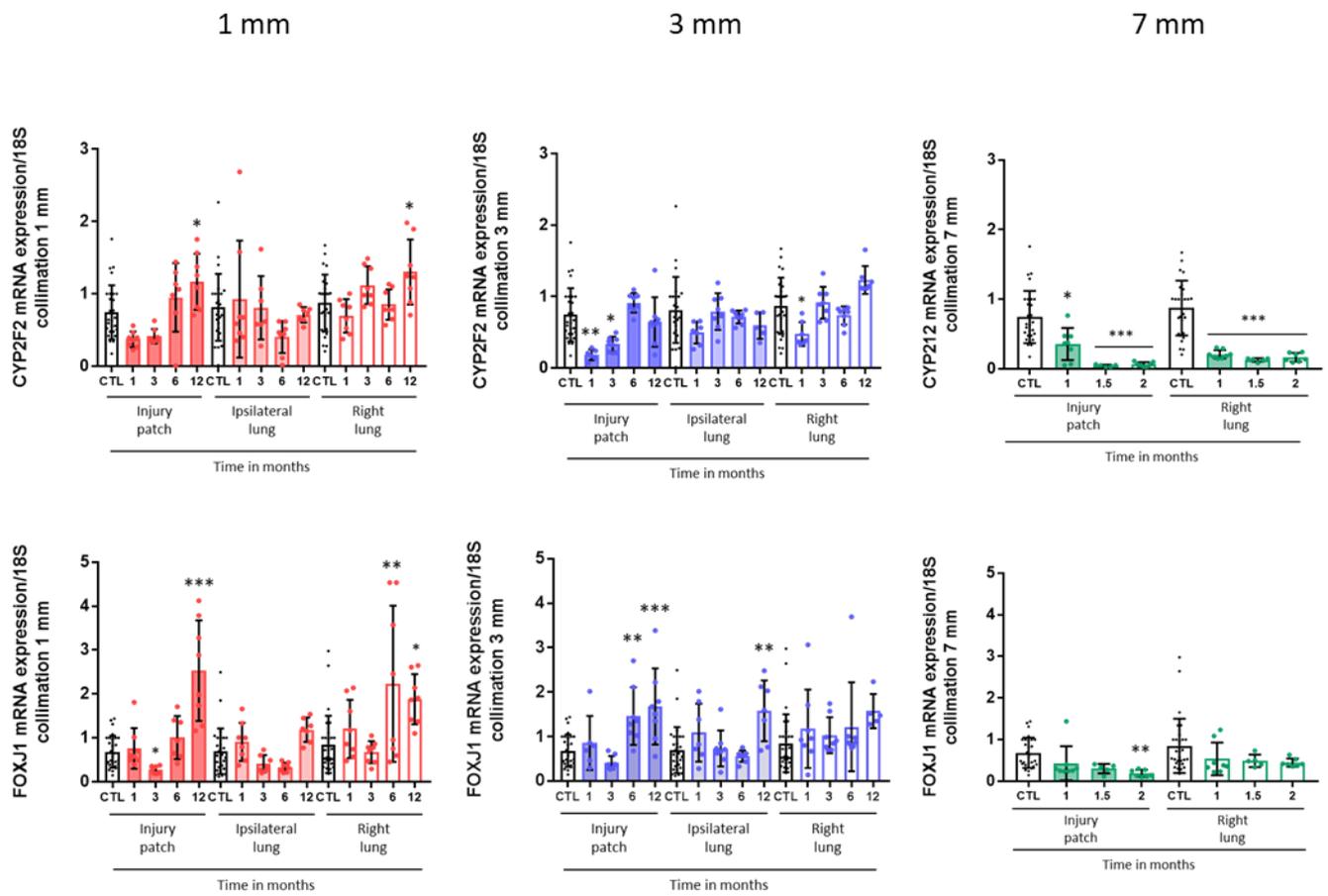
A



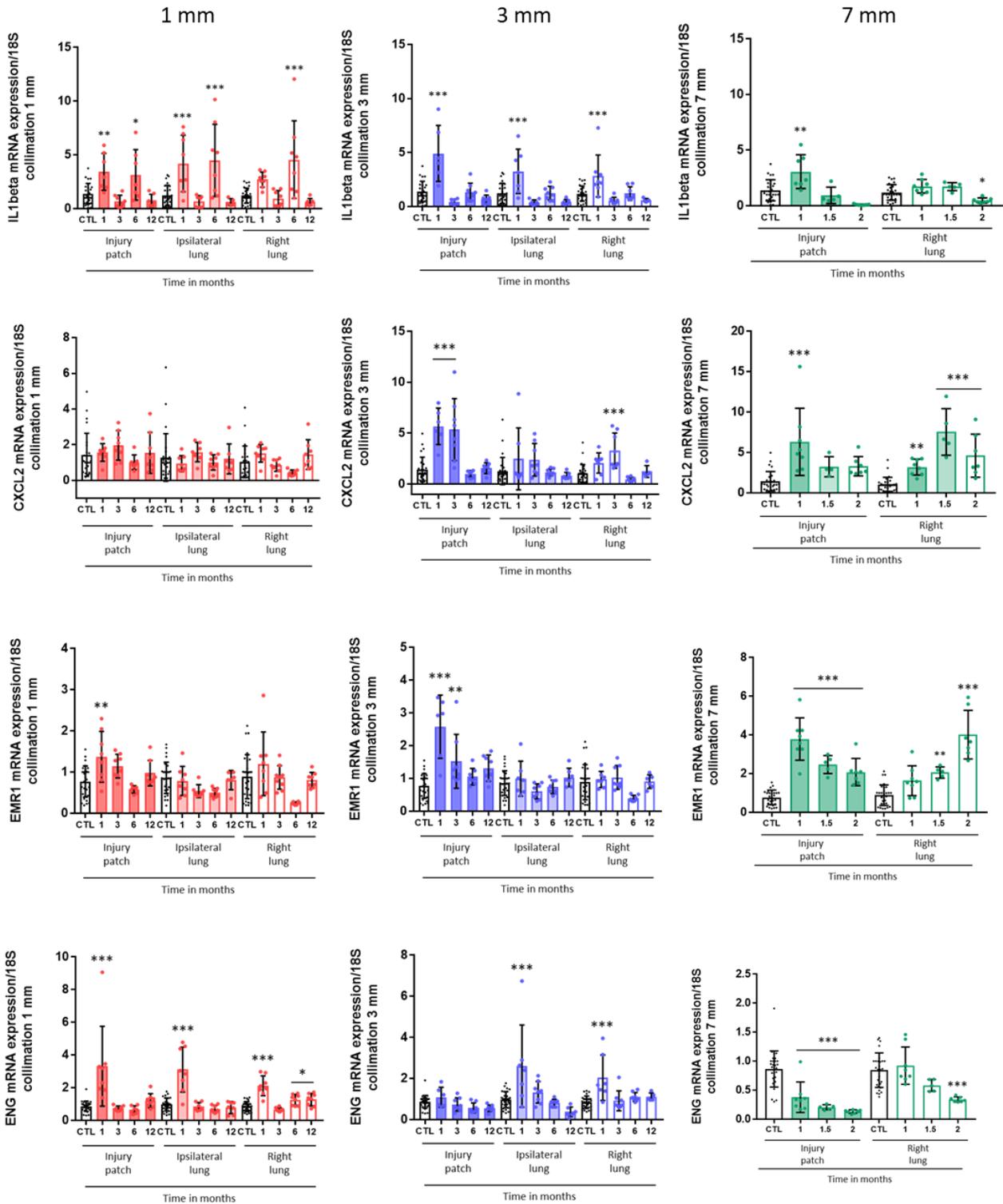
B



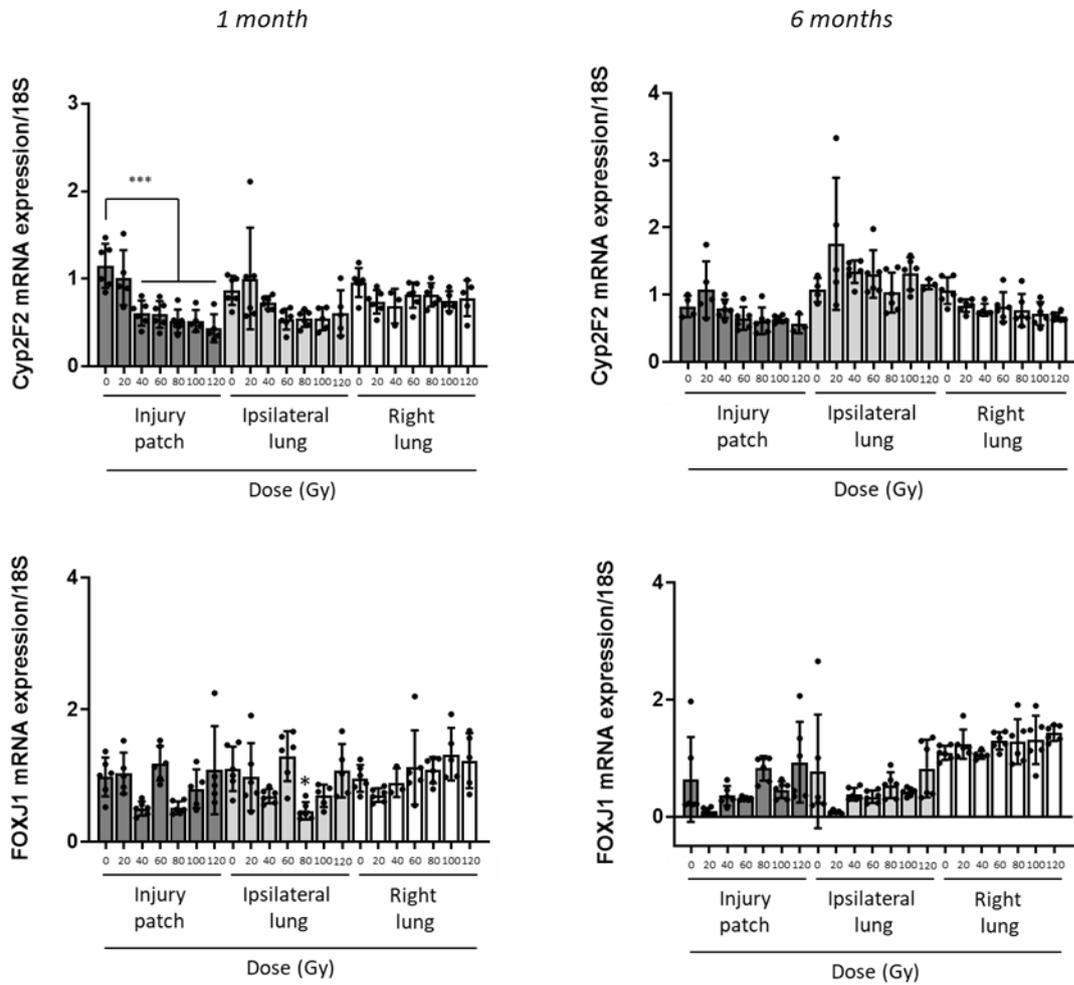
Supplemental figure 2: A: Thickness of the alveolar septa measured in the right lung from 1 to 12 months following 90 Gy radiation exposure (1 and 3 mm beam collimation), at 1, 1.5 and 2 months (7 mm beam collimation) and 21 days post-exposure (10 mm beam collimation) compared to control values. $5 < n < 7$. B: Volume of the injury patch from 1 to 12 months following 90 Gy focal irradiation using 3 mm beam collimation. $3 < n < 8$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.



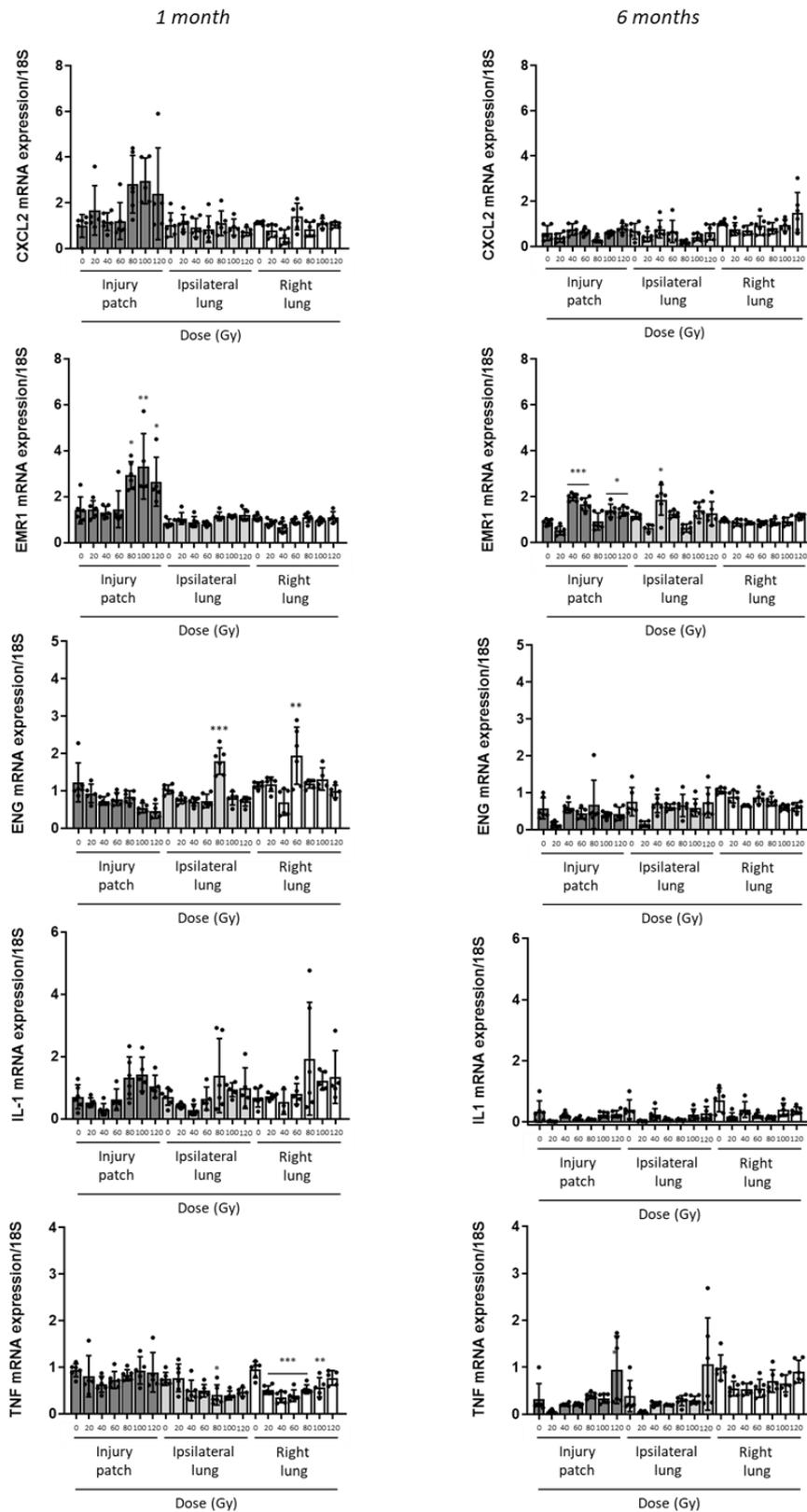
Supplemental figure 3: Volume effect. Gene expression of CYP2F2 (club cells) and FOXJ1 (ciliated cells) in the injury patch, ipsilateral lung and right lung at different time points following 90 Gy exposure using 1 or 3 mm beam collimation, or in the injury patch and right lung using 7 mm beam collimation. n=6. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.



Supplemental figure 4: Volume effect. Changes in gene expression levels in the injury patch, ipsilateral lung and right lung at different time points following 90 Gy irradiation using 1 or 3 mm beam collimation, in the injury patch and right lung using 7 mm beam collimation. $5 < n < 8$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.



Supplemental figure 5: Dose effect. Gene expression of CYP2F2 (club cells) and FOXJ1 (ciliated cells) in the injury patch, ipsilateral lung and right lung 1 month (left panels) and 6 months (right panels) following 0, 20, 40, 60, 80, 100 or 120 Gy radiation exposure using 3 mm beam collimation. $4 < n < 6$. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.



Supplemental figure 6: Dose effect. Changes in gene expression levels in the injury patch, ipsilateral lung and right lung following 0, 20, 40, 60, 80, 100 or 120 Gy radiation exposure using 3 mm beam collimation. $4 < n < 6$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Supplemental material and methods

Collimator design:

The design of the home-made collimator was guided by using Monte Carlo simulation. The Geant4 Monte Carlo code was used using the Livermore electromagnetic physics list with an energy cut of 250 eV was used for all particles (1, 2). The dose distributions in a solid water phantom of 5 cm x 5 cm x 2 cm (voxels size of 1 mm x 1 mm x 0.1 mm), placed at 35cm to the particle source (isocenter position on the SARRP), were calculated for adjusted the collimator design. Dose profiles at 0, 5, 10, 15 and 20 mm of depth were scored.

For the design of the new collimator only the last part of the SARRP collimator has to be modified as illustrated on figure 1:



Figure 1: photo of the SARRP collimator (left) and the designed collimator.

Experimental dosimetry:

The experimental dosimetry was performed using ionization chamber calibrated in dose to water and EBT3 self-developing Gafchromic films (Ashland ISP Advanced materials, NJ, US). The uncertainties are respectively 2.5% and 3% for the measures with the ionization chamber and EBT3 films respectively at a 95% confidence level.

Films calibration:

Calibration curves of EBT3 radiochromic films were performed using a solid water phantom of 20 cm x 20 cm x 6 cm. Firstly, the dose rate was measure with a the semiflex 31002 cylindrical ionization chamber calibrated in dose to water. The measurements were performed following as close as possible the AAPM protocol [MA et al. 2001]. Irradiations parameters were listed on the table 1:

Table 1: Irradiations parameters

High tension	220 kV
Intensity	13 mA
Filtrations	0.08 mm Be + 0.15 mm Cu
Half value layer	0.667 mm Cu
Source detector distance	35 cm
Source - phantom surface distance	33 cm
Irradiation field	Open field
Dose quantity	Dose to water

The dose rate obtained in the water phantom is 3.56 Gy/min in dose to water at 2 cm of depth. Then EBT3 films were irradiated at the same depth between 0 to 5 Gy to construct the calibration curve. The protocol used for films scanning and analysis is described in Dos Santos et al. (3). Three pieces of EBT3 films were irradiated per dose point and the points of the calibration curve were fitted with a 4th-degree polynomial curve as illustrated in figure 2:

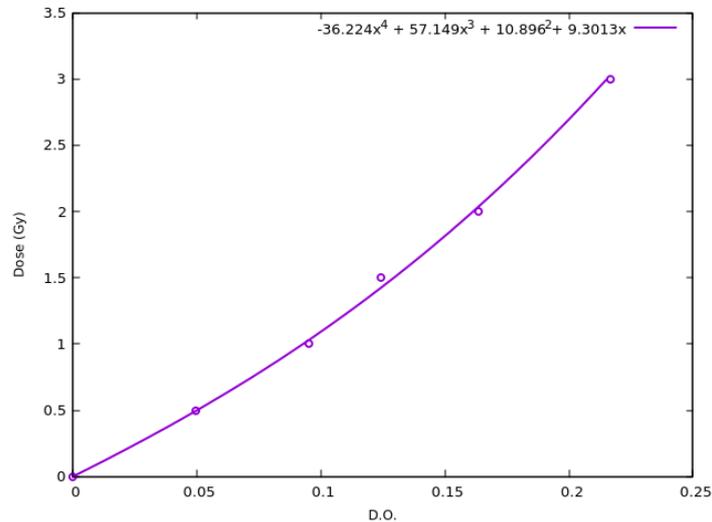


Figure 2: calibration curve for EBT3 radiochromic films

New collimator dosimetry

Thanks to EBT3 films dose, depth dose, dose profiles and output collimator factor (OCF) were measured for our small irradiation fields.

3 pieces of EBT3 radiochromic films were irradiated with the new collimator at 0, 5, 10, 15 and 20 mm of depth in a solid water phantom of 50 mm x 50 mm x 20 mm.

Table 2 reports the dose rate and FWHM (full width half maximum) at each depth and an example of dose profiles obtained at each depth is reported on figure 3:

Table 3: dose rate in dose to water and FWHM values for the new collimator at each depth

Depth (mm)	Mean Dw (Gy/min)	FWHM (mm)	
		X direction	Y direction
0	3.036 ± 0.042	6.475 ± 0.013	6.465 ± 0.014
5	2.770 ± 0.024	6.593 ± 0.009	6.575 ± 0.006
10	2.425 ± 0.016	6.700 ± 0.007	6.687 ± 0.006
15	2.056 ± 0.015	6.810 ± 0.007	6.794 ± 0.009
20	1.792 ± 0.032	6.938 ± 0.006	6.919 ± 0.00

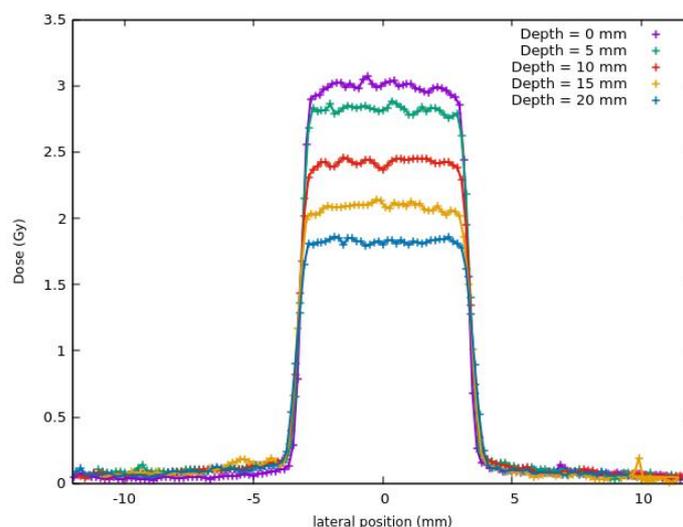


Figure 3: Dose profiles example following x axis.

Then, 3 pieces of EBT3 films were also irradiated at 10 mm depth with the 10x10, 5x5 and 3x3 mm collimator which are available for treatment planification on muriplan. Output collimator factor were calculated and are reported in table 3 where the 10 x 10 mm collimator is considered as the reference.

Table 3: Output collimator factor

Collimator	Mean Dw (Gy/min)	OCF
10 x 10 mm ²	2.557 ± 0.007	1
New collimator	2.425 ± 0.016	0.948
5 x 5 mm ²	2.349 ± 0.009	0.919
3 x 3 mm ²	2.295 ± 0.043	0.898

Thanks to these measurements we have characterized our new collimator. FWHM values are between 6.465 to 6.938 mm depending of the depth, dose profiles were analyzed and OFC were calculated.

During experimentations, mice were scanned on the SARRP, muriplan was used for beam/isocenter positioning (in the middle of the left lung) and dose computation with the 10 x 10mm collimator. The dose value enter on the TPS was adjusted by using the OCF calculated to obtain the irradiation time for the new collimator.

It is not possible to visualize isodoses or obtain DHV curves for this collimator but thanks to the design of the collimator guided by Monte Carlo calculations and the experimental dosimetry measurements we are now able to irradiate with this new collimator.

1) Agostinelli S. Geant4—a simulation toolkit. *Nucl Instruments Methods Phys Res Sect A Accel. Spectrometers, Detect Assoc Equip.* 2003;506(3):250-303. doi:10.1016/S0168-9002(03)01368-8.

2) Allison J, Amako K, Apostolakis J, et al. Geant4 developments and applications. *IEEE Trans Nucl Sci.* 2006;53(1):270-278.

3) Dos Santos M, Paget V, Ben Kacem M, Trompier F, Benadjaoud MA, François A, Guipaud O, Benderitter M, Milliat F. Importance of dosimetry protocol for cell irradiation on a low X-rays facility and consequences for the biological response. *Int J Radiat Biol.* 2018 Jun;94(6):597-606.

Etude de l'effet du fractionnement de la dose en conditions stéréotaxiques : une étude *in vivo* et *in vitro*

Etude de l'effet du fractionnement de la dose en conditions stéréotaxiques :

une étude *in vivo* et *in vitro*

Annaïg Bertho¹, Morgane Dos Santos², Valérie Buard¹, Vincent Paget¹, Olivier Guipaud¹, Georges Tarlet¹, Fabien Milliat¹ and Agnès François¹.

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, France.

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, France.

Les résultats de l'étude du fractionnement de la dose *in vivo* ne sont pas complets. Suite à un problème technique, l'analyse anatomopathologique pour le groupe irradié à 3x40 Gy n'est pas disponible. Les données d'expression génique et les images acquises au μ Ct sont disponibles. Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail de thèse seront complétés lors du projet de thèse effectué par Melle Sarah Braga-Cohen (thèse IRSN 2019-2022).

Objectifs : Au cours des deux dernières décennies, la radiothérapie stéréotaxique thoracique est proposée aux patients inopérables atteints de cancer du poumon non à petites cellules, comme alternative thérapeutique à la chirurgie. Son efficacité clinique est indéniable mais il y a un manque crucial de données radiobiologiques sur la réponse des tissus sains à de fortes doses par fraction. Une nouvelle modélisation préclinique de l'irradiation stéréotaxique pulmonaire guidée par l'image, en arc-thérapie et associée à un logiciel de plan de traitement nous permet de suivre l'évolution des lésions pulmonaires et l'impact du fractionnement de la dose.

Matériel et méthode : Pour l'étude du fractionnement de la dose *in vivo*, des souris C57bl/6 ont été exposées à trois fractions de 20, 28, 40 ou 50 Gy, centrées sur le poumon gauche, avec un collimateur de 3x3 mm², en arc-thérapie. Les détails du modèle d'irradiation utilisé sont disponibles en annexe 1 ainsi que dans l'article « *Preclinical model of arc therapy stereotactic ablative lung irradiation in the mouse : volume and dose effects.* » (Bertho et al, soumis dans IJROBP). Ces trois schémas de fractionnement permettent de délivrer une BED_{3Gy} de 60, 108, 208 et 300 Gy à l'isodose 30%. Différentes analyses ont été effectuées sur le patch lésionnel, le poumon ipsilatéral et le poumon droit : analyse des images acquises au μ CT, analyse anatomopathologique et de l'expression génique, 6 mois après l'irradiation. *In vitro*, différentes lignées cellulaires pulmonaires dont des cellules épithéliales et des cellules mésenchymateuses ont été irradiées selon cinq protocoles de fractionnement : 8x5 Gy, 4x7,5 Gy, 3x9 Gy, 2x11,3 Gy et 1x16,5 Gy. Ces protocoles font varier la dose par fraction tout en conservant une BED_{3Gy} similaire entre 105 et 108 Gy. L'analyse de l'expression génique prend en compte 44 gènes et a été réalisée 7 jours après l'administration de la dernière fraction.

Résultats : L'analyse histologique a révélé une réaction du parenchyme pulmonaire à 3x20, 3x28 et 3x50 Gy avec un épaississement des septa alvéolaires. En revanche, seuls les protocoles de 3x40 et 3x50 Gy induisent l'apparition d'un patch lésionnel fibreux visible aux images acquises au μ CT ainsi

que sur les coupes histologiques. L'analyse de l'expression génique (EMR1) a mis en lumière une possible infiltration persistante de macrophages dans le patch lésionnel pour des doses par fraction de 28, 40 et 50 Gy, 6 mois après irradiation. De la même manière, certains paramètres inflammatoires restent élevés 6 mois après irradiation quel que soit le protocole. *In vitro*, l'analyse de l'expression des gènes a montré une augmentation de l'expression, par les cellules épithéliales, de marqueurs mésenchymateux ainsi que des gènes des collagènes.

Conclusion : Chacun des protocoles *in vivo* induit une réaction pulmonaire à l'irradiation. Comme observé dans les études effet dose/effet volume, le protocole 3x50 Gy associant perte des cellules club et prolifération réactionnelle des pneumocytes de type II mène à la fibrose. Ceci sera à confirmer pour le protocole 3x40 Gy. Si on considère l'isodose 30%, il est nécessaire d'administrer une BED_{3Gy} d'au moins 200 Gy (à confirmer par l'analyse du protocole 3x40 Gy) pour obtenir une fibrose pulmonaire, soit une BED_{3Gy} au PTV de 1720 Gy. *In vitro*, l'administration de BED_{3Gy} similaires génère des modifications d'expression géniques comparables quelle que soit la dose par fraction. L'irradiation des cellules épithéliales pulmonaire semble orienter leur phénotype vers le processus de transition épithélio-mésenchymateuse qu'il serait intéressant d'explorer dans l'avenir.

Résultats :

Nous décrivons ici précisément les résultats obtenus après irradiation fractionnée. La discussion de ces résultats est incluse dans la discussion générale du projet de thèse.

1. Analyse histologique de l'effet du fractionnement de la dose dans un modèle préclinique d'irradiation stéréotaxique pulmonaire en arc-thérapie

La Figure 1A présente les coupes histologiques colorées en HES. Le patch lésionnel est visible 6 mois après irradiation à 3x40 (data non montrées car non représentatives) et 3x50 Gy. Ce patch lésionnel est également visible sur les images acquises au μ CT (Figure 1B). La figure 1C montre les mesures effectuées pour l'épaississement des septa alvéolaires, 6 mois après irradiation. L'épaississement des septa alvéolaires est un témoin de la réaction du parenchyme pulmonaire à l'irradiation. L'administration de trois fractions de 20 Gy n'entraîne pas de patch lésionnel visible mais induit quand même l'épaississement des septa alvéolaires. De même, après irradiation à 3x28 Gy, l'épaississement des septa alvéolaires est présent. L'irradiation à 3x50 Gy induit également un épaississement des septa alvéolaire très important (** $p < 0.001$). L'irradiation fractionnée n'influe pas sur l'épaisseur des septa alvéolaires du poumon ipsilatéral après irradiation avec trois fractions de 20, 28 ou 50 Gy. Cependant, l'irradiation à 3x50 Gy induit un léger épaississement des septa alvéolaires au niveau du poumon droit. L'épaississement des septa alvéolaires analysé en fonction de la BED_{3Gy} et incluant les protocoles dose unique et dose fractionnée (Figure 1D) a révélé que l'administration de trois fractions de 50 Gy, soit une BED de 2650 Gy, induisait un épaississement des septa alvéolaires plus important que l'administration en dose unique de 100 Gy, soit une BED_{3Gy} de 3433, ou de 120 Gy, soit une BED_{3Gy} de 4920 Gy. Le fractionnement de la dose induit donc un épaississement plus important des septa alvéolaires, traduisant une réaction du parenchyme plus importante, en tout cas pour les BED_{3Gy} les plus fortes.

La Figure 2 présente les résultats des comptages des pneumocytes de type II et des cellules club. La réaction proliférative des pneumocytes de type II, témoin de la mise en place de la réaction de cicatrisation, est importante après irradiation à 3x50 Gy (Figure 2A). Elle n'est pas observée après irradiation à 3x20 et 3x28 Gy. Par contre, les pneumocytes de type II sont diminués au niveau de la zone pleurale après irradiation avec des fractions de 20, 28 et 50 Gy. La réaction proliférative des pneumocytes de type II suit l'augmentation de la BED des doses fractionnées et des doses uniques (étudiées lors de l'effet de la dose totale) : plus la BED_{3Gy} augmente, plus les pneumocytes de type II prolifèrent (Figure 2B). Cependant, le fractionnement a légèrement tendance à induire une prolifération moins importante des pneumocytes de type II par rapport aux doses uniques.

L'irradiation en fractions de 28 et 50 Gy induit une déplétion des cellules club au niveau des bronchioles du poumon gauche, 6 mois après irradiation (Figure 2C). L'irradiation n'affecte pas les cellules club présentes dans les bronchioles du poumon droit, quelle que soit la dose par fraction. Quand la déplétion des cellules club est observée en fonction de la BED_{3Gy} , on remarque que l'administration d'une dose unique de 20 Gy, soit une BED_{3Gy} de 153 Gy, induit une perte des cellules club au niveau des bronchioles du poumon gauche plus importante qu'une irradiation à 3x20 Gy, soit une BED de 460 Gy (* $p < 0.05$, Figure 2D). En dehors de ce point, la déplétion des cellules club suit la BED_{3Gy} : plus celle-ci augmente, plus la perte des cellules club est importante. On notera que le

fractionnement de la dose semble induire une perte légèrement moins importante des cellules club par rapport aux doses uniques en particulier pour les BED_{3Gy} les plus faibles mais cela reste une tendance.

Enfin, la Figure 2E compare le nombre de cellules positives au Sft-PC et le pourcentage de cellules club en dose fractionnée de 3x50 Gy ou en dose unique de 90 Gy. Ces deux protocoles ont des BED_{3Gy} proches, de 2650 Gy (pour 3x50 Gy) et de 2790 Gy (pour 90 Gy dose unique). Ces deux protocoles, à BED_{3Gy} comparables, ont le même effet sur la prolifération réactionnelle des pneumocytes de type II et sur la perte des cellules club.

2. Modifications de l'expression génique de marqueurs cellulaires et inflammatoires après irradiation stéréotaxique pulmonaire fractionnée chez la souris

La Figure 3 montre les résultats de la mesure de l'expression génique de marqueurs des cellules épithéliales pulmonaires et de marqueurs inflammatoires impliqués dans la réaction à l'irradiation. Le *surfactant protein C* (Sft-PC) est exprimé spécifiquement par les pneumocytes de type II. Les cellules club, elles, expriment spécifiquement le *club cells secretory protein* (CCSP) et CYP2F2, un cytochrome P450 (Figure supplémentaire 1A). Les cellules ciliées de l'épithélium respiratoire expriment spécifiquement FOXJ1, un facteur de transcription impliqué dans la ciliogénèse (figure supplémentaire 1B). A 6 mois post-irradiation, l'expression du Sft-PC n'est pas affectée par l'irradiation fractionnée. Quelle que soit la dose par fraction, l'expression de l'ARNm du Sft-PC est proche des valeurs contrôles dans le patch lésionnel, le poumon ipsilatéral et le poumon droit (figure 3A). L'expression de l'ARNm du CCSP est diminuée après irradiation à 3x20 Gy et 3x50 Gy mais est proche des valeurs contrôles après irradiation à 3x28 et 3x40 Gy dans le patch lésionnel (Figure 3A). L'irradiation n'affecte pas l'expression du CCSP au niveau du poumon ipsilatéral, ni au niveau du poumon droit, excepté à 3x20 Gy. CYP2F2 présente le même profil d'expression génique (Figure supplémentaire 1A). L'expression de l'ARNm de FOXJ1 est augmentée dans le patch lésionnel 6 mois après irradiation à 3x28, 3x40 et 3x50 Gy. Au niveau du poumon ipsilatéral et du poumon droit, les valeurs d'expression géniques sont proches des valeurs contrôles (Figure supplémentaire 1B).

La figure 3B montre les changements d'expression génique pour les gènes EMR1 et IL-6 impliqués dans la réponse inflammatoire à l'irradiation. EMR1 (pour *EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*), aussi connu sous le nom de F4/80, est, chez la souris, un récepteur exprimé par les macrophages. L'expression de EMR1 est augmentée dans le patch, quelle que soit la dose par fraction : 20, 28, 40 ou 50 Gy, à 6 mois post-irradiation. Cette expression peut refléter une possible infiltration de macrophages au niveau du patch lésionnel. Au niveau du poumon ipsilatéral et du poumon droit, l'expression d'EMR1 est augmentée par l'irradiation en fraction de 40 et 50 Gy (Figure 3B). L'interleukine 6 (IL-6) est une cytokine impliquée dans la phase aiguë de la réponse inflammatoire. Son expression est fortement augmentée dans le patch lésionnel 6 mois après irradiation quel que soit le protocole. Au niveau du poumon ipsilatéral et du poumon droit, l'expression de l'IL-6 n'est augmentée qu'après irradiation à 3x40 et 3x50 Gy (Figure 3B). Cette expression d'IL-6 est le témoin d'une réponse inflammatoire post-irradiation persistante. La figure supplémentaire 2 présente les profils d'expression génique obtenus pour les autres gènes impliqués dans la réponse inflammatoire post-irradiation : CXCL2, une chimiokine sécrétée par les macrophages attirant les neutrophiles ; ENG ou l'endogline, récepteur du TGF-β impliqué dans l'angiogenèse,

l'interleukine 1 (IL-1) cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les macrophages, les monocytes, les fibroblastes et les cellules épithéliales entre autres et le *Tumor Necrosis Factor* (TNF) une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans la phase aiguë de l'inflammation exprimée par les macrophages et les fibroblastes. Le profil d'expression génique de CXCL2 suit celui d'EMR1 dans le patch lésionnel (Figure supplémentaire 2A). L'expression de l'ARNm de l'ENG est diminuée dans le patch lésionnel et le poumon ipsilatéral à 3x40 et 3x50 Gy (Figure supplémentaire 2B). L'expression de l'IL-1 est diminuée par rapport aux valeurs contrôles dans le poumon ipsilatéral et le poumon droit, quel que soit le fractionnement (Figure supplémentaire 2C). Quant au TNF, son expression est augmentée par rapport aux valeurs contrôles après irradiation à 3x20 Gy dans le patch lésionnel. Au niveau du poumon ipsilatéral, elle est augmentée après irradiation à 3x20 et 3x28 Gy (figure supplémentaire 2D).

3. Morphologie des cellules épithéliales et mésenchymateuses après irradiation fractionnée *in vitro*

Après la caractérisation de l'effet du fractionnement de la dose *in vivo*, nous avons analysé la réponse cellulaire en fonction de la dose par fraction. Quatre lignées cellulaires ont été sélectionnées, deux lignées épithéliales et deux lignées mésenchymateuses : les *small airway epithelial cells* (SAEC), les *normal human bronchial epithelial cells* (NHBE), les *human bronchial smooth muscle cells* (BSMC) et les *normal human lung fibroblasts* (NHLF). Ces lignées ont été sélectionnées pour leur implication dans la réponse à l'irradiation. Pour caractériser l'effet de la dose par fraction, cinq protocoles ont été choisis, avec différentes doses par fraction mais des BED_{3Gy} comparables, entre 105 et 108 Gy. Ces protocoles devraient donc avoir un effet biologique proche. Ces protocoles sont : 8x5 Gy, 4x7,5 Gy, 3x9 Gy, 2x11,3 Gy et 1x16,5 Gy. La Figure 4 présente l'aspect des tapis cellulaires des SAEC (Figure 4A), des NHBE (Figure 4B), des BSMC (Figure 4C) et des NHLF (Figure 4D), chez les contrôles (J7) ou 7 jours après la dernière fraction. Des changements dans la morphologie et la densité du tapis cellulaire sont à noter, avec des signes de souffrance cellulaire surtout pour les lignées épithéliales (grossissement de certaines cellules avec morphologie faisant penser à de la sénescence), une raréfaction des cellules BSMC et très peu de modification du tapis cellulaire pour les NHLF.

4. Les cellules épithéliales surexpriment des marqueurs mésenchymateux

L'expression de 44 gènes a été mesurée sur ces quatre lignées cellulaires après irradiation fractionnée à 8x5 Gy, 4x7,5 Gy, 3x9 Gy, 2x11,3 Gy ou 1x16,5 Gy et comparée à l'expression génique des contrôles. Le détail des changements est disponible en figure supplémentaire 3 pour les BSMC, en figure supplémentaire 4 pour les NHBE, en figure supplémentaire 5 pour les NHLF et en figure supplémentaire 6 pour les SAEC. L'analyse de l'expression génique a révélé que l'irradiation entraînait une augmentation de l'expression des gènes liés aux marqueurs mésenchymateux dans les lignées épithéliales : SAEC et NHBE. Les niveaux d'expression des ARNm d'ACTA2, de la fibronectine et de la vimentine sont augmentés par rapport aux contrôles dans les lignées NHBE et SAEC (Figure 5A et Figure 5B). ACTA2 est le gène codant pour l' α -smooth muscle actin (α -SMA), exprimée par les myofibroblastes. La fibronectine est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire, exprimée par les fibroblastes. La vimentine, de la famille des filaments intermédiaires du cytosquelette, est exprimée par les cellules mésenchymateuses. De manière étonnante, ces marqueurs mésenchymateux sont

sous-exprimés par les BSMC (Figure 5C) et exprimés de façon basale, proche des valeurs contrôles, par les NHLF (Figure 5D). De manière globale, l'expression du gène TAGLN, codant pour la *transgelin* (SM22 α), est diminuée, quel que soit le protocole d'irradiation et la lignée cellulaire, excepté pour les SAEC chez qui l'expression est augmentée. La *transgelin* est un marqueur mésechymateux exprimé par les fibroblastes et les cellules musculaires lisses. C'est un gène suppresseur de tumeur, marqueur de la sénescence, mais également un marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Enfin, l'expression de la *serpine1*, marqueur de sénescence et impliqué dans l'EMT, est également augmentée dans les lignées épithéliales NHBE et SAEC (Figure 5 A et B).

5. Les cellules épithéliales surexpriment les gènes des collagènes

Une autre caractéristique de la transition épithélio-mésenchymateuse est la production de collagènes par les cellules épithéliales. La synthèse des collagènes est l'une des caractéristiques des cellules mésechymateuses, notamment les fibroblastes et les myofibroblastes. Nous avons donc sélectionné, dans nos 44 gènes, des gènes codant pour les collagènes : COL1A1, COL1A2 et COL3A1. Conformément à la surexpression des marqueurs mésechymateux, les lignées cellulaires épithéliales SAEC et NHBE surexpriment également les collagènes, sauf pour les SAEC exposés à 8x5 Gy (Figure 6A et B). L'expression de ces gènes est diminuée dans la lignée BSMC (figure 6C) et proche des valeurs contrôles dans la lignée cellulaire NHLF après irradiation (Figure 6D).

Les quatre lignées cellulaires ont également surexprimé les marqueurs de sénescence comme p21 et p16 et les marqueurs d'arrêt du cycle cellulaire comme CDK1 et *lamine B1* (figures supplémentaires 3 à 6), en réponse à l'exposition aux rayonnements ionisants.

Globalement, et en accord avec des valeurs de BED_{3Gy} similaires, tous les protocoles testés semblent avoir des effets similaires sur les cellules étudiées, dans la limite des mesures que nous avons effectuées.

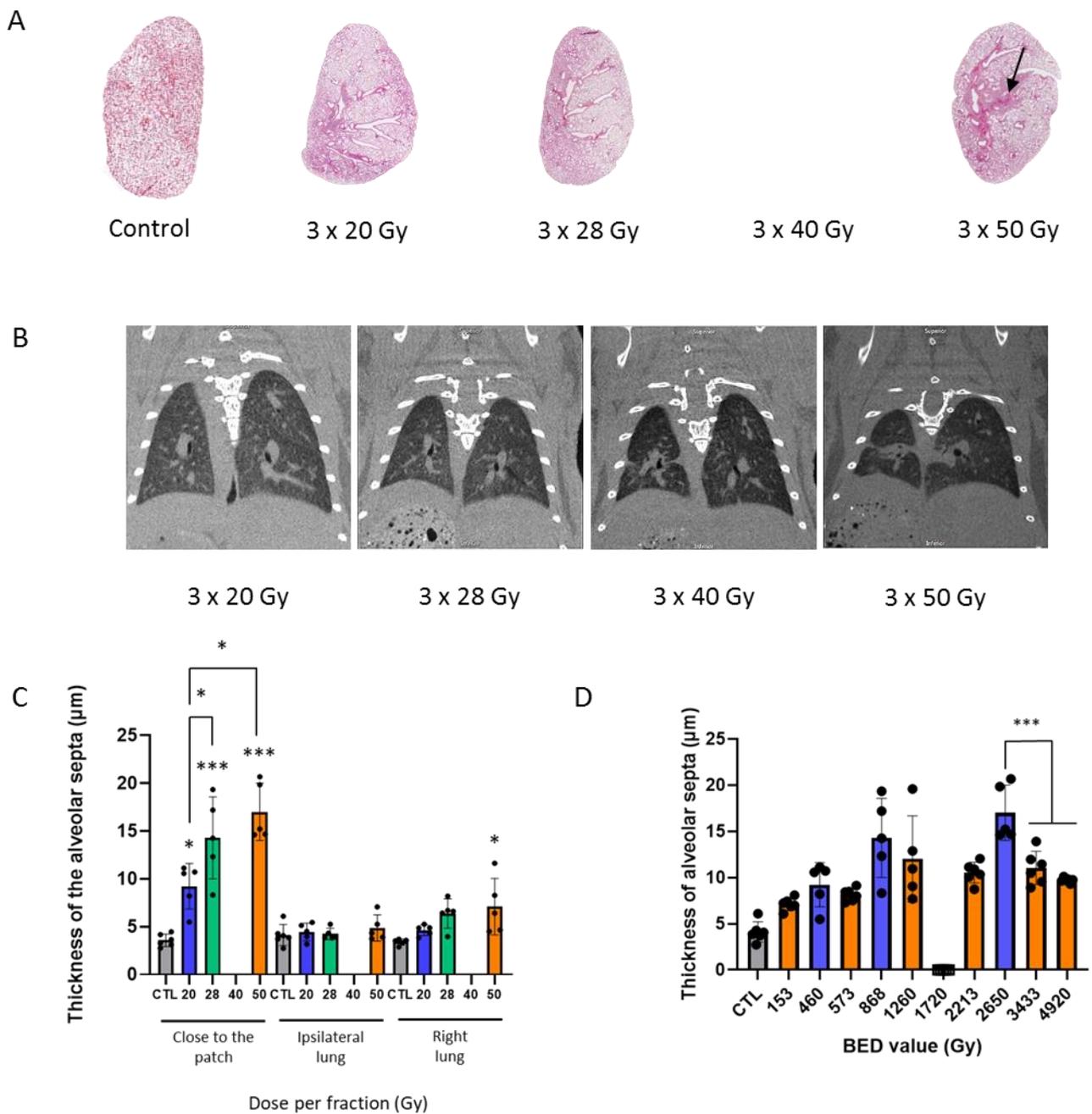


Figure 1: Dommages pulmonaires obtenus 6 mois après exposition à trois fractions de 20, 28, 40 ou 50 Gy. A: cartographies des poumons gauches contrôles et irradiés après coloration HES montrant un patch lésionnel après 3x50 Gy (flèche). B: images micro-CT montrant une opacification du tissu pulmonaire après des fractions de 40 et 50 Gy (flèches). C: Epaisseur des septa alvéolaires chez les animaux contrôles et irradiés mesurés proche du patch, dans le poumon ipsilatéral et le poumon droit. D: Epaisseur des septa alvéolaires en fonction de la valeur de la BED_{3Gy} de protocoles en dose unique ou en dose fractionnée. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. N=6 par point.

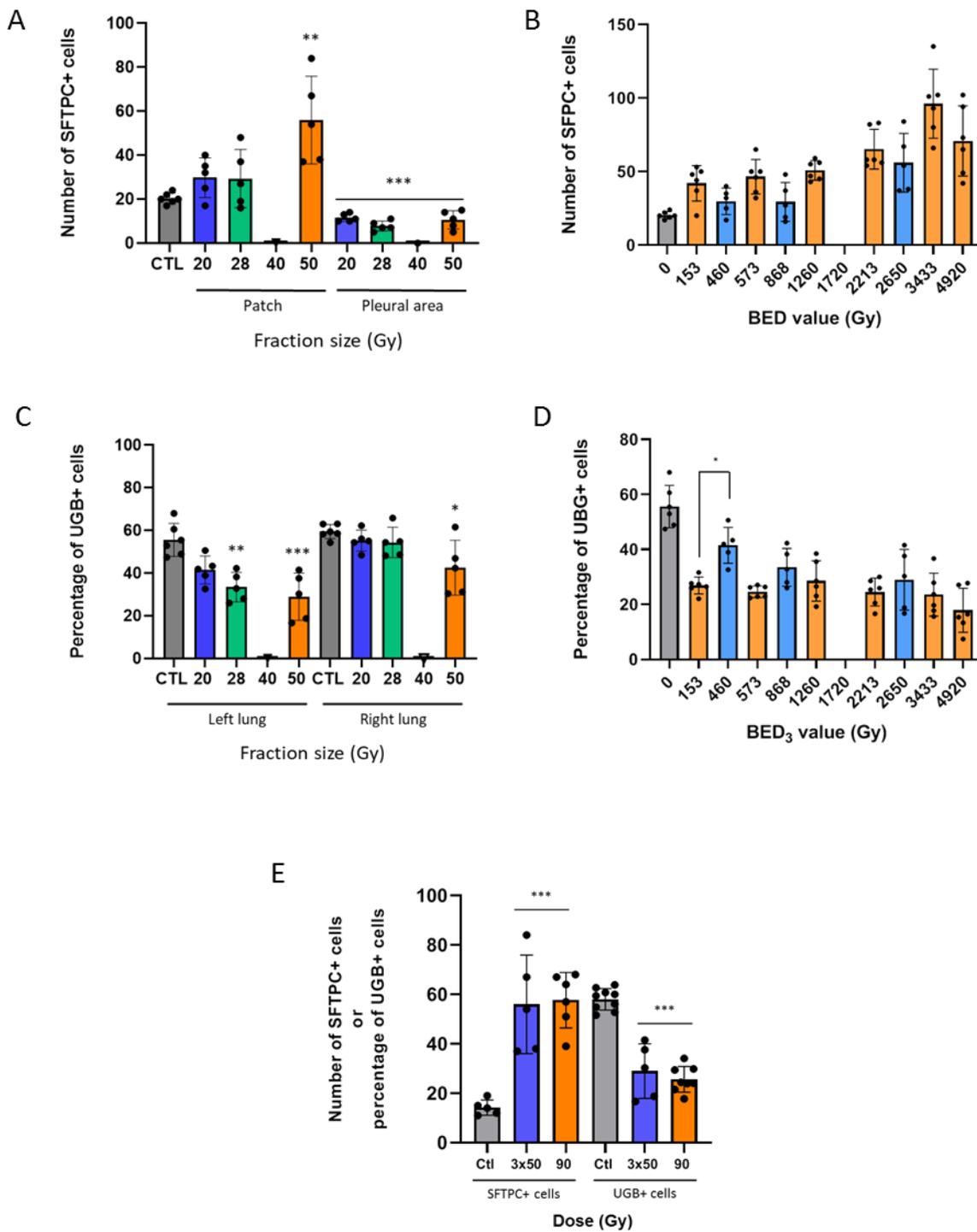
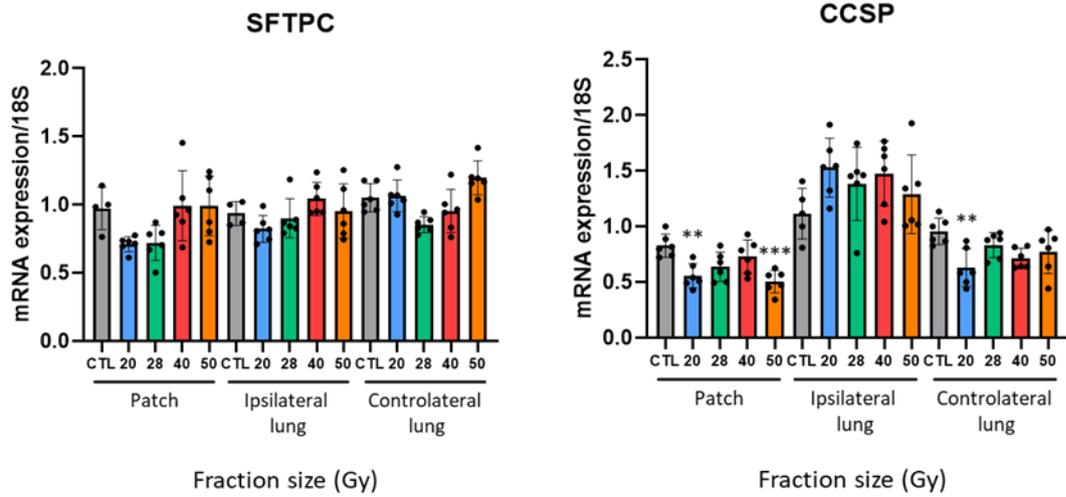


Figure 2: Quantification des pneumocytes de type II et des cellules club 6 mois après irradiation fractionnée. A: Nombre de pneumocytes de type II (SFTPC+) dans les poumons contrôles et irradiés, au niveau du patch irradié et de la zone pleurale (loin du patch). B: Nombre de pneumocytes de type II (SFTPC+) en fonction de la valeur de la BED_{3Gy} associée aux protocoles en dose unique et en dose fractionnée. C: Pourcentage de cellules club (UGB+) dans les poumons contrôles et irradiés, au niveau du patch irradié et de la zone pleurale (loin du patch). D: Pourcentage de cellules club (UGB+) en fonction de la valeur de la BED_{3Gy} associée aux protocoles en dose unique et en dose fractionnée. E: Nombre de pneumocytes de type II et de cellules club dans le patch lésionnel après irradiation à 3x50 Gy et à 90 Gy dose unique. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. N=6 par point.

A



B

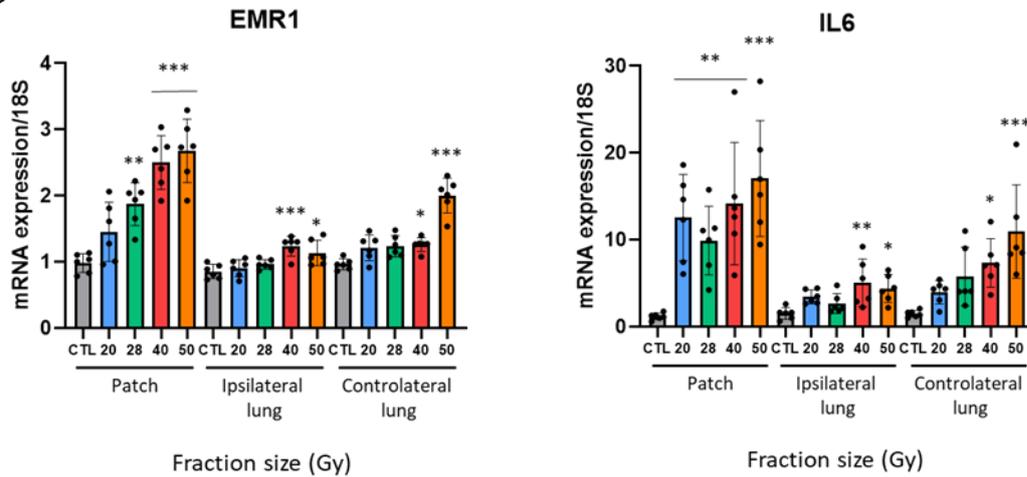


Figure 3: Modifications de l'expression génique 6 mois après irradiation fractionnée. A: Exemples de modifications de l'expression génique de gènes marqueurs des pneumocytes de type II (SFTPC, à gauche) et des cellules club (CCSP, à droite) mesurés dans le patch lésionnel et les poumons ipsilatéral et contralatéral par rapport aux tissus pulmonaires contrôles après différents protocoles d'irradiation fractionnée. B: Modifications de l'expression génique du gène EMR1 (marqueur des macrophages) et de l'IL-6 (marqueur de l'inflammation) mesurés dans le patch lésionnel et les poumons ipsilatéral et contralatéral par rapport aux tissus pulmonaires contrôles après différents protocoles d'irradiation fractionnée. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. N=6 par point.

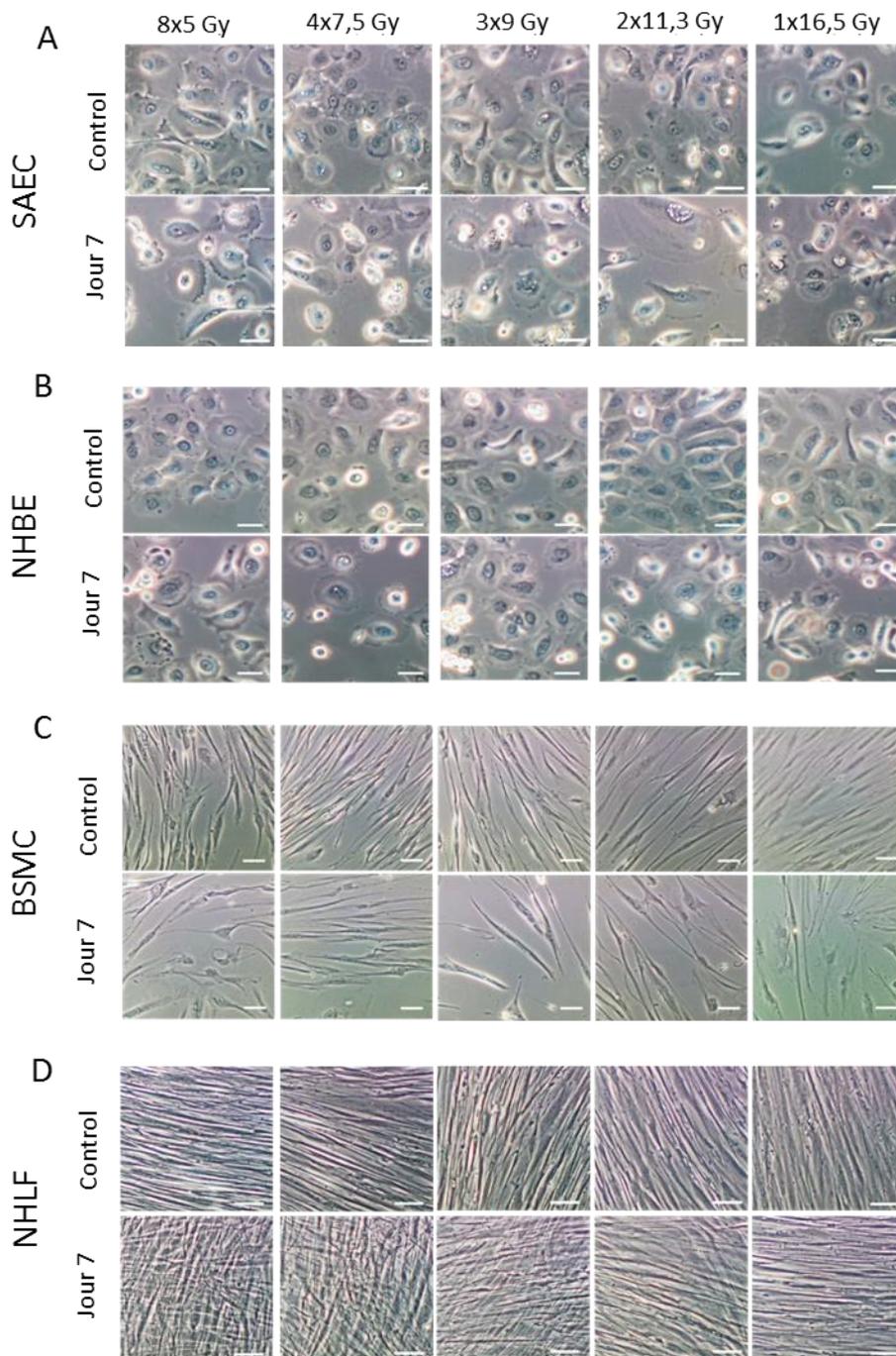


Figure 4: Images représentatives de l'aspect des tapis cellulaires non irradiés ou 7 jours après la dernière fraction de différents protocoles d'irradiation (8x5 Gy, 4x7,5 Gy, 3x9 Gy, 2x11,3 Gy ou 1x16,5 Gy). A: SAEC, human Small Airway Epithelial Cells. B: NHBE: Normal Human Bronchial Epithelial cells. C: BSMC: human Bronchial Smooth Muscle Cells. D: NHLF: Normal Human Lung Fibroblasts. Microscopie optique, objectif x10.

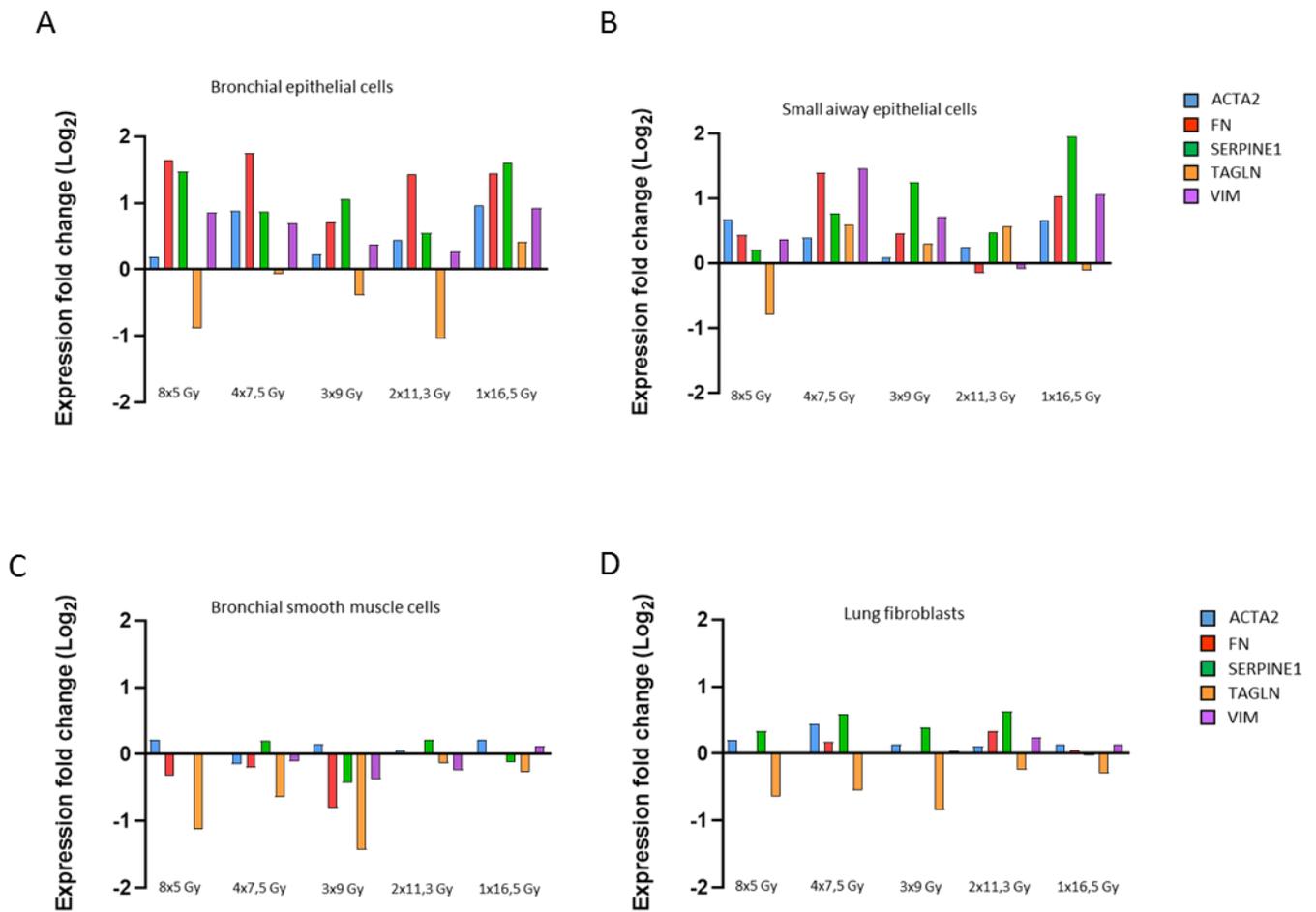


Figure 5: L'irradiation induit la surexpression de marqueurs mésenchymateux par les cellules épithéliales pulmonaires. Modifications de l'expression de différents gènes (fold changes exprimés en Log₂) impliqués dans la transition endothélio-mésenchymateuse et de marqueurs mésenchymateux par les différents types cellulaires pulmonaires 7 jours après la dernière fraction des différents protocoles d'irradiation utilisés. A: Bronchial epithelial cells. B: Small airways epithelial cells. C: Bronchial smooth muscle cells. D: Lung fibroblasts.

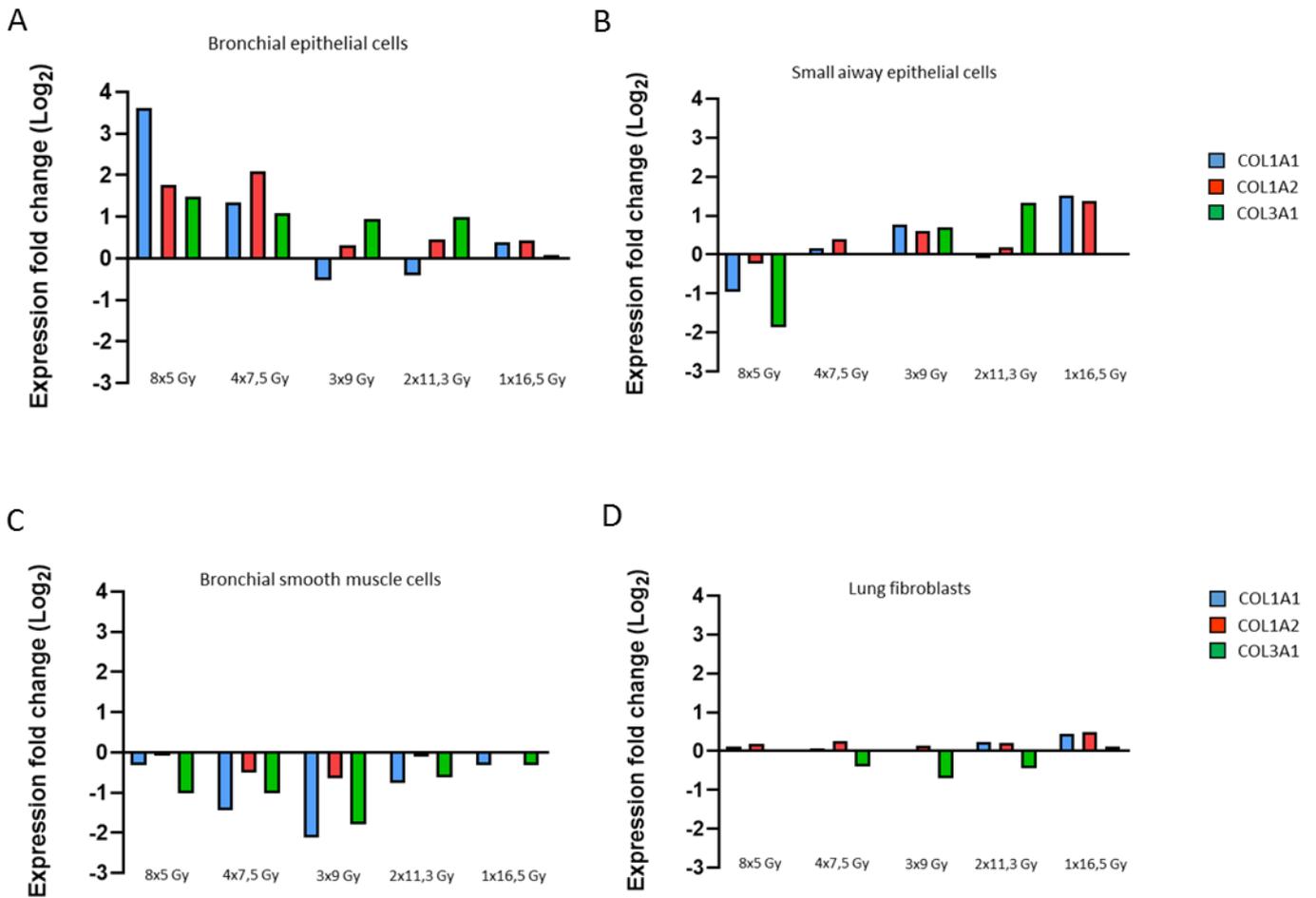


Figure 6: L'irradiation induit la surexpression des gènes codant pour les collagènes 1A1, 1A2 et 3A1 par les cellules épithéliales pulmonaires. Modifications de l'expression de différents gènes (fold changes exprimés en Log2) codant pour des collagènes par les différents types cellulaires pulmonaires 7 jours après la dernière fraction des différents protocoles d'irradiation utilisés. A: Bronchial epithelial cells. B: Small airways epithelial cells. C: Bronchial smooth muscle cells. D: Lung fibroblasts.

Figures supplémentaires

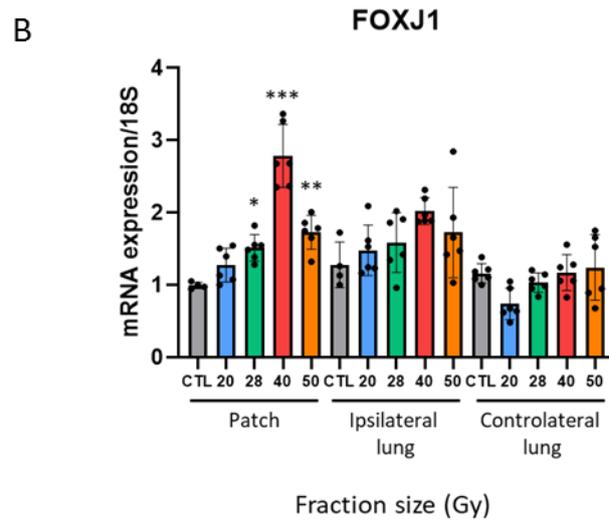
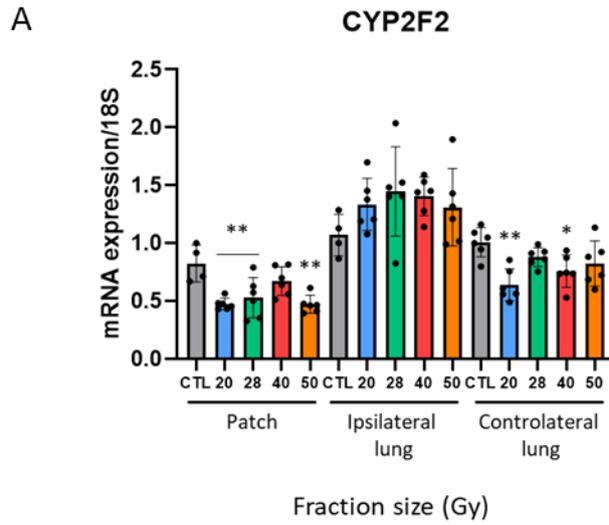


Figure supplémentaire 1: Modifications de l'expression génique de CYP2F2, marqueur des cellules club, et de FOXJ1, marqueur des cellules ciliées 6 mois après irradiation fractionnée, mesurées au sein du patch lésionnel, dans le poumon ipsilatéral et dans le poumon controlatéral. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. N=6 par groupe.

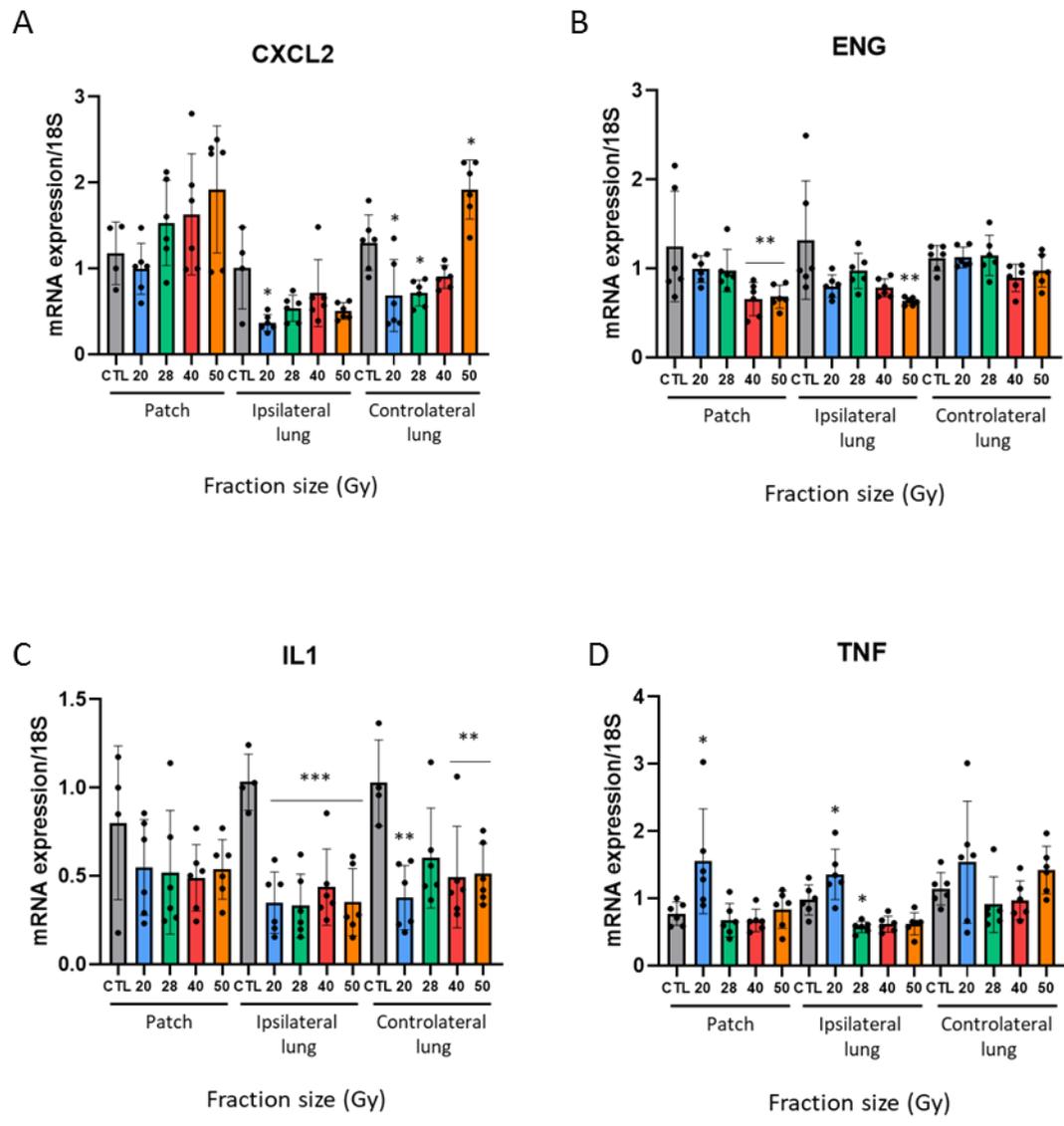


Figure supplémentaire 2: Modifications de l'expression génique de différents marqueurs inflammatoires 6 mois après irradiation fractionnée, mesurées au sein du patch lésionnel, dans le poumon ipsilatéral et dans le poumon controlatéral. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. N=6 par groupe.

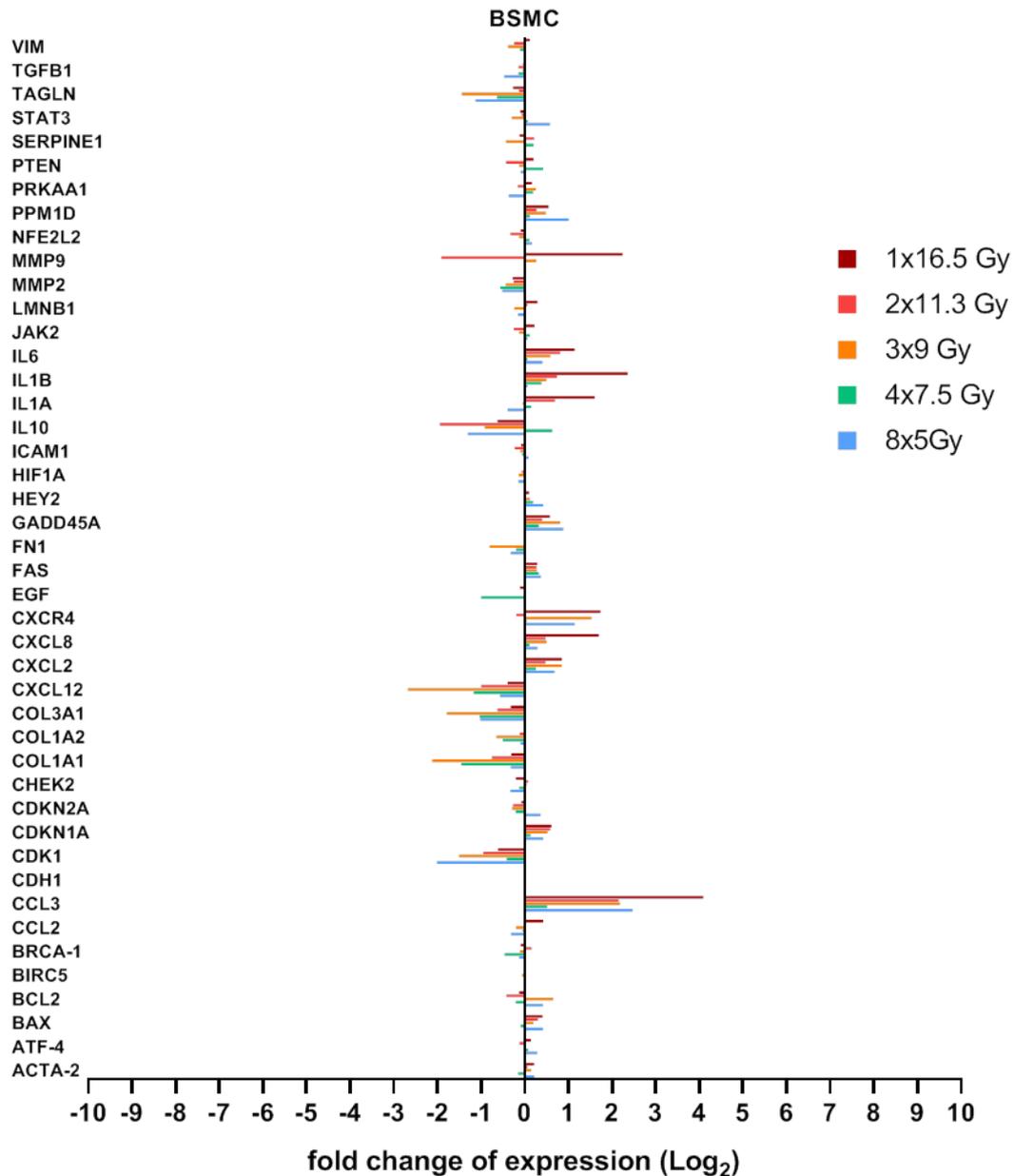


Figure supplémentaire 3: Human bronchial smooth muscle cells: Modifications de l'expression génique des 44 gènes choisis (inflammation, cycle cellulaire, marqueurs du mésenchyme, collagènes, matrice extra cellulaire) 7 jours après exposition à la dernière fraction de différents protocoles de fractionnement par rapport à des cellules non irradiées. Les fold changes sont exprimés en Log₂ pour plus de lisibilité. Les data sont issues d'analyses d'expression par le logiciel DATA ASSIST. Les données sont représentatives d'expérimentations réalisées en triplicates.

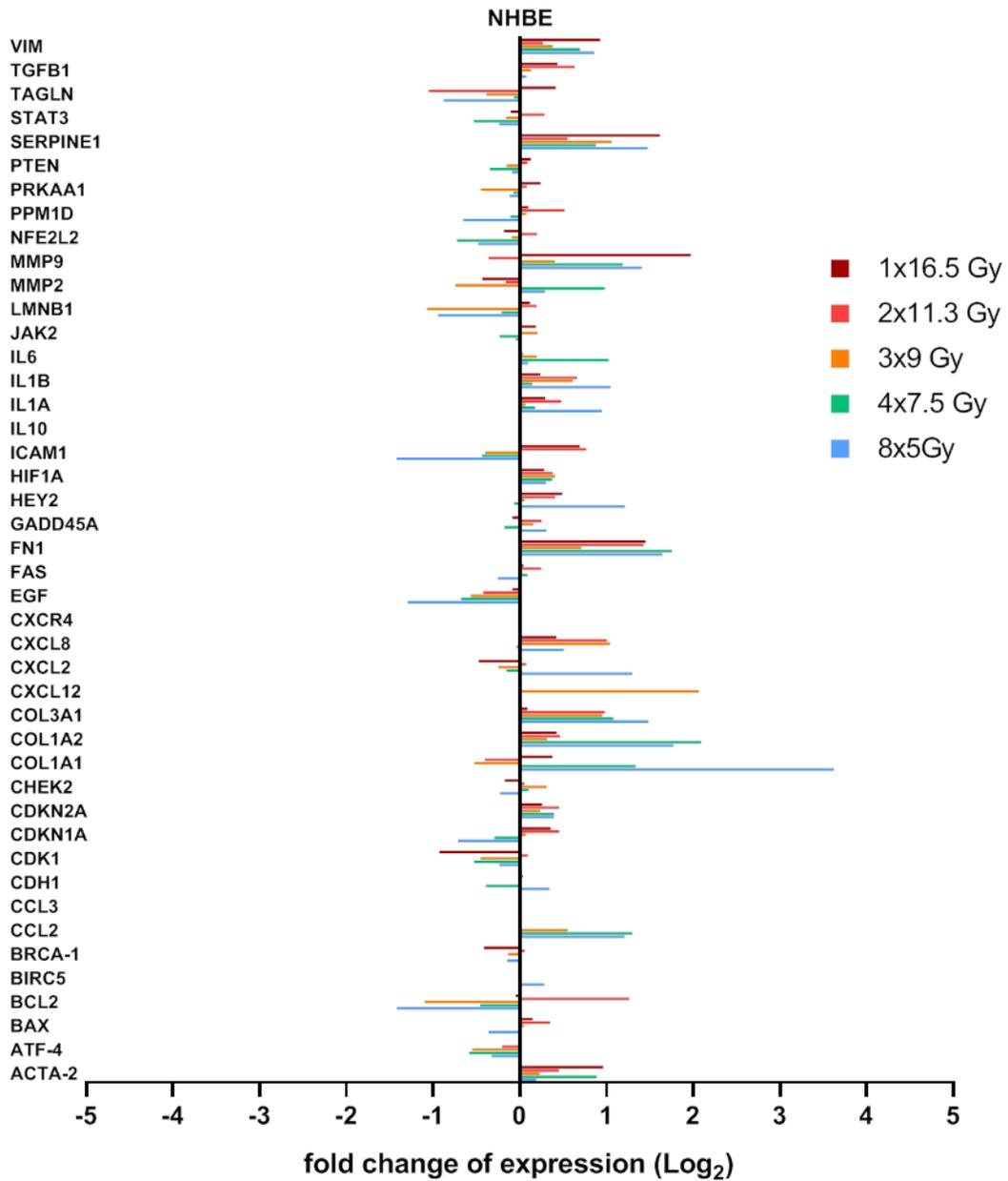


Figure supplémentaire 4: Normal human bronchial epithelial cells: Modifications de l'expression génique des 44 gènes choisis (inflammation, cycle cellulaire, marqueurs du mésenchyme, collagènes, matrice extra cellulaire) 7 jours après exposition à la dernière fraction de différents protocoles de fractionnement par rapport à des cellules non irradiées. Les fold changes sont exprimés en Log₂ pour plus de lisibilité. Les data sont issues d'analyses d'expression par le logiciel DATA ASSIST. Les données sont représentatives d'expérimentations réalisées en triplicates.

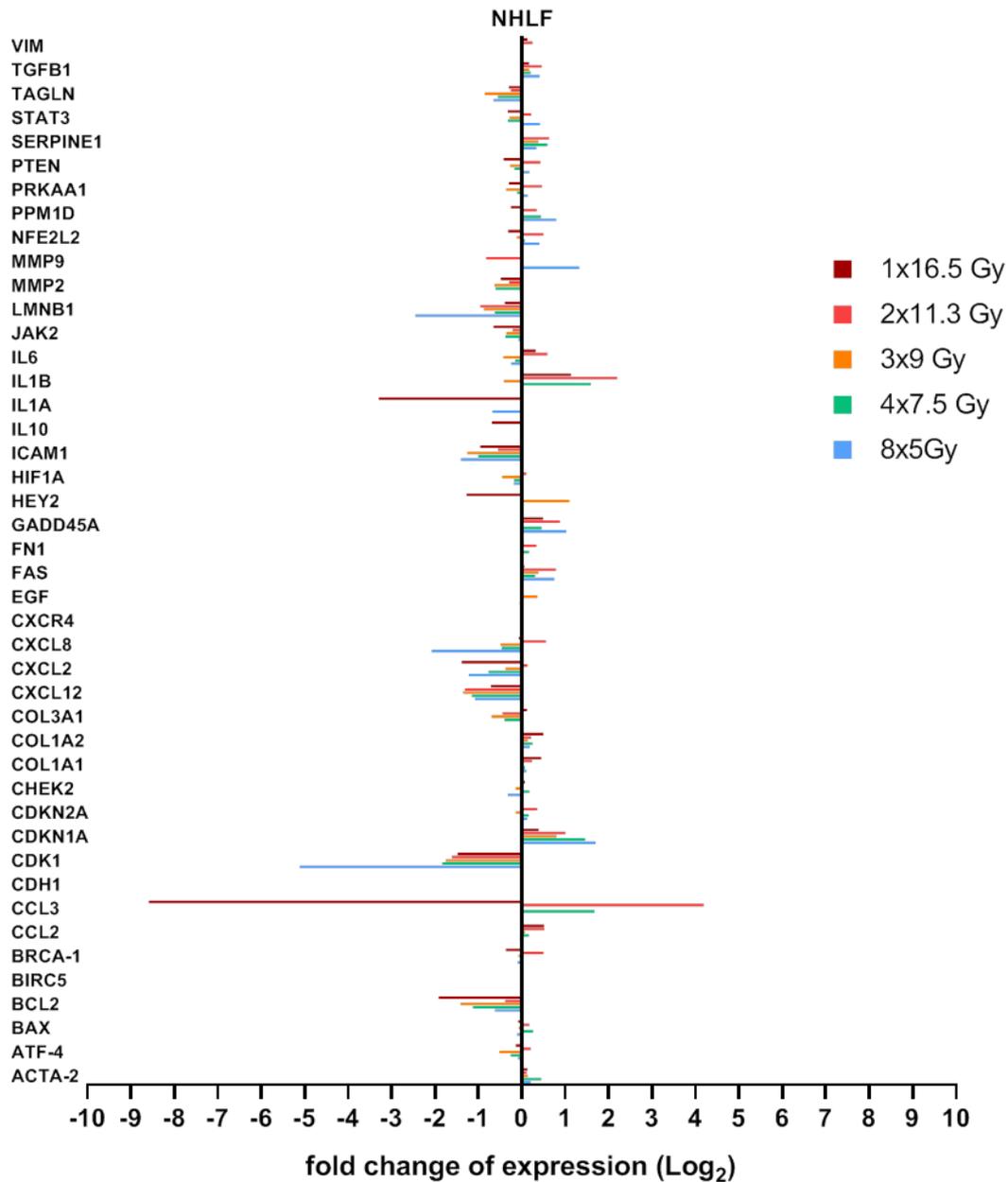


Figure supplémentaire 5: Normal human lung fibroblasts: Modifications de l'expression génique des 44 gènes choisis (inflammation, cycle cellulaire, marqueurs du mésenchyme, collagènes, matrice extra cellulaire) 7 jours après exposition à la dernière fraction de différents protocoles de fractionnement par rapport à des cellules non irradiées. Les fold changes sont exprimés en Log₂ pour plus de lisibilité. Les data sont issues d'analyses d'expression par le logiciel DATA ASSIST. Les données sont représentatives d'expérimentations réalisées en triplicates.

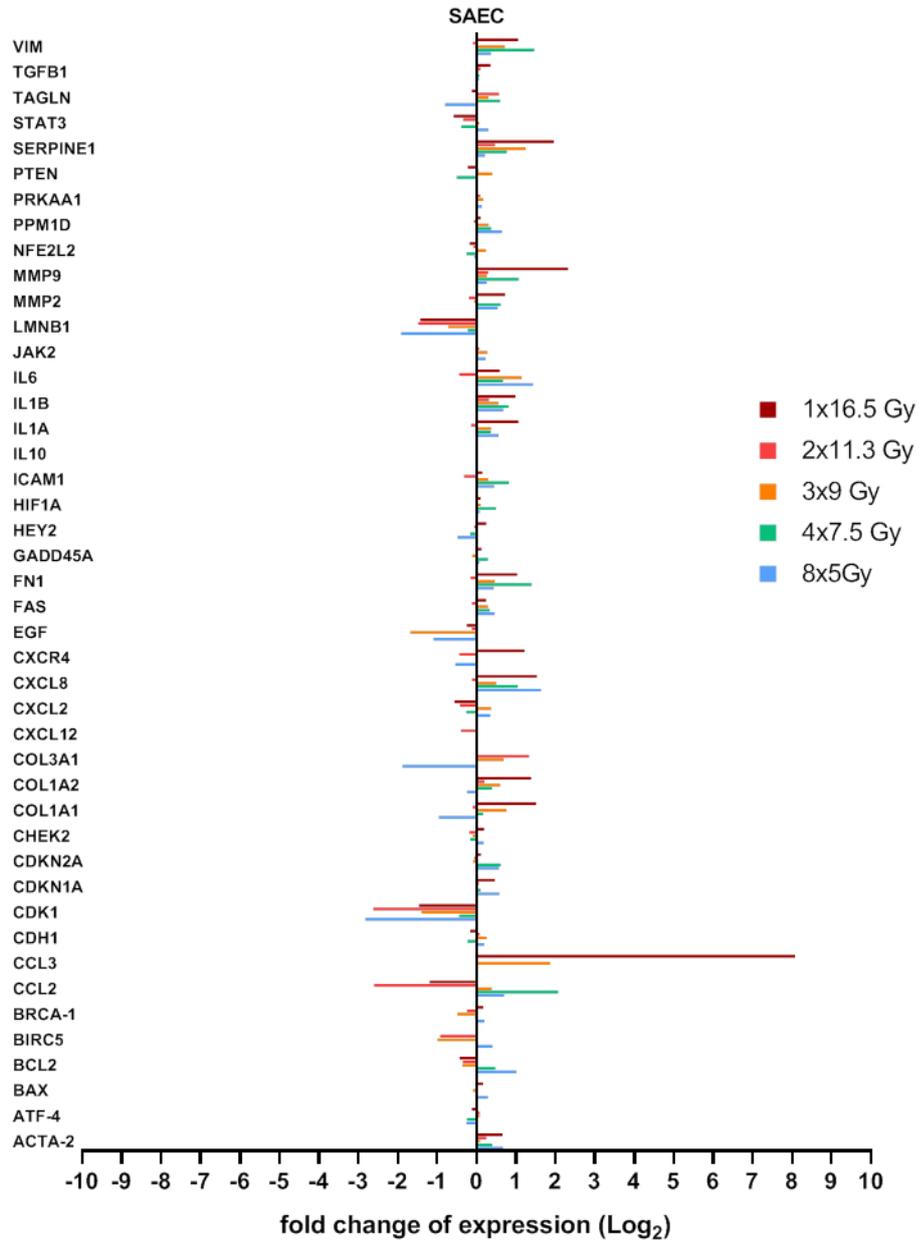


Figure supplémentaire 6: Human small airways epithelial cells: Modifications de l'expression génique des 44 gènes choisis (inflammation, cycle cellulaire, marqueurs du mésenchyme, collagènes, matrice extra cellulaire) 7 jours après exposition à la dernière fraction de différents protocoles de fractionnement par rapport à des cellules non irradiées. Les fold changes sont exprimés en Log₂ pour plus de lisibilité. Les data sont issues d'analyses d'expression par le logiciel DATA ASSIST. Les données sont représentatives d'expérimentations réalisées en triplicates.

Discussion & perspectives

Avant-propos

En 2017, l'Institut National du Cancer a recensé près de 400 000 nouveaux cas de cancer. Parmi ces nouveaux cas de cancer, la moitié seront traités par radiothérapie, seule ou en association avec une chirurgie, une chimiothérapie, une thérapie ciblée ou une immunothérapie. Parmi les nouveaux cas recensés en 2017, près de 42 000 étaient des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBNPC), qui représentent 85% des cas de cancer broncho-pulmonaire. Lorsqu'un CBNPC de stade précoce est diagnostiqué (T1 ou T2, sans invasion des ganglions, ni métastases, avec un volume tumoral assimilé à une sphère de moins de 7 cm de diamètre), la première intention reste la chirurgie. Cette chirurgie consiste en une résection lobaire ou infralobaire par thoracotomie ou chirurgie mini-invasive. Depuis une dizaine d'années la radiothérapie stéréotaxique est une alternative thérapeutique proposée aux patients inopérables ou refusant la chirurgie. La radiothérapie stéréotaxique pour des localisations extracrâniennes a été développée à partir des années 1990. C'est une technique de pointe qui consiste à irradier de très petits volumes grâce à la convergence de mini-faisceaux au centre de la cible. C'est une technique guidée par l'image CBCT, pour le ciblage et le repositionnement du patient. Son avantage majeur est la décroissance de dose rapide en dehors du volume cible. L'utilisation de doses dites ablatives, allant de 6 à 20 Gy par fraction, est alors possible. Globalement, la radiothérapie stéréotaxique est très efficace en clinique et c'est une bonne alternative thérapeutique pour les patients inopérables atteints d'un CBNPC de stade précoce. Le contrôle tumoral obtenu est bon : de 80 à 95% selon les études^{60,104,105}. Ces bons résultats cliniques encouragent l'augmentation de l'utilisation de la radiothérapie stéréotaxique, malgré le manque de recul sur le développement des effets secondaires. L'amélioration technique et balistique apportée par le développement de la radiothérapie stéréotaxique permet de diminuer le volume de tissu sain irradié. Les patients développent tout de même des effets secondaires qui se traduisent par des pneumopathies radiques précoces et des fibroses pulmonaires radio-induites tardives, comme nous l'avons vu au chapitre 4, section 6. Pourtant, le poumon est un bon candidat pour la radiothérapie stéréotaxique : son organisation tissulaire en unités fonctionnelles indépendantes, ou organisation en parallèle, lui permet de supporter des « points chauds », c'est-à-dire de fortes doses sur de petits volumes.

Ce qu'il faut bien comprendre ici, c'est que la pratique clinique précède les connaissances radiobiologiques. En effet, devant l'efficacité de la radiothérapie stéréotaxique, celle-ci est de plus en plus utilisée et concerne donc de plus en plus de patients. Toutefois, il y a un manque crucial de données radiobiologiques aux fortes doses par fraction. Il y a notamment très peu

de données précliniques. Comme nous l'avons vu au chapitre 6, l'hypofractionnement peut avoir de lourdes conséquences sur les tissus sains à réponse tardive, d'où l'importance primordiale d'acquérir des données radiobiologiques et radiopathologiques aux fortes doses par fraction. L'acquisition de ces données précliniques faisait face, jusqu'à il y a très peu de temps, à un verrou technologique qui a pu sauter grâce à la mise sur le marché d'appareils conçus pour l'irradiation du petit animal, équipés d'un système de planification de traitement et capables de délivrer des minifaisceaux avec une précision submillimétrique. Ainsi, avec l'acquisition du *Small Animal Radiation Research Platform* (SARRP), le laboratoire a pu mettre en place un modèle préclinique d'irradiation stéréotaxique pulmonaire unique au monde, en arc-thérapie chez la souris.

L'objectif de ma thèse a donc été d'acquérir *in vivo* des données originales en radiopathologie pulmonaire grâce à notre modèle préclinique d'irradiation stéréotaxique pulmonaire, chez la souris. *In vitro*, l'objectif a été de mettre en évidence certaines spécificités de la radiobiologie des doses ablatives.

La partie *in vivo* de mon travail de thèse a consisté à acquérir des données radiopathologiques en prenant en compte, dans un premier temps, l'impact du volume d'irradiation grâce à l'utilisation de 4 collimateurs : 1 mm de diamètre, 3x3 mm², 7x7 mm² et 10x10 mm², pour une dose unique de 90 Gy. Puis l'effet de la dose a été étudié avec le collimateur 3x3 mm² et une gamme de doses uniques allant de 20 à 120 Gy. Pour finir, l'étude de l'impact du fractionnement de la dose a également été réalisée avec le collimateur 3x3 mm² et des protocoles délivrés en 3 fractions de 20, 28, 40 ou 50 Gy. Pour la partie *in vitro* de mon travail de thèse, le but a été de déterminer la réponse cellulaire aux fortes doses par fraction. Pour cela, différentes lignées cellulaires pulmonaires ont été irradiées selon cinq protocoles d'irradiation fractionnée avec des doses par fraction variables mais une Biological Effective Dose (BED) constante. Une carte transcriptomique rassemblant 44 gènes a été construite afin de permettre une cartographie de la réponse cellulaire aux fortes doses par fraction.

Ainsi, ce travail de thèse a permis de mettre en place un modèle d'irradiation préclinique en testant différents paramètres d'irradiation. Ceci a permis d'acquérir des données radiobiologiques et radiopathologiques sur l'impact du volume d'irradiation, de la dose totale, du fractionnement de la dose mais également sur les temps d'étude et d'apparition de la fibrose pulmonaire radio-induite. Cette étude descriptive permettra de structurer les choix de

collimateur, de dose, de fractionnement de la dose et de temps pour les études à venir sur l'irradiation stéréotaxique pulmonaire. Il y a toute une nouvelle radiobiologie, très peu connue, qui se met en place, concernant les petits volumes irradiés à de fortes doses. L'étude de cette nouvelle radiobiologie passe forcément par le développement d'un modèle préclinique approprié.

Pertinence de notre modèle d'irradiation stéréotaxique pulmonaire en arc-thérapie chez la souris

Le modèle murin d'irradiation pulmonaire le plus fréquemment retrouvé dans la littérature est le modèle d'irradiation en thorax entier, en dose unique de 12 à 20 Gy. Ce modèle a permis, entre autres, l'étude du développement des lésions pulmonaires radio-induites. L'irradiation du thorax est généralement réalisée avec un accélérateur linéaire de photons et d'électrons de basse énergie. La souche de souris la plus couramment utilisée pour cette modélisation des lésions pulmonaires radio-induites est la souche C57bl/6, notamment pour sa capacité à développer une fibrose pulmonaire radio-induite, même si le développement de la pneumopathie radique apparaît plus tardivement et à des doses plus élevées que pour d'autres souches²⁶⁵. Le modèle d'irradiation en thorax entier a permis aux radiobiologistes de mettre en lumière les différents processus physiopathologiques impliqués dans le développement des lésions pulmonaires radio-induites^{266,267}. Plusieurs équipes ont démontré que les dommages à l'ADN contribuaient à la dérégulation du processus de cicatrisation, à l'inflammation chronique ou encore la sénescence^{108,268-270}. D'autres ont mis en évidence les changements dans le profil de cytokines et de chimiokines sécrétées après irradiation^{93-97,271-273}. La déplétion des macrophages alvéolaires^{93,99,274-276}, le rôle du stress oxydatif^{108,270,277}, le rôle de la sénescence et le *senescence-associated secretory phenotype* (SASP)²⁷⁸⁻²⁸⁰, la perte des cellules club²⁸¹ et des pneumocytes de type II²⁸² ont aussi été mis en lumière grâce au modèle d'irradiation pulmonaire en thorax entier. Ce modèle a apporté beaucoup de connaissances radiobiologiques et radiopathologiques sur le développement des lésions pulmonaires radio-induites. Cependant, il a deux limites importantes : l'exposition du cœur et des gros vaisseaux et le fait que ce type d'irradiation ne reflète pas la réalité clinique. En effet, l'irradiation en thorax entier n'est pas une pratique appliquée aux patients. De plus, avec l'apparition de la radiothérapie stéréotaxique et l'augmentation du nombre de patients traités par cette modalité, il était nécessaire de développer un modèle préclinique plus pertinent. Le premier modèle d'irradiation stéréotaxique pulmonaire chez la souris a été mis en place par l'équipe Coréenne de Cho et al^{126,179,283-286}. Pour cela, ils ont mis au point un appareil d'irradiation du petit animal monté sur un irradiateur X-RAD 320 équipé d'un système de collimation (collimateurs de 1, 3 et 5 mm), d'un système d'imagerie et d'un lit où est positionné l'animal. Avec ce système, les animaux sont irradiés en faisceau unique dans la direction dorso-ventrale²⁸³. Cette installation permet d'effectuer des irradiations à haut débit de dose de 5,6 à 9,8 Gy/min, avec un faisceau de petite taille et une localisation précise de la cible. Pour cette première étude²⁸³, les animaux ont été irradiés à des doses de 40 et 100 Gy, 40 Gy étant une dose pouvant induire une réaction du parenchyme pulmonaire sans pour autant déclencher d'effets tardifs et 100 Gy assurant une réponse tardive. La dose de 100 Gy

développée avec un collimateur de 3 mm a déclenché une fibrose pulmonaire à 8 semaines post-irradiation (temps final de l'étude). Cependant, les animaux irradiés à cette dose avec le collimateur 5 mm sont décédés dans les 2 à 3 semaines suivant l'irradiation. L'une des limites de ce modèle est le risque élevé de toxicité à la peau étant donné la dose utilisée et l'irradiation réalisée en faisceau unique dorso-ventral. Dans leur étude, Cho et al n'ont cependant pas observé de toxicité cutanée de grade 3 ou plus : ils ont tout de même observé une alopecie radio-induite chez leurs animaux, correspondant à un grade 2. Pour faire suite à cette étude, ils ont décidé de s'intéresser aux temps précoces (jours 1 à 14 post-irradiation), après irradiation avec un collimateur de 3 mm et une dose de 90 Gy²⁸⁷. La dose de 90 Gy est en effet bien tolérée par les animaux et permet de développer une fibrose rapide. Ce choix de dose et de collimateur sera repris pour les études suivantes^{126,179,284-287}, complété par d'autres doses (20 Gy, 50 Gy) et d'autres collimateurs (1 mm, 2 mm, 5 mm, 7 mm). Kwon et al, en plus de l'alopecie déjà rapportée par Cho et al, ont observé une radionécrose cutanée chez leurs animaux, 2 à 3 semaines post-irradiation avec un collimateur de 3 mm et une dose de 90 Gy. Ces études sont des études à court terme, même si la dose administrée leur permet d'observer une fibrose rapide.

Au laboratoire, la mise en place d'un modèle préclinique d'irradiation stéréotaxique faisait face à un verrou technologique : ce dernier a sauté grâce à l'acquisition du SARRP, un irradiateur du petit animal, délivrant des mini-faisceaux au centre de la cible. Notre modèle préclinique d'irradiation stéréotaxique nous permet de nous rapprocher encore plus des pratiques d'irradiation en conditions stéréotaxiques réalisées en clinique. Le SARRP est associé à un scanner qui permet un guidage par l'image volumétrique 3D pour le ciblage et le repositionnement des animaux. L'image 3D de la souris acquise avant le traitement est transférée au logiciel de planification de traitement Muriplan®. Le logiciel Muriplan® est un logiciel semblable à ceux utilisés en clinique, adapté au SARRP et à la modélisation chez le petit animal. L'isocentre est alors positionné au centre du poumon gauche, le collimateur et la dose sélectionnés, l'angle de 240° pour l'arc thérapie est déterminé et adapté à chaque souris afin d'éviter au maximum le cœur. L'idéal pour éviter l'irradiation du cœur au maximum aurait été de cibler le poumon droit. Mais le poumon droit est composé de 3 lobes et le patch lésionnel se retrouve à cheval sur ces trois lobes (données observées au laboratoire), ce qui n'est pas optimal pour l'analyse histopathologique. C'est pourquoi le poumon gauche a été choisi comme cible, vu que celui-ci n'est composé que d'un seul lobe chez la souris. Ainsi l'irradiation induit une lésion dont les bords sont bien délimités, ce qui n'est pas possible

quand la lésion se trouve sur les 3 différents lobes du poumon droit. Le logiciel de planification de traitement calcule alors la distribution de la dose et le temps d'irradiation. Le logiciel Muriplan® nous fournit également les histogrammes dose/volume et les courbes isodoses : des données dosimétriques importantes nous permettant de nous assurer de la précision de l'irradiation mais également de calculer les doses moyennes reçues par les différentes structures en dehors du volume cible. D'ailleurs, le logiciel Muriplan® a permis de mesurer, à partir des images CBCT acquises avec le SARRP, le volume pulmonaire de la souris, ainsi que le volume pulmonaire irradié. Le volume pulmonaire d'une souris est d'environ 0,5 cm³, le volume irradié avec le collimateur 3x3 mm² est d'environ 0,021 cm³, soit près de 4% du volume pulmonaire de la souris. Chez l'Homme, les tumeurs traitées par radiothérapie stéréotaxique ont un volume tumoral assimilé à une sphère de moins de 7 cm de diamètre, représentant 1 à 4% du volume pulmonaire. Le logiciel de planification de traitement Muriplan® est donc un véritable atout pour notre modèle préclinique. Le modèle préclinique d'irradiation stéréotaxique pulmonaire de Cho et al ne possède pas un tel logiciel. Un autre avantage de notre modèle est le dépôt de la dose en arc-thérapie. En effet, l'une des limites du modèle de Cho et al est l'apparition d'une radionécrose cutanée et d'une alopecie quelques semaines après irradiation. Ceci est dû au fait que la dose est délivrée en un faisceau unique dorso-ventral, ainsi la peau et les muscles reçoivent également une dose de 90 Gy. L'arc-thérapie permet de diminuer la dose à la peau et aux muscles, évitant ainsi les toxicités, tout en délivrant au volume cible une dose fibrosante. L'arc-thérapie nous permet donc de mener des études à long terme, jusqu'à 12 mois post-irradiation avec les collimateurs 1 mm de diamètre et 3x3 mm², ce qui est totalement inédit.

Bien que plus pertinent cliniquement que le modèle de Cho et al de par son logiciel de planification de traitement et le dépôt de la dose en arc-thérapie, notre modèle d'irradiation stéréotaxique pulmonaire n'est cependant pas parfait. En effet, selon le collimateur, le dépôt de dose en dehors du volume cible peut être important. Le dépôt de la dose en dehors du volume cible est relativement faible avec le collimateur 1 mm de diamètre : d'après les histogrammes dose/volume, lors d'une irradiation centrée sur le poumon gauche avec le collimateur 1 mm de diamètre à une dose de 90 Gy, le poumon ipsilatéral reçoit une dose de 2,5 Gy, le poumon droit une dose de 0,7 Gy et le cœur une dose de 0,4 Gy. Cependant, ce collimateur ne permet pas d'observer de lésion au μ CT, ni de la fibrose pulmonaire radio-induite, même si une réaction du parenchyme pulmonaire est observée aux temps précoces. Lors d'une irradiation avec le collimateur 3x3 mm² à une dose de 90 Gy, la dose moyenne

délivrée au poumon ipsilatéral est de 19,2 Gy, la dose moyenne au poumon droit est de 6,8 Gy et celle au cœur de 3,7 Gy. La dose au poumon ipsilatéral notamment n'est pas négligeable. Même si cette dose déposée en dehors du volume cible n'entraîne pas de lésion à proprement parler, elle entraîne tout de même une réaction du parenchyme pulmonaire et notamment des pneumocytes de type II au niveau du poumon ipsilatéral et du poumon droit. Pour comparer ces doses moyennes avec une irradiation en thorax entier, une exposition à 15 Gy chez la souris induit l'apoptose de 28% des pneumocytes de type I, de 15% des pneumocytes de type II et de 11% des cellules endothéliales²⁸⁸. Almeida et al observent de la fibrose pulmonaire radio-induite 14 semaines après l'administration d'une dose unique de 12 Gy en thorax entier¹⁰¹. Zhou et al ont déterminé qu'une dose unique de 14,55 Gy induisait une fibrose de sévérité moyenne 24 semaines après irradiation en thorax entier²⁸⁹. Les doses administrées en hémithorax chez la souris sont du même ordre, allant de 12,5 Gy à 35 Gy²⁹⁰⁻²⁹². Le dépôt de dose en dehors du volume cible n'est donc pas négligeable. Il faut garder en tête que cette comparaison entre la dose déposée en dehors du volume cible dans notre modèle et la dose administrée en thorax entier ou en hémithorax est difficile. La dose de 19,2 Gy déposée en dehors du volume cible sur le poumon ipsilatéral est une dose moyenne. C'est la résultante de zones exposées à de fortes doses tout près du patch lésionnel et de zones beaucoup moins exposées quand on s'en éloigne: le dépôt de la dose est hétérogène, ce qui n'est pas le cas lors d'une irradiation hémithoracique ou en thorax entier. Ce dépôt de la dose en dehors du volume cible n'est pas un frein à l'étude des lésions pulmonaires radio-induites mais doit être pris en compte et ne doit pas être confondu avec un effet abscopal. Cette réaction du poumon ipsilatéral et du poumon droit peut-être due au dépôt de la dose en dehors du volume cible (en fonction de la dose et du volume d'irradiation) mais également à la présence du patch lésionnel et de la diffusion de sa réponse inflammatoire. En effet, après irradiation en conditions stéréotaxiques au collimateur 3x3 mm² à une dose de 90 Gy, une hépatisation globale du poumon cible à 14 jours post-irradiation a été observée par Lavigne et al²⁹³. Une telle hépatisation n'a jamais été rapportée dans la littérature. Une irradiation focale entraîne donc une réaction précoce très importante mais transitoire de l'ensemble du poumon ciblé. Il faut également garder à l'esprit que le recul clinique acquis sur les traitements thoraciques en conditions stéréotaxiques a permis de montrer que les grands volumes recevant une dose plus faible comme le V_{5Gy} est un facteur de risque pour le développement de la pneumopathie radique et de la fibrose pulmonaire radio-induite, comme abordé au chapitre 5 section 3.

Du et al²⁹⁴ ont également mis au point un modèle préclinique d'irradiation thoracique grâce au SARRP. Celui-ci est aussi associé au logiciel de planification de traitement Muriplan®. Leur modèle préclinique a pour but de traiter des tumeurs pulmonaires spontanées dans une lignée de souris transgéniques mutées dans le gène *Kras*. Leur planification de traitement consiste en 7 à 10 faisceaux de 5x5 mm² non superposés, non opposés, avec au moins 3 faisceaux non coplanaires. Ils ont choisi cette configuration pour se rapprocher le plus possible de ce qui se fait en clinique chez l'Homme²⁹⁴. Cependant, le collimateur 5x5 mm² irradie un volume plus important que ce qui est recommandé chez l'Homme (volume tumoral assimilé à une sphère de moins de 7 cm de diamètre, représentant 1 à 4% du volume pulmonaire) : en effet ce collimateur irradie 0,0982 cm³ soit 19,64% du volume pulmonaire d'une souris. Pourtant les tumeurs qu'ils traitent font 2 à 3 mm de diamètre, soit une sphère d'un volume de 0,01 cm³. Les marges autour du GTV sont donc très importantes. De plus, une marge de 1 à 2 mm est ajoutée pour obtenir le PTV. Ainsi, dans cette étude, le volume du PTV est compris entre 0,0868 cm³ et 0,4369 cm³, soit entre 17,36% et 87,38% du volume pulmonaire de la souris. Ces volumes sont très importants et surtout beaucoup plus importants que les volumes utilisés en clinique chez l'Homme. Ils ont administré trois fractions de 20 Gy sur la tumeur, qui est l'un des protocoles les plus sévères administrés en radiothérapie stéréotaxique thoracique chez l'Homme. L'isocentre est placé au centre de la tumeur et le collimateur 5x5 mm² permet d'englober le volume tumoral. Une seule tumeur périphérique a été sélectionnée par souris pour être traitée. Du et al ont pris soin d'éviter l'irradiation des organes à risque comme la moelle épinière, l'œsophage, la trachée, le cœur et les gros vaisseaux en suivant les recommandations RTOG 0813²⁹⁴. Ceci est possible grâce au CBCT du SARRP associé au logiciel de planification de traitement. Ils ont ainsi prouvé que la modélisation de la réponse tumorale à l'irradiation stéréotaxique thoracique est possible. De plus, ils réussissent à diminuer le taux de prolifération et à induire l'apoptose des cellules cancéreuses avec trois fractions de 20 Gy. Cependant leur étude s'arrête à 8 semaines post-irradiation : les effets aux tissus sains n'ont pas le temps de se développer, et il n'est pas certain que le contrôle tumoral soit atteint avec ce protocole. Ils ne se sont d'ailleurs pas intéressés à la réaction du tissu sain pulmonaire, pourtant responsable du développement des effets secondaires. Cependant, cette modélisation de l'irradiation stéréotaxique thoracique réalisée avec le SARRP est la première de son genre.

Toujours dans le cadre d'une étude de la réponse tumorale à l'irradiation et cette fois en association avec un inhibiteur d'*Ataxia Telangiectasia Related-3* (ATR), Dunne et al ont

également utilisé le SARRP²⁹⁵. Cette étude s'est intéressée à la réaction du tissu sain pulmonaire à l'irradiation stéréotaxique associée à l'inhibiteur d'ATR : ils ont réalisé des irradiations en faisceaux parallèles opposés avec le collimateur 5x5 mm² afin d'étudier l'influence de l'inhibiteur d'ATR sur la fibrose pulmonaire radio-induite. Pour cela ils ont administré soit une dose unique de 20 Gy soit trois fractions de 6,67 Gy. Grâce au CBCT embarqué du SARRP, ils ont suivi le développement des lésions en mesurant les changements de densité du tissu pulmonaire jusqu'à 26 semaines (soit 6 mois). Ils ont observé de la fibrose avec les deux protocoles testés, bien que celle-ci soit extrêmement discrète après trois fractions de 6,67 Gy à 26 semaines post-irradiation. Le changement de densité du tissu pulmonaire observé sur l'image scanner est d'ailleurs plutôt attribué à un épanchement pleural²⁹⁵. Le collimateur 5x5 mm² permet donc d'observer de la fibrose pulmonaire radio-induite, après une dose unique de 20 Gy, 26 semaines post-irradiation, ce qui n'est pas possible avec le collimateur 3x3 mm² pour la même dose. Ceci met bien en avant l'impact du volume d'irradiation sur le développement de la fibrose, que nous allons aborder dans la section suivante.

Globalement, notre modélisation de l'irradiation stéréotaxique pulmonaire, possible grâce au SARRP, nous permet d'obtenir une configuration relativement proche des configurations cliniques. Cependant, le SARRP utilise des énergies de l'ordre du kV, or en clinique, les LINAC utilisent des énergies de l'ordre du MV. Mais il n'existe pas à ce jour d'installation permettant de réaliser des irradiations précliniques en conditions stéréotaxiques en mégavoltage. Le SARRP permet de reproduire des volumes irradiés proches de ceux utilisés en clinique chez le petit animal. L'hétérogénéité du dépôt de la dose au sein de l'organe est également semblable aux observations faites en clinique. Les études cliniques ont montré que plus le volume de tissu sain recevant une certaine dose est important, plus le risque de pneumopathie radique est grand. Parmi ces volumes, le volume recevant 5 Gy (V_{5Gy})^{148,153,154}, le volume recevant 10 Gy (V_{10Gy})¹⁴⁷ ou encore le volume recevant 20 Gy (V_{20Gy})^{147,153-155,296,297} sont des facteurs prédictifs de pneumopathie radique.

Effet du volume d'irradiation

Comme abordé dans le chapitre 4, le poumon est capable de supporter de fortes doses de rayonnements ionisants sur de petits volumes grâce à son organisation en sous-unités fonctionnelles indépendantes les unes des autres, dite organisation en parallèle. Les lobules pulmonaires fonctionnent indépendamment les uns des autres et ne sont pas impactés par la dysfonction ou la perte d'un ou d'un petit nombre de lobules. De ce fait, le poumon sera sensible au volume irradié, mais pourra supporter de fortes doses sur de petits volumes. Mais dès lors que le tissu pulmonaire est irradié, il existe un risque pour le patient de développer une pneumopathie radique et/ou une fibrose pulmonaire radio-induite. Nous avons choisi pour étudier l'effet du volume irradié la dose unique de 90 Gy qui est la dose la mieux décrite dans la bibliographie et avec laquelle nous avons le plus de recul au LRMed.

La première observation de cette étude de l'impact du volume d'irradiation concerne la survie des animaux. En effet, l'exposition à une dose unique de 90 Gy avec les collimateurs 7x7 mm² et 10x10 mm² a sérieusement compromis la survie des animaux. Les animaux irradiés au collimateur 7x7 mm² ont dû être euthanasiés à 2 mois post-irradiation et ceux irradiés au collimateur 10x10 mm² à 21 jours post-irradiation. L'analyse anatomopathologique a révélé la présence chez ces animaux d'une bronchiolite oblitérante, une inflammation extrêmement sévère des bronches et des bronchioles. Cette inflammation se caractérise par l'obstruction des bronches et des bronchioles par un amas fibrino-leucocytaire dense et létal. Hong et al ont également observé l'apparition de bronchiolite oblitérante chez leurs animaux après irradiation à 90 Gy avec un collimateur de 5x5 mm² ²⁸⁵. L'apparition de cette bronchiolite oblitérante reflète l'organisation en série de l'arbre bronchique proximal qui se trouve dans le champ d'irradiation de ces deux collimateurs. En effet, avec un volume d'irradiation de 0,785 cm³, le collimateur 10x10 mm² irradie 100% du volume pulmonaire de la souris. Le volume d'irradiation du collimateur 7x7 mm² est de 0,27 cm³, ce qui correspond à 54% du volume pulmonaire. Or l'arbre bronchique proximal est un organe organisé en série, c'est-à-dire que ses unités fonctionnelles dépendent les unes des autres. L'organe a donc besoin de l'ensemble de ses sous-unités pour fonctionner. Les organes organisés en série sont sensibles à la dose maximale reçue contrairement aux organes organisés en parallèle, comme le parenchyme pulmonaire, qui sont sensibles au volume irradié. Ainsi l'arbre bronchique est beaucoup plus sensible à la dose reçue que le parenchyme pulmonaire : c'est pourquoi nous observons une réaction extrêmement sévère des bronches et bronchioles situées dans le volume d'irradiation. L'irradiation au collimateur 10x10 mm² équivaut finalement à une irradiation en thorax entier et celle au collimateur 7x7 mm² à une irradiation en héli-thorax.

Il aurait été très intéressant de pouvoir éviter l'irradiation des structures centrales avec ces deux collimateurs, pour pouvoir observer le réel impact du volume d'irradiation sur le parenchyme pulmonaire. Hong et al ont comparé les lésions périphériques, (du parenchyme pulmonaire) aux lésions centrales (des bronches), induites par l'irradiation stéréotaxique²⁸⁴. Ils ont, en plus de l'analyse histologique, suivi les changements de la fonction respiratoire des souris générés par ces deux types de lésions, à deux et quatre semaines post-irradiation. Les lésions centrales augmentent l'élastance des poumons, c'est-à-dire la capacité des poumons à résister à une augmentation du volume. Les lésions périphériques, quant à elles, diminuent la capacité inspiratoire²⁸⁴. Ces travaux ont donc montré l'impact des irradiations stéréotaxiques périphérique et centrale, d'un point de vue histologique et fonctionnel et que les mécanismes affectant la fonction respiratoire diffèrent entre les lésions centrale et périphérique. En clinique, dès les premières tentatives d'irradiation de tumeurs pulmonaires centrales, un excès de toxicité a été observé par Timmerman et son équipe⁷⁹. Les huit patients concernés ont développé des toxicités de grade 3 à 4 entre 1,1 et 25,1 mois post-traitement. La localisation de la tumeur, périphérique ou centrale, a été identifiée comme un facteur prédictif de toxicité et une « no fly zone » a été délimitée. Cette « no fly zone » concerne chez l'Homme la région thoracique centrale contenant la trachée, l'œsophage, les bronches souches, le cœur et les gros vaisseaux.

La survie des animaux est également affectée par la façon dont la dose est délivrée. Cho et al ont réalisé des irradiations avec un collimateur de 5x5 mm², à une dose de 90 Gy, en faisceau unique dorso-ventral²⁸³. Ils ont observé le décès des animaux en 2 à 3 semaines. Nos animaux irradiés avec le collimateur 7x7 mm², en arc-thérapie ont survécu jusqu'à 8 semaines post-irradiation. Nous obtenons donc une meilleure survie des animaux avec notre modèle d'arc-thérapie.

Le volume irradié par les collimateurs 7x7 mm² et 10x10 mm² est trop important pour pouvoir observer les effets tardifs de l'irradiation stéréotaxique. En effet, après irradiation au collimateur 7x7 mm², un emphysème (ou rupture totale du parenchyme pulmonaire) est observé sur plus de 50 % du poumon gauche. Avec une irradiation au 10x10 mm², l'emphysème concerne l'ensemble du poumon gauche. Le parenchyme pulmonaire a du mal à mettre en place la réaction de cicatrisation comme en témoigne l'épaississement des septa alvéolaires, présent sur l'ensemble du poumon gauche mais moins important qu'après irradiation au collimateur 3x3 mm², à 1 mois post-irradiation. D'ailleurs, les collimateurs 7x7 mm² et 10x10 mm² ne permettent pas la prolifération des pneumocytes de type II (excepté

dans la zone pleurale, à 1 mois et demi post-irradiation au collimateur 7x7 mm²). Les pneumocytes de type II sont localisés dans l'alvéole pulmonaire et sont spécialisés dans la production de surfactant qui permet de diminuer la tension de surface au niveau de l'alvéole et protège l'alvéole. Ils sont également capables d'auto-renouvellement⁹. Ils peuvent également proliférer, en cas de lésion, et se différencier en pneumocytes de type I pour réparer l'alvéole²⁹⁸. Ils ont donc un rôle de progéniteur alvéolaire et de cellule souche alvéolaire²⁹⁹. Lavigne et al²⁹³ ainsi que Almeida et al¹⁰¹ ont pu observer la prolifération des pneumocytes de type II après irradiation en thorax entier à 17 Gy et 12 Gy, respectivement, à 2, 13 et 23 semaines pour Lavigne et al et à partir de 2 mois post-irradiation pour Almeida et al. Cette prolifération des pneumocytes de type II est le témoin de la mise en place de la réaction de cicatrisation dans l'alvéole : sans prolifération, il n'y aura pas de réparation de l'épithélium alvéolaire, c'est ce que nous observons aux collimateurs 7x7 mm² et 10x10 mm². En revanche, certaines études après irradiation du thorax entier observent une déplétion des pneumocytes de type II^{282,300}. Ces disparités peuvent s'expliquer par des facteurs tels que la dose administrée ou le temps d'observation. Nous verrons par la suite que la prolifération réactionnelle des pneumocytes de type II est un paramètre déterminant dans l'induction de la fibrose pulmonaire dans notre modèle d'irradiation stéréotaxique.

Après irradiation aux collimateurs 7x7 mm² et 10x10 mm², une diminution du nombre de cellules club est observée dans le poumon gauche, ainsi qu'au niveau du poumon droit. Les cellules club possèdent un rôle de progéniteurs et de cellules souches²⁹⁹. Les cellules club sont des cellules sécrétrices de l'épithélium respiratoire, abondantes au niveau des bronchioles terminales. Elles sont impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques grâce au cytochrome P450 qu'elles expriment²⁹⁹. Elles sécrètent le *Club Cell Secretory Protein* (CCSP), impliqué dans la régulation du système immunitaire pulmonaire. Elles sont capables d'auto-renouvellement³⁰¹. Elles sont aussi capables de se différencier en cellules ciliées³⁰¹, en cellules caliciformes, en pneumocytes de type I ou pneumocytes de type II³⁰², notamment en cas de lésion. Elles sont capables de régénérer l'épithélium alvéolaire et bronchiolaire. En absence de lésion, les cellules club sont quiescentes au sein de l'épithélium bronchiolaire terminal. Les cellules club sont impliquées dans la pathogénèse de la fibrose pulmonaire idiopathique, comme abordé au chapitre 2, via la ré-épithélialisation de l'alvéole. Lors d'une irradiation en thorax entier, à 15 Gy, chez la souris, la diminution du nombre de cellules club s'accompagne d'une diminution de l'expression de l'ARNm du CCSP²⁸¹. Dans notre modèle le nombre de cellules club est diminué quand le champ d'irradiation est suffisamment

important pour contenir un nombre significatif de bronchioles. L'ensemble de ces données suggèrent que les cellules club sont un paramètre très important à suivre post-irradiation et jouent un rôle majeur dans le développement de la fibrose pulmonaire radio-induite.

En ce qui concerne l'expression génique, nous avons choisi de mesurer des gènes spécifiquement exprimés par différents types cellulaires alvéolaires et bronchiolaires, afin de pouvoir compléter les informations obtenues lors de l'analyse anatomopathologique : les pneumocytes de type II et les cellules club bien sûr mais également les cellules ciliées, ayant un rôle dans l'élimination des poussières et des pathogènes dans les bronches et bronchioles. Le gène représentant les pneumocytes de type II est le gène SFTPC codant pour le *surfactant protein C* (Sft-PC). Celui des cellules club est le gène de la CCSP ainsi que CYP2F2, gène codant pour l'un des cytochromes P450 exprimé par ces cellules. Le gène utilisé comme marqueur des cellules ciliées est FOXJ1, un facteur de transcription impliqué dans la ciliogénèse. L'irradiation au collimateur 7x7 mm² induit une forte diminution de l'expression des gènes CCSP et CYP2F2 sur le poumon gauche et le poumon droit, ainsi qu'une diminution de l'expression du gène FOXJ1 au niveau du poumon gauche et du poumon droit. Ce collimateur n'induit pas de modification de l'expression du gène SFTPC. L'expression de ces gènes après irradiation au collimateur 7x7 mm² est en accord avec les comptages réalisés lors de l'analyse anatomopathologique. La modification de l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire du poumon post-irradiation a également été quantifiée. L'irradiation au collimateur 7x7 mm² induit une forte augmentation de l'expression des gènes de l'IL-1 β (cytokine pro-inflammatoire), de l'IL-6 (cytokines pro-inflammatoires), du TNF (cytokine pro-inflammatoire), de CXCL2 (sécrété par les macrophages, chimioattractant des neutrophiles) et d'EMR1 (récepteur des macrophages). L'expression du gène ENG (récepteur du TGF- β) est quant à elle diminuée, à la fois sur le poumon gauche et le poumon droit. On observe donc une réponse inflammatoire à l'irradiation focale, non seulement sur le poumon ciblé mais également sur le poumon droit. Pour le collimateur 7x7 mm², le volume d'irradiation est tellement important que cela est dû au dépôt de dose en dehors du volume cible. En ce qui concerne le collimateur 10x10 mm², celui-ci a été exclu de l'analyse de l'expression des gènes à la vue des dommages trop importants qu'il engendrait.

Le volume irradié par les collimateurs 7x7 mm² et 10x10 mm² est trop important pour pouvoir observer de la fibrose pulmonaire radio-induite : en effet, la lésion et la réponse inflammatoire sont tellement importantes que le processus de cicatrisation ne se met pas en place ou trop tardivement par rapport à l'apparition de la bronchiolite oblitérante. Cependant,

c'est une très forte dose qui a été déposée : 90 Gy. Il serait envisageable d'irradier à des doses moins fortes, mais dans ce cas, on se rapproche plus d'un contexte d'irradiation hémithoracique ou thorax entier, réduisant ainsi l'avantage que peut nous apporter le SARRP. L'avantage du SARRP pour ce type d'irradiation en champ large c'est que l'irradiation des organes à risque pourrait être évitée (cœur, gros vaisseaux, trachées, bronches souches et œsophage). Par contre, il ne faut pas oublier que le SARRP utilise de basses énergies, de l'ordre du kV. Sur ce point le SARRP s'éloigne des pratiques cliniques : les LINAC utilisent des énergies plus hautes, de l'ordre du MV. Ces données sur des champs larges d'irradiation sont tout de même importantes, notamment dans la perspective d'un modèle d'irradiation stéréotaxique avec tumeur. Les tumeurs ayant un taux de prolifération très important, celles-ci peuvent nécessiter l'utilisation de champs larges, point que nous aborderons dans la section 5 de cette discussion.

L'un des intérêts majeurs du SARRP est de pouvoir réduire les volumes d'irradiation. Ceci nous permet d'observer le développement de la fibrose pulmonaire radio-induite chez la souris après irradiation stéréotaxique en arc-thérapie, à une dose de 90 Gy grâce à l'utilisation d'un collimateur de 3x3 mm².

La fibrose pulmonaire radio-induite est due à une réaction de cicatrisation anormale du parenchyme pulmonaire après exposition aux rayonnements ionisants. Comme nous l'avons vu au chapitre 4, l'épithélium alvéolaire est activé de façon aberrante et un mécanisme de cicatrisation dérégulé se met alors en place : les fibroblastes et myofibroblastes prolifèrent excessivement et produisent de la matrice extracellulaire en grande quantité. Le parenchyme pulmonaire devient fibreux et se rétracte, les alvéoles perdent leur fonction et les échanges gazeux sont altérés. Dans notre modèle d'irradiation stéréotaxique pulmonaire, nous avons pu observer de la fibrose pulmonaire après irradiation à 90 Gy avec le collimateur 3x3 mm², avec un patch lésionnel visible sur les images acquises de 1 à 12 mois au μ CT, un scanner haute résolution du petit animal. L'acquisition de ces images scanner nous a permis de suivre le développement d'opacifications. Les variations d'intensité sur les images, en unités Hounsfield, sont en fait le reflet des changements de densité tissulaire lors du développement de l'inflammation puis de la fibrose pulmonaire radio-induite. L'épaississement des septa alvéolaires est sévère et persiste à 12 mois, dans le patch, le poumon ipsilatéral et le poumon droit. Cet épaississement des septa alvéolaires au niveau du poumon ipsilatéral et du poumon droit est le témoin de la dose déposée en dehors du volume cible mentionnée à la section précédente. Une diminution du nombre de cellules club dans le volume cible est également

observée après irradiation au collimateur 3x3 mm². Cette déplétion des cellules club est chronique et persiste jusqu'à 12 mois post-irradiation. L'irradiation au collimateur 3x3 mm² préserve en revanche les pneumocytes de type II au sein du patch lésionnel. Par contre ces derniers prolifèrent de manière importante aux abords du patch. Ceci peut s'expliquer par le fait que 90 Gy est une très forte dose : les pneumocytes de type II sont probablement trop lésés au sein du patch pour pouvoir proliférer mais la réaction de cicatrisation est assurée par la prolifération très importante aux abords du patch. Ainsi, la fibrose pulmonaire radio-induite serait déclenchée, dans notre modèle, par une perte suffisante des cellules club et une préservation des pneumocytes de type de II afin qu'ils puissent proliférer et mettre ainsi en place la réaction de cicatrisation. La déplétion en cellules club, via un modèle de souris transgénique knock-out pour le gène de la CCSP, suffit à déclencher une fibrose péri-bronchiolaire¹⁰⁶. L'exposition répétée au naphthalène chez des souris C57bl/6 induit également une perte des cellules club et le développement d'une fibrose péri-bronchiolaire³⁰³. La perte chronique des cellules club, à elle seule et quel que soit le facteur déclenchant, est donc un phénomène fibrosant par la perte des capacités de réparation de l'épithélium. Dans ces deux modèles cependant, les pneumocytes II sont préservés (le naphthalène n'impacte que les cellules club), condition que nous supposons nécessaire dans notre modèle pour la mise en place de la fibrose. A contrario, la déplétion spécifique des pneumocytes de type II suffit elle aussi à générer de la fibrose pulmonaire³⁰⁴. La nécessité de la présence d'une prolifération réactionnelle des pneumocytes de type II pour générer de la fibrose pourrait-être une spécificité intéressante de notre modèle d'irradiation focale.

La survie des souris n'est pas affectée par l'irradiation au collimateur 3x3 mm² : les animaux survivent à long terme (12 mois post-irradiation), sans symptômes notables. Quelques animaux présentent une bronchiolite oblitérante mais celle-ci n'est bien établie que chez les animaux irradiés aux collimateurs 7x7 mm² et 10x10 mm². Le volume d'irradiation de 3x3 mm² semble être une limite pour l'apparition de la bronchiolite oblitérante. Par contre le collimateur 3x3 mm² permet l'étude des effets précoces et tardifs de l'irradiation, même si le dépôt de la dose en dehors du volume n'est pas négligeable et entraîne des répercussions sur le poumon droit.

Les données concernant les modifications de l'expression génique au sein du tissu sain après irradiation proviennent très majoritairement des études faites avec le modèle d'irradiation en thorax entier. Actuellement peu de données existent sur la modification de l'expression des gènes par l'irradiation stéréotaxique. Jin et al ont identifié certains gènes

impliqués dans la réponse à l'irradiation stéréotaxique après irradiation à 90 Gy en dose unique avec un collimateur de 3x3 mm², grâce à la mesure de l'expression de 39 429 gènes. Ces expérimentations ont montré que l'expression des gènes *ermap* pour *Erythroblast Membrane Associated Protein* (adhésion cellulaire), *epb4.2* pour *Erythrocyte Membrane Protein Band 4.2* (protéine de liaison à l'ATP dans les érythrocytes) et *cd200r3* pour *CD200 receptor 3* (récepteur pour la glycoprotéine CD200) était augmentée après irradiation focale à 90 Gy. L'expression des gènes *krt15* codant pour la kératine 15 (intégrité du cytosquelette), *hoxc4* codant pour le facteur de transcription *homeobox 4* (morphogénèse), *gdf2* codant pour le *growth differentiation factor 2* (développement neuronal embryonnaire), *cst9* codant la *cystatin 9* (différenciation hématopoïétique ou inflammation), *cidec* codant pour *cell death inducing DFFA like effector c* (liaison aux lipides), et *bnc1* codant pour la *basonuclin 1* (facteur de transcription) est, quant à elle, diminuée après irradiation focale. Kim et al ont également étudié les modifications d'expression génique après irradiation stéréotaxique, à 90 Gy avec un collimateur de 3x3mm². La plupart des gènes présentaient une diminution de leur expression dans le volume d'irradiation. Ces gènes sont principalement impliqués dans le développement des organes avec des rôles dans l'adhésion cellulaire ou la morphogénèse. Certains gènes ont quand même vu leur expression augmentée après irradiation focale, au niveau du volume d'irradiation. Ces gènes sont, eux, impliqués dans la fonction immunitaire avec des rôles dans la réponse de défense de l'organisme, la réponse inflammatoire et la réponse de cicatrisation. Un troisième cluster de gènes a été identifié, avec des gènes impliqués dans le cycle cellulaire (voie de signalisation p53, arrêt du cycle, apoptose). Ils ont mis en évidence que l'expression de ces gènes était clairement plus impactée dans le volume d'irradiation, que dans les zones non irradiées. Même si l'irradiation est focalisée, celle-ci a tout de même un impact sur les tissus environnants.

Nous n'avons pas inclus les gènes issus de la bibliographie dans notre étude car nous avons choisi de mesurer l'expression de gènes impliqués dans la réponse des tissus sains à l'irradiation, notamment des gènes impliqués dans l'inflammation et des gènes marqueurs de différents types cellulaires pulmonaires. La mesure de l'expression génique a révélé que l'expression de l'ARNm de la CCSP était préservée après irradiation à 90 Gy avec le collimateur 3x3 mm² et que l'expression de l'ARNm du Sft-PC était, quant à elle, augmentée, et ce dans le patch, le poumon ipsilatéral et le poumon droit à 1 mois post-irradiation. Cette augmentation de l'expression du Sft-PC à 1 mois post-irradiation illustre la phase exsudative (quelques semaines à quelques mois post-irradiation chez l'Homme) pendant laquelle les

pneumocytes de type II sécrètent du Sft-PC pour protéger et réparer l'alvéole. L'expression de l'ARNm du CYP2F2, pour les cellules club, est diminuée après irradiation au collimateur 3x3 mm² à 1 et 3 mois et est rétablie à 6 et 12 mois. L'expression de l'ARNm de FOXJ1, pour les cellules ciliées, est augmentée à 6 et 12 mois dans le patch et à 12 mois dans le poumon ipsilatéral. Globalement, les profils d'expression génique pour les marqueurs de l'inflammation sont semblables. L'augmentation de l'expression des ARNm de ces marqueurs de l'inflammation est observée dans le patch mais également sur le poumon ipsilatéral et le poumon droit. Ceci est dû au dépôt de la dose en dehors du volume cible, mais pas seulement. Cette réaction inflammatoire globale est probablement due également à la diffusion de la réponse inflammatoire du patch lésionnel. De plus, comme mentionné précédemment, l'irradiation focale entraîne une réaction globale du parenchyme pulmonaire à 14 jours post-irradiation, avec une hépatisation²⁹³. Il est donc normal d'avoir une réaction inflammatoire globale du parenchyme pulmonaire.

A l'inverse, très peu de conséquences sont observées après irradiation au collimateur 1 mm. Le patch lésionnel est visible sur les coupes tissulaires à 1 mois et 3 mois post-irradiation mais n'est pas visible sur les images acquises au μ CT, quel que soit le temps post-irradiation. L'épaississement des septa alvéolaires, témoin de la réaction du parenchyme pulmonaire, est quand même observé jusqu'à 12 mois, cependant aucune fibrose n'a pu être observée. L'irradiation au collimateur 1 mm de diamètre n'a pas d'impact sur le nombre de cellules club. Mais ce volume d'irradiation est probablement trop petit pour contenir suffisamment de bronchioles dans le champ d'irradiation. En ce qui concerne les pneumocytes de type II, l'irradiation au collimateur 1 mm de diamètre déclenche la prolifération de ces derniers, et ce jusqu'à 12 mois post-irradiation. Nous avons donc une réaction des pneumocytes de type II mais en l'absence de déplétion des cellules club, la fibrose pulmonaire ne se développe pas.

L'expression du gène du Sft-PC est fortement augmentée après irradiation à 90 Gy au collimateur 1 mm de diamètre, dans le patch, le poumon ipsilatéral et le poumon droit. Celle du gène codant pour la CCSP est augmentée également, dans le patch et le poumon droit à 12 mois post-irradiation, confirmant la réaction des pneumocytes de type II et la préservation des cellules club. L'expression des ARNm du CYP2F2 et de FOXJ1 présente le même profil. Au niveau des gènes des marqueurs inflammatoires, le profil d'expression est globalement le même qu'avec le collimateur 3x3 mm². Ici la réaction inflammatoire observée à travers la

mesure de l'expression génique ne peut pas être due au dépôt de dose en dehors du volume cible. En effet, celui-ci est minimal avec le collimateur 1 mm de diamètre, avec une dose moyenne au poumon gauche de 2,5 Gy et une dose moyenne au poumon droit de 0,7 Gy. Ces résultats confirment que la réponse à l'irradiation focale est une réponse globale des poumons et que la réponse inflammatoire à l'irradiation est diffusée au sein de l'organe.

L'efficacité clinique de la radiothérapie stéréotaxique et le bon contrôle tumoral obtenu font que les indications pour la radiothérapie stéréotaxique sont de plus en plus nombreuses et que les tumeurs traitées sont de plus en plus volumineuses. L'augmentation des volumes irradiés nécessite d'adapter les protocoles de fractionnement. En effet, dès que le volume irradié augmente en radiothérapie stéréotaxique pulmonaire, le risque de perdre trop de cellules club, de pneumocytes de type II ou que le volume cible contienne des sous structures à risque organisées en série, augmente, augmentant ainsi le risque de toxicité radio-induite sévère. L'ensemble des données acquises au cours de l'étude de l'effet du volume a révélé différents paramètres importants dans le développement de la fibrose pulmonaire après irradiation en conditions stéréotaxiques. L'apparition de cette fibrose est caractérisée par une perte suffisante des cellules club au niveau de l'épithélium bronchiolique. Cette déplétion doit être concomitante avec une prolifération réactionnelle des pneumocytes de type II dans les alvéoles aux abords du patch lésionnel. Cette nécessité d'induire une prolifération réactionnelle des pneumocytes de type II pour générer de la fibrose semble caractéristique du modèle d'irradiation en conditions stéréotaxiques. Par contre, la survie des souris est compromise par l'apparition de la bronchiolite oblitérante après irradiation à 7x7 mm² et 10x10 mm². Ces résultats ont appuyé le choix du collimateur 3x3 mm² pour caractériser l'impact de la dose totale et du fractionnement de la dose dans la suite de ces travaux de thèse. En effet, le collimateur 3x3 mm² nous permet un compromis entre la survie des animaux et l'observation des effets tardifs de l'irradiation stéréotaxique pulmonaire et ce jusqu'à 12 mois post-irradiation, ce qui est totalement nouveau.

Effet de la dose totale

Pour étudier l'effet de la dose, nous avons choisi d'encadrer la dose de 90 Gy, issue de la bibliographie. Cette dose de 90 Gy nous permet d'observer de la fibrose chez la souris après irradiation au collimateur 3x3 mm². Cependant c'est une très forte dose, qui forme une lésion sévère au niveau du parenchyme pulmonaire. L'objectif de l'étude de l'effet de la dose était d'établir une gamme de doses afin de situer les doses capables de générer une inflammation et/ou une fibrose pulmonaire. Le collimateur 3x3 mm², nous permettant d'irradier un volume restreint, associé à l'arc-thérapie, qui permet d'éviter les toxicités à la peau et aux muscles, nous a permis de mettre en place une escalade de dose de 20 à 120 Gy. Les animaux ont survécu sans symptômes cliniques notables et ce jusqu'à la fin de l'étude, 6 mois post-irradiation. Une telle escalade de dose n'aurait pas été possible avec un volume d'irradiation plus important que celui généré par l'irradiation au collimateur 3x3 mm², comme l'a montré l'étude de Cho et al. L'irradiation avec un collimateur de 5mm et une dose de 100 Gy a entraîné le décès des animaux en 2 à 3 semaines²⁸³.

A 1 mois post-irradiation, nous avons pu observer l'opacification du volume cible sur les images μ CT pour les doses de 80 Gy, 100 Gy et 120 Gy. L'analyse anatomopathologique a révélé un fort épaissement des septa alvéolaires, une perte des cellules club importante, ainsi qu'une diminution du nombre de pneumocytes II. Cependant, à 6 mois post-irradiation, une forte augmentation du nombre de pneumocytes II a pu être observée, témoignant de leur prolifération. La réaction des pneumocytes II est donc fortement décalée dans le temps aux très fortes doses mais permet le développement fibreux. A ces très fortes doses, la fibrose pulmonaire radio-induite se développe rapidement. Cette fibrose est probablement un effet conséquentiel d'une réaction inflammatoire précoce très sévère. L'effet conséquentiel est défini comme le lien de causalité entre la sévérité de l'atteinte aiguë et le développement des séquelles tardives. La différence entre les effets tardifs conséquentiels et les effets tardifs dits primaires de la radiothérapie est le temps d'apparition après le traitement. Quand les réactions précoces de l'irradiation se mettent en place pendant le traitement ou dans les semaines qui suivent le traitement, les réactions tardives primaires se développent des mois ou des années après radiothérapie. Les effets conséquentiels, quant à eux, se manifestent peu de temps après les réactions précoces. Les effets conséquentiels sont donc bien distincts des effets primaires de l'irradiation. Les effets conséquentiels résultent d'une lésion précoce sévère qui ne parvient pas à cicatriser complètement et persiste pour se transformer en lésion chronique. L'existence d'un effet conséquentiel entre la pneumopathie radique aiguë et la fibrose pulmonaire radio-induite porte à controverse. Dans une étude de Dörr et al, 75% des

patients présentant des changements radiologiques à 15 semaines post-irradiation, témoins d'une pneumopathie radique, ont développé une fibrose pulmonaire radio-induite un an après la radiothérapie. Quatre à sept ans plus tard, l'ensemble des patients ayant développé une pneumopathie radique présentait une fibrose pulmonaire¹⁰². Ils concluent que la composante conséquentielle dans le développement de la fibrose pulmonaire radio-induite est très importante. Ces résultats sont confirmés par Slanina et al³⁰⁵ et Polansky et al³⁰⁶. Ces résultats sont en revanche contestés par Frölich qui rapporte des cas de fibrose pulmonaire radio-induite parmi des patients n'ayant pas développé de pneumopathie radique aiguë¹⁰³. L'association entre la pneumopathie radique et la fibrose pulmonaire est encore incertaine et est débattue^{90,92,307,308}.

Ici, la fibrose rapide observée aux très fortes doses pourrait donc être un effet conséquentiel, résultat en continu de l'inflammation extrêmement sévère déclenchée par l'irradiation. Cependant, le but de notre modèle n'est pas de créer une fibrose rapide, mais d'être le plus pertinent possible cliniquement. En effet, en clinique, la fibrose pulmonaire radio-induite met du temps à se développer : les mécanismes physiopathologiques impliqués se mettent en place pendant les mois ou années suivant l'irradiation. Certes, une fibrose rapide est un confort pour le chercheur, cela permet de diminuer le temps d'hébergement des animaux et d'obtenir des résultats plus rapidement, comme le permet la bléomycine. La bléomycine est un agent anti-cancéreux : c'est un antibiotique cytostatique qui s'intercale dans la molécule d'ADN. La bléomycine a pour effet une fibrose rapide chez la souris et le rat, en quelques semaines. La fibrose pulmonaire induite par la bléomycine est bien étudiée dans la littérature, notamment dans le cadre de la fibrose pulmonaire idiopathique, et a permis de mettre en lumière les mécanismes physiopathologiques de la fibrose. Cette fibrose induite par la bléomycine n'est pas fidèle aux observations cliniques mais reste un modèle préclinique incontournable. En radiobiologie non plus, les modèles ne sont pas strictement fidèles à la clinique. Par exemple, l'administration de trois fractions de 20 Gy chez le rongeur n'engendre pas de fibrose radio-induite pulmonaire. C'est pour cela que les modèles de lésions radio-induites chez les rongeurs sont généralement des modèles d'exposition à de fortes doses uniques, nécessaires pour créer chez un animal beaucoup moins radiosensible que l'Homme des lésions comparables à celles observées en clinique.

Pour les doses de 20 et 40 Gy, aucun signe radiologique n'est apparu sur les images μ CT, que ce soit à 1 ou à 6 mois post-irradiation. Ces doses ne permettent pas de déclencher une fibrose pulmonaire radio-induite chez la souris. L'analyse anatomopathologique a quand

même révélé une réaction du parenchyme pulmonaire à ces doses. A 40 Gy, l'épaississement des septa alvéolaires est observable à 1 mois post-irradiation et persiste légèrement à 6 mois. A 20 et 40 Gy, à 1 mois post-irradiation, une forte réaction des pneumocytes de type II est présente dans le patch lésionnel. A 40 Gy, une légère diminution du nombre de cellules club est observée mais elle n'est probablement pas suffisante pour pouvoir déclencher une fibrose. Les cellules club ne sont pas impactées par l'irradiation à une dose de 20 Gy. Dans l'étude de Granton et al³⁰⁹, ils observent de la fibrose 39 semaines après irradiation à 20 Gy avec un collimateur de 5 mm de diamètre en champs parallèles opposés, centrés sur le poumon droit. L'apparition de la fibrose pulmonaire après irradiation à une dose de 20 Gy peut s'expliquer par l'utilisation du collimateur de 5 mm de diamètre. En effet, le volume d'irradiation étant plus important, la diminution du nombre de cellules club est probablement plus importante. Or une perte suffisante des cellules club semble être nécessaire pour développer une fibrose pulmonaire, comme le suggèrent nos résultats ainsi que l'étude de Perl et al¹⁰⁶. Aux doses de 20 et 40 Gy, une réaction précoce se met en place mais ne mène pas au développement d'une fibrose pulmonaire radio-induite, en tout cas à 6 mois post-irradiation. On ne peut cependant pas exclure qu'elle puisse apparaître à des temps plus long dans notre modèle.

Avec notre modèle d'irradiation stéréotaxique, la fibrose pulmonaire radio-induite est déclenchée à partir de 60 Gy. A cette dose, 1 mois post-irradiation, il n'y a pas de changement radiologique sur les images μ CT : il n'y a pas de variation de densité tissulaire détectée par rapport aux tissus contrôles. La réaction du parenchyme pulmonaire est tout de même présente avec un épaississement des septa alvéolaires, une diminution du nombre de cellules club consécutive, et une prolifération des pneumocytes de type II. A 6 mois post-irradiation, une opacification apparaît sur les images μ CT qui se traduit par le basculement de la courbe d'intensité vers la droite. Cette opacification traduit un changement de densité tissulaire, correspondant au développement d'un foyer fibreux au niveau du volume cible. L'épaississement des septa alvéolaires, la perte des cellules club et la prolifération des pneumocytes II sont toujours présents. Soixante Gy est donc une dose charnière qui entraîne une réaction précoce puis une réaction tardive. Cette réaction tardive met du temps à se mettre en place. En effet, cette séquence d'évènements (réaction précoce puis réaction tardive) est assez proche des observations faites en clinique chez les patients.

En ce qui concerne l'expression des gènes, les ARNm du CCSP et CYP2F2, pour les cellules club, diminuent de façon dose-dépendante à 1 mois post-irradiation, dans le patch

lésionnel, sans impact sur le reste du poumon gauche ni sur le poumon droit. Six mois plus tard, l'expression de ces deux ARNm est rétablie. Ces résultats sont cohérents avec les mesures d'expression génique sur les mêmes gènes, effectuées après irradiation avec le collimateur 3x3 mm² à 90 Gy. L'expression de l'ARNm du SFTPC diminue à 1 mois post-irradiation, principalement dans le poumon ipsilatéral. L'expression est rétablie à 6 mois post-irradiation. La modification de l'expression de l'ARNm du SFTPC à 1 mois post-irradiation n'est pas cohérente avec celle observée à 90 Gy avec le collimateur 3x3 mm². L'expression de FOXJ1 n'est pas impactée à 1 mois post-irradiation et est légèrement diminuée dans le poumon ipsilatéral à 6 mois post-irradiation. Ici aussi, ce résultat n'est pas cohérent avec les observations faites à 90 Gy avec le collimateur 3x3 mm² : en effet, à 6 mois post-irradiation, dans le patch l'expression de FOXJ1 était augmentée. L'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire suit globalement le même profil avec une augmentation de l'expression pour les doses de 80, 100 et 120 Gy, avec un impact sur le poumon droit pour la dose de 120 Gy, à 1 mois post-irradiation. Cette augmentation de l'expression génique persiste à 6 mois post-irradiation. L'expression des gènes ENG, IL-1 β et TNF n'est pas impactée, quels que soient la dose et le temps, alors que ces gènes étaient impactés par l'irradiation à une dose de 90 Gy. Ces incohérences dans la modification de l'expression des gènes entre l'étude de l'effet du volume d'irradiation à 3x3 mm² à une dose de 90 Gy et l'étude de l'effet de la dose, également réalisée avec le collimateur 3x3 mm² soulève deux problématiques : celle de l'hétérogénéité du tissu pulmonaire et celle de l'incertitude du prélèvement des tissus lors de l'euthanasie. Le poumon est un tissu complexe et hétérogène comprenant de nombreux types cellulaires épithéliaux, mésenchymateux, immunitaires et vasculaires. Les ARNm sont extraits à partir du tissu et donc à partir de l'ensemble de ces types cellulaires. Or les cellules épithéliales auront une expression des gènes différente de celles des cellules mésenchymateuses, des cellules immunitaires et des cellules vasculaires. De plus au sein de ces types cellulaires, il existe différentes sous populations cellulaires. Par exemple, parmi les cellules épithéliales du poumon, on retrouve les pneumocytes de type I et de type II, les cellules club, les cellules ciliées, les cellules caliciformes, les cellules séreuses, les cellules basales neuroendocrines et les cellules souches basales. Chacune de ces sous populations cellulaires a sa propre fonction au sein de l'épithélium et donc une expression génique particulière. Se rajoute à cette hétérogénéité dans l'expression des gènes, due aux différentes fonctions cellulaires, l'incertitude liée au prélèvement et au découpage des poumons. En effet, le poumon a été découpé en quatre parties : le patch lésionnel, l'apex du poumon ipsilatéral éloigné du patch et deux zones de poumon ipsilatéral proche du patch. Le

découpage a été effectué à la main, avec pour repère le patch, ce qui introduit forcément de la variabilité au moment du prélèvement. Cette variabilité pourrait tout à fait avoir un impact sur l'étude de l'expression génique. L'utilisation de techniques de mesure de l'expression des gènes plus poussées pourrait être un moyen de s'affranchir de cette variabilité. Par exemple, réaliser un tri cellulaire après lyse du tissu pulmonaire permettrait de séparer les différentes lignées cellulaires avant analyse de l'expression des gènes, ou utiliser la technologie du *Single Cell* permettrait d'analyser l'expression génique de manière très précise et d'identifier des sous-populations cellulaires d'intérêt dans la réponse pulmonaire à l'irradiation stéréotaxique. Cette approche fait partie du projet de thèse de Sarah Braga-Cohen (thèse IRSN/LRMed 2019-2022).

Pour résumer, le collimateur 3x3 mm² permet l'étude des effets précoces et tardifs, avec un délai de développement des effets tardifs très intéressant et pertinent d'un point de vue clinique après administration d'une dose de 60 Gy. Le collimateur 3x3 mm² est représentatif de la clinique en termes de volume irradié. Le volume irradié avec ce collimateur autorise l'utilisation de larges gammes de doses sans conséquence clinique majeure permettant des études à long terme. D'après ces observations, nous avons choisi ce collimateur pour effectuer l'étude sur l'effet du fractionnement de la dose.

Effet du fractionnement de la dose

Le challenge de ces irradiations fractionnées a été le repositionnement des animaux. Le Dr Dos Santos a donc conçu un lit de repositionnement, afin d'être le plus reproductible possible dans le positionnement des animaux. Ainsi les pattes de l'animal sont immobilisées, ce qui aide à mettre l'animal dans la même position à chaque fraction. Grâce au scanner CBCT du SARRP ainsi que les courbes isodoses obtenues avec le logiciel Muriplan®, les animaux ont pu être repositionnés de manière relativement précise à chaque fraction grâce à la superposition des images par rapport à l'image acquise lors de la première fraction. Cependant, ce repositionnement n'est pas parfait. Lors d'une thèse précédente au laboratoire, réalisée par Frédéric Soysouvanh sur la « *Sénescence cellulaire radio-induite : application à l'irradiation pulmonaire en conditions stéréotaxiques* », un protocole d'irradiation fractionnée avec 5 fractions de 20 Gy a été testé. Il a pu observer une légère opacification en verre dépoli au niveau du poumon gauche sur les images acquises au μ CT au temps le plus tardif de l'étude, c'est-à-dire 15 mois post-irradiation. Cette opacification signe la présence d'une inflammation du parenchyme pulmonaire. Les lésions observées, discrètes, étaient diffuses alors qu'en dose unique, la lésion est très bien délimitée. Cette opacification diffuse est probablement due premièrement au fait que la lésion est discrète, mais peut également être liée à l'incertitude sur le repositionnement des animaux. La diffusion de la lésion peut également être due aux mouvements respiratoires de la souris vu qu'il n'y a pas de système de gating pendant l'irradiation. Les conséquences de cette absence de gating respiratoire sont probablement plus importantes lors d'un protocole à 5 fractions que lors d'irradiations dose unique comme nous avons pu le faire dans ce projet. Le fait que la lésion n'ait pas de bords nets après 5 fractions a compromis le contourage de la lésion sur les images μ CT, et donc la quantification des modifications d'intensité. Le repositionnement des animaux ayant un tel impact, nous avons choisi de le minimiser en ne dépassant pas trois fractions par protocole. De plus cela nous permettait d'administrer les trois fractions sur la même semaine : une irradiation le lundi, une le mercredi et la dernière fraction le vendredi. Ainsi l'étalement du traitement n'était pas trop important, conformément à ce qui peut se faire en clinique.

Les travaux de Lavigne et al sur un modèle d'arc-thérapie à une dose unique de 90 Gy au LRMed ont montré que la capacité de course des souris irradiées (reflétant la capacité pulmonaire) était significativement impactée par le volume de poumon recevant 30 Gy ou plus, soit à partir de l'isodose 30%²⁹³, représentant le volume ayant reçu 30 Gy pour une dose à l'isocentre de 90 Gy. Pour l'étude du fractionnement de la dose, nous nous sommes placés à l'isodose 30% pour rester dans ce volume d'intérêt. Nous avons donc décidé de nous

intéresser à la BED_{3Gy} (BED pour un α/β ratio de 3 Gy) déposée au niveau de l'isodose 30% en appliquant différents protocoles de fractionnement. En clinique, il est recommandé de ne pas dépasser une BED_{3Gy} de 100 au niveau des tissus sains pulmonaires, au risque de déclencher une toxicité radio-induite. Comme la souris C57bl/6 est une espèce plus radiorésistante que l'Homme, nous avons décidé d'élaborer un protocole avec une BED_{3Gy} inférieure à 100, un protocole avec une BED_{3Gy} proche de 100 et enfin, deux dernier protocoles doublant et triplant cette BED_{3Gy} de référence, respectivement. Les BED_{3Gy} à l'isodose 30% des différents protocoles de fractionnement sont les suivantes :

- 3x20 Gy: $BED_{3Gy} = 60$ à l'isodose 30%
- 3x28 Gy: $BED_{3Gy} = 108$ à l'isodose 30%
- 3x40 Gy: $BED_{3Gy} = 208$ à l'isodose 30%
- 3x50 Gy : $BED_{3Gy} = 300$ à l'isodose 30%

Je ne suis pas en mesure de présenter les résultats de l'analyse anatomopathologique pour le groupe irradié à 3x40 Gy suite à un problème technique de coupe des tissus. Un groupe d'animaux sera donc ré-irradié à cette dose afin d'effectuer l'analyse anatomopathologique. Cependant, les images μCT ainsi que l'analyse de l'expression des gènes sont disponibles.

Les images acquises au μCT ne montrent aucun signe de changement radiologique chez les animaux irradiés à 3x20 Gy et 3x28 Gy. L'analyse anatomopathologique a tout de même révélé une réaction du parenchyme pulmonaire à ces doses avec une augmentation de l'épaisseur des septa alvéolaires. A 6 mois post-irradiation, ces animaux n'ont pas développé de fibrose pulmonaire radio-induite. La perte des cellules club est minimale à 3x28 Gy. Les pneumocytes de type II ne prolifèrent pas. Ainsi ces doses de 3x20 Gy et 3x28 Gy, n'impactant ni les pneumocytes de type II ni les cellules club ou peu, ne permettent pas de développer une fibrose pulmonaire radio-induite. Ces résultats corroborent ceux de l'effet de la dose totale. Nous avons ensuite comparé les données de l'effet de la dose totale et du fractionnement sur les pneumocytes de type II en fonction de la BED_{3Gy} , au niveau du patch lésionnel. Il n'y a pas de différence significative entre le nombre de pneumocytes de type II observés dans le patch entre les doses uniques et les doses fractionnées. L'effet de l'irradiation sur les pneumocytes de type II est d'autant plus grand que la BED_{3Gy} est grande : plus la BED_{3Gy} augmente, plus les pneumocytes de type II prolifèrent afin de réparer l'alvéole pulmonaire. De la même manière que pour les pneumocytes de type II, les données de l'effet

de la dose totale et du fractionnement ont été comparées pour les cellules club en fonction de la BED_{3Gy} . Premièrement, il faut garder à l'esprit que la dose unique de 20 Gy a une BED_{3Gy} trois fois moins importante que la dose de 3x20 Gy (153 Gy versus 460 Gy). Donc d'après le concept de la BED_{3Gy} , l'irradiation à 3x20 Gy devrait avoir une efficacité biologique supérieure à la dose unique de 20 Gy. Or la diminution du nombre de cellules club 6 mois après irradiation dans les bronchioles du poumon gauche est significativement moins importante après irradiation à 3x20 Gy qu'à 1x20 Gy. Ce résultat est très intéressant mais également très délicat à expliquer. Les cellules club sont des cellules qui réagissent à l'irradiation. A 1 mois post-irradiation, pour les doses de 20 à 120 Gy, la perte des cellules club est dose-dépendante. Six mois plus tard, quelle que soit la dose, le nombre de cellules club est diminué de la même manière. Pour les doses fractionnées, l'étude n'a été réalisée qu'à 6 mois post-irradiation et nous n'avons donc pas de données à 1 mois, pour pouvoir comparer les données de l'effet de la dose. Il serait intéressant d'établir une gamme de réponse des cellules club et des pneumocytes de type II en fonction de la BED_{3Gy} avec des BED strictement identiques délivrées en doses uniques ou en dose fractionnées. Malheureusement, une telle observation ne pouvait pas être anticipée lors de la construction du projet.

Six mois après irradiation à 3x40 Gy et 3x50 Gy, des changements radiologiques ont été observés sur les images CBCT acquises au μ CT : une lésion bien délimitée et dense est apparue. On retrouve cette lésion sur les coupes histologiques après 3x50 Gy. Les septa alvéolaires sont plus épais. Quand l'épaisseur des septa alvéolaires est observée en fonction de la BED_{3Gy} , on remarque que l'épaississement des septa est plus important après irradiation à 3x50 Gy qu'à 100 ou 120 Gy en dose unique. Les doses de 100 et 120 Gy ont pourtant des BED_{3Gy} plus élevées et devraient déclencher une réaction plus importante du parenchyme pulmonaire. Tout comme la déplétion des cellules club moins importante après irradiation à 3x20 Gy qu'à 20 Gy dose unique, ce résultat est délicat à expliquer. Les doses de 100 et 120 Gy sont plus délétères que les trois fractions de 50 Gy si l'on se base sur la BED_{3Gy} . Le parenchyme pulmonaire est probablement trop lésé pour pouvoir mettre en place une réaction de cicatrisation efficace. Il existerait alors un seuil au-dessus duquel les septa alvéolaires s'épaississent moins car le parenchyme pulmonaire est trop lésé. Nous avons déjà observé un tel phénomène lors de l'étude de l'effet du volume. En effet, les irradiations avec les collimateurs 7x7 mm² et 10x10 mm² avaient déclenché un épaississement des septa alvéolaires moins important que celui observé après irradiation avec le collimateur 3x3 mm².

La lésion était trop étendue pour que la réaction de cicatrisation puisse se mettre en place correctement. Les pneumocytes de type II prolifèrent fortement aux abords du patch et le nombre de cellules club est diminué dans les bronchioles du poumon gauche. La fibrose pulmonaire radio-induite est donc bien établie. La prolifération des pneumocytes de type II et la perte des cellules club, observées en fonction de la BED_{3Gy} sont cohérentes avec les données de l'étude de l'effet de la dose.

Contrairement aux observations faites sur les coupes histologiques, la transcription du gène du Sft-PC n'est pas impactée par l'irradiation fractionnée, que ce soit avec des fractions de 20 Gy ou de 50 Gy, à 6 mois post-irradiation. Ces données sont cohérentes avec les données de l'expression génique obtenue lors de l'étude de l'effet de la dose à 6 mois post-irradiation. Il faut garder à l'esprit que les données d'expression génique sont une image à un temps donné de la transcription du gène. Ici, s'il n'y a pas de modifications dans la transcription du gène, cela n'implique pas forcément que le Sft-PC n'est pas impacté par l'irradiation. L'étude de l'expression génique ne donne pas d'information sur la traduction de l'ARNm, sa maturation, la séquestration éventuelle de la protéine, sa fonctionnalité ou sa sécrétion. Dans le cas du surfactant, sa sécrétion est régulée par les corps lamellaires des pneumocytes et il ne faut pas oublier que celui-ci est recyclé à 85% : il est réabsorbé, métabolisé et re-sécrété, il n'a ainsi pas besoin d'être re-synthétisé à partir du gène. De plus, les protéines du surfactant (Sft-PA, Sft-PB, Sft-PC et Sft-PD) ne représentent que 10% du surfactant pulmonaire, le reste étant composé de lipides. Ces éléments sont des pistes pour expliquer la différence entre les résultats de l'expression génique et ceux de l'analyse anatomopathologique. Pour les gènes du CCSP et du CYP2F2, marqueurs des cellules club, les deux profils d'expression sont semblables. Encore une fois, ces résultats ne sont pas tout à fait semblables à ceux de l'analyse anatomopathologique, avec une diminution de la transcription du gène de la CCSP et de CYP2F2 après irradiation à 3x20 Gy alors que d'après l'analyse anatomopathologique cette dose n'impacte pas les cellules club. Dans l'étude de l'effet du volume (3x3 mm²) et de la dose totale, à 6 mois post-irradiation l'expression des gènes de la CCSP et de CYP2F2 est revenue à des valeurs contrôles. L'analyse anatomopathologique met en avant le remodelage tissulaire qui a lieu après irradiation. Ce remodelage tissulaire transforme le tissu pulmonaire en tissu fibreux, plus rigide, composé de fibres de collagène. Au final ce remodelage tissulaire ne semble pas impacter l'expression des gènes de façon drastique.

Au niveau de l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation, globalement, les profils d'expression sont semblables à ceux observés lors de l'étude de l'effet de la dose totale, avec à 6 mois post-irradiation, une expression génique revenue à des valeurs contrôles (CXCL2, ENG, IL-1, TNF) ou une augmentation de l'expression génique dans le patch (IL-6, EMR1). EMR1 ou F4/80 est un récepteur exprimé par les macrophages. L'augmentation de l'expression génique d'EMR1 dans le patch peut être le témoin de l'infiltration des macrophages dans le patch lésionnel. Un infiltrat macrophagique important a été observé après irradiation stéréotaxique à une dose unique de 90 Gy par Lavigne et al²⁹³. D'après les données de l'effet du volume d'irradiation et de l'effet de la dose le pic inflammatoire a lieu à 1 mois post-irradiation, avec un retour à la normale au niveau de l'expression génique à 6 mois post-irradiation. Les acteurs de la réponse inflammatoire ont donc été exprimés de façon précoce. Mais ils ont totalement pu persister dans l'environnement irradié, comme les macrophages par exemple, et ont pu contribuer au remodelage tissulaire 6 mois plus tard.

Le rôle des cellules club et des pneumocytes de type II dans le développement de la fibrose pulmonaire radio-induite n'est pas influencé par le fractionnement de la dose. Même avec des doses fractionnées, l'apparition de la fibrose pulmonaire nécessite une déplétion des cellules club et une prolifération réactionnelle des pneumocytes de type II. Cependant, il a fallu doubler et tripler la BED_{3Gy} (par rapport à la valeur seuil de 100 Gy chez l'Homme). Le protocole de trois fractions de 20 Gy semble moins impacter les cellules club qu'une dose unique de 20 Gy, résultat difficile à expliquer pour l'instant. Mais un protocole d'irradiation de 3x50 Gy semble avoir un impact plus grand sur le parenchyme pulmonaire que des doses uniques de 100 ou 120 Gy, sûrement trop délétères. Les données de l'étude de l'expression génique sont cohérentes avec celles obtenues lors de l'étude du volume d'irradiation et de la dose, mais ne reflètent les transformations tissulaires observées lors de l'analyse anatomopathologique. L'ensemble de ces données peut servir de guide dans le choix du fractionnement de la dose dans le modèle d'irradiation stéréotaxique avec tumeur dont la mise en place a débuté au laboratoire, en collaboration avec l'unité INSERM 1030 de l'Institut Gustave Roussy.

Modèle d'irradiation stéréotaxique avec tumeur

L'une des perspectives de cette étude descriptive de l'influence des différents paramètres de l'irradiation est de structurer les choix de collimateur, dose, fractionnement et temps pour les études à venir sur l'irradiation stéréotaxique. Une étude intéressante à mettre en place, à la vue des résultats générés par l'étude du volume d'irradiation, de la dose totale et du fractionnement de la dose ainsi que de ceux générés par le Dr Soysouvanh et le Dr Lavigne est l'étude de la réponse du tissu sain pulmonaire en présence d'une tumeur. En effet, notre modélisation de l'irradiation stéréotaxique ne contient pas de réel volume cible, l'isocentre est placé au centre du lobe pulmonaire gauche. Or en clinique, le volume cible est occupé par la tumeur et le tissu sain ne reçoit pas la dose prescrite à l'isocentre mais une dose plus faible. De plus, même si la grande majorité des connaissances sur la radiobiologie et la radiopathologie des tissus sains a été acquise sur des modèles sans tumeur, on peut facilement imaginer que la réponse des tissus sains puisse être influencée par la présence d'une tumeur dans le volume cible.

Comme nous l'avons vu précédemment à la section 1, Du et al ont mis au point un modèle d'irradiation stéréotaxique de tumeur pulmonaire grâce au SARRP. Ils ont utilisé une lignée de souris transgéniques, mutées pour le gène *Kras*. Cette mutation a pour effet le développement spontané de tumeurs pulmonaires. Ces souris ont donc une espérance de vie limitée de 200 jours (soit 28 semaines). En ciblant ainsi une tumeur périphérique, avec 7 à 10 faisceaux de 5x5 mm² non superposés, non opposés, avec au moins 3 faisceaux non coplanaires, et en délimitant les organes à risque, ils ont apporté la preuve de concept que la modélisation de l'irradiation stéréotaxique d'une tumeur est possible. Ils ont administré trois fractions de 20 Gy ce qui leur a permis d'observer une diminution de la prolifération tumorale ainsi que l'apoptose des cellules tumorales. Même si l'irradiation a diminué la prolifération tumorale, celle-ci ne s'est pas arrêtée. Or le but d'une radiothérapie est d'arrêter la croissance tumorale ainsi que de tuer les cellules tumorales afin d'obtenir l'éradication de la tumeur. Ici il faudrait donc administrer des doses plus importantes afin d'atteindre ce contrôle tumoral. Un autre point faible dans ce modèle est l'utilisation du modèle de tumeur spontanée : en effet elles ont l'avantage de porter le même fond génétique que l'hôte mais l'inconvénient de se développer de manière multiple dans l'organe. Or le but d'un tel modèle est bien entendu l'étude de la réponse tumorale à l'irradiation stéréotaxique mais également l'étude de la réaction des tissus sains à cette irradiation en présence d'une tumeur, même si Du et al n'ont pas abordé ce point dans leur preuve de concept. Or si une seule tumeur est irradiée, les autres continuent leur croissance et impactent la survie des animaux. Ceci compromet l'observation

des réactions tardives du tissu sain. L'utilisation du collimateur 5x5 mm² est un choix qui peut être discuté. En effet, dans cette étude, le PTV représente entre 17,36% et 87,38% du volume pulmonaire de la souris, bien loin des 4% du volume pulmonaire humain que représentent les volumes d'irradiation stéréotaxique en clinique. Pour se rapprocher des volumes d'irradiation stéréotaxique, il serait plus intéressant d'utiliser le collimateur 3x3 mm².

Finalement, la modélisation de l'irradiation stéréotaxique en présence d'une tumeur est possible mais reste un défi. Le laboratoire de Radiobiologie des Expositions Médicales (LRMed) et l'unité INSERM 1030 de l'Institut Gustave Roussy essayent également de mettre en place un tel modèle. Chez la souris, un modèle d'injection orthotopique (par voie intrapulmonaire) de cellules tumorales pulmonaires a été choisi. L'avantage de ce modèle est que la tumeur se développe dans un environnement approprié. La gestion de la tumeur est l'un des challenges de cette modélisation. En effet la lignée cellulaire doit croître de manière à obtenir une tumeur de taille suffisante pour être détectée au scanner du SARRP, mais pas trop importante pour conserver un PTV restreint, et ainsi rester dans des volumes d'irradiation correspondant à la radiothérapie stéréotaxique. Il faut bien évidemment que la tumeur soit bien en place au moment du traitement et que celle-ci réponde correctement au traitement. La vitesse de croissance des cellules tumorales doit également permettre la survie des souris : si la croissance tumorale est trop rapide, cela impactera la survie des souris. Cela compromettra également l'étude des réactions tardives du tissu sain. La planification du traitement est un autre challenge. En effet, il faut trouver la dose totale et la dose par fraction adéquates pour obtenir au minimum le contrôle tumoral et au mieux l'éradication de la tumeur. Cette dose doit induire une lésion du tissu sain pulmonaire, ce qui nécessite une forte dose. Le tout sans compromettre la survie à long terme des animaux. Ce projet de thèse a déjà donné des pistes concrètes en termes de collimation et de dose pour la poursuite du projet tumeur.

Effet de la dose par fraction sur différentes lignées cellulaires pulmonaires

In vitro, afin de déterminer la réponse cellulaire aux fortes doses par fraction, différentes lignées pulmonaires ont été irradiées selon 5 protocoles de fractionnement. Ces irradiations ont été réalisées sur différents types cellulaires humains, car chaque type cellulaire répond différemment à l'irradiation. Des cellules épithéliales bronchiolaires, des cellules épithéliales bronchiques, des cellules musculaires lisses pulmonaires et des fibroblastes pulmonaires ont été sélectionnés pour cette étude. Les irradiations ont été réalisées sur un accélérateur linéaire médical (LINAC), à 4 MV, à un débit de dose de 2,5 Gy/min. Les protocoles de fractionnement sont les suivants :

- 8x5 Gy ($BED_{3Gy} = 106,6$ Gy)
- 4x7,5 Gy ($BED_{3Gy} = 105$ Gy)
- 3x9 Gy ($BED_{3Gy} = 108$ Gy)
- 2x11,3 Gy ($BED_{3Gy} = 107,7$ Gy)
- 1x16,5 Gy ($BED_{3Gy} = 107,2$ Gy)

Ces 5 protocoles ont une dose par fraction différente ainsi qu'un nombre de fractions différent. Ils ont cependant une BED_{3Gy} équivalente, allant de 105 à 108 Gy. Ils ont également une dose équivalente à 2 Gy semblable, comprise entre 63 et 64,8 Gy. Cette dose équivalente à 2 Gy est de l'ordre de grandeur de la dose totale administrée en fractionnement conventionnel pour un CBPNC. Le but ici est de mettre en avant l'effet de la dose par fraction : avec une BED_{3Gy} et une dose équivalente à 2 Gy similaires, ces protocoles devraient avoir un effet biologique très proche. Quarante-quatre gènes ont donc été choisis pour cartographier la réponse cellulaire aux fortes doses par fraction. La liste de ces gènes est donnée en annexe. Ces gènes sont impliqués dans les différents processus de la réponse à l'irradiation comme l'inflammation, la sénescence, la signalisation cellulaire, la transcription, l'apoptose, le cycle cellulaire, l'adhésion et la matrice extracellulaire. La fibrose est la conséquence d'une activation anormale et dérégulée des cellules du mésenchyme : les fibroblastes et les myofibroblastes, qui vont proliférer, se différencier et sécréter des éléments de la matrice extracellulaire. Certains des gènes sélectionnés sont donc des marqueurs mésenchymateux comme la *vimentin*, l'*alpha smooth muscle actin* (α -SMA), la *transgelin* (SM22- α), et la fibronectine. La *serpine1* n'est pas un marqueur mésenchymateux mais a été mesurée pour son rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse. Les collagènes (COL1A1, COL1A2, COL3A1), sécrétés par les fibroblastes, ont également été sélectionnés.

La mesure de l'expression de ces gènes mésenchymateux chez les cellules épithéliales permet de suivre le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui est l'un

des mécanismes impliqués dans le développement de la fibrose. L'EMT est la transdifférenciation de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses. Physiologiquement, ce processus est impliqué dans le développement et la cicatrisation. Pathologiquement, l'EMT est impliquée dans le développement de la fibrose, la tumorigénèse et le processus métastatique. L'EMT est impliquée, par exemple, dans certaines pathologies pulmonaires comme l'asthme³¹⁰, la fibrose pulmonaire idiopathique³¹¹ ou la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)³¹². L'une des principales voies de signalisation influençant cette transdifférenciation des cellules épithéliales est la voie du TGF- β mais d'autres sont également impliquées^{313,314}. L'EMT est un processus très dynamique et réversible, au cours duquel les cellules épithéliales commencent par perdre leurs jonctions intercellulaires et leur polarité. Le cytosquelette se réorganise, la motilité cellulaire augmente, la cellule change de forme et son expression génique est modifiée³¹⁵. Cette transition cellulaire représente une source importante de cellules mésenchymateuses responsables du développement fibreux.

In vitro, les deux lignées cellulaires épithéliales étudiées, des cellules bronchiques et des cellules bronchioliques, ont tendance à surexprimer les gènes mésenchymateux : l' α -SMA, la fibronectine et la vimentine, ainsi que la serpine1, impliquée dans l'EMT, par rapport aux contrôles, quel que soit le fractionnement de la dose, 7 jours après la dernière fraction. Ici, l'irradiation semble donc déclencher un changement d'expression génique des cellules épithéliales, en faveur d'une EMT. De manière assez étonnante, cette surexpression des marqueurs mésenchymateux n'est pas retrouvée lors de l'analyse de l'expression des gènes des cellules mésenchymateuses : les fibroblastes pulmonaires ne les surexpriment pas (expression proche des valeurs contrôles) et les cellules musculaires lisses ont plutôt tendance à les sous-exprimer. Certaines études ont démontré que l'irradiation pouvait déclencher l'EMT : les cellules épithéliales pulmonaires perdent leurs marqueurs épithéliaux et se différencient au fur et à mesure en myofibroblastes et expriment donc des marqueurs mésenchymateux. Almeida et al ont d'ailleurs observé ce phénomène après irradiation en thorax entier à 12 Gy dose unique ou 30 Gy en dose fractionnée : l'expression de la E-cadhérine, un marqueur épithélial, est diminuée après irradiation, et celle de la vimentine est augmentée. De plus ils ont réalisé des co-immunomarquages du Sft-PC et de l' α -SMA qui ont révélé la co-localisation des deux marqueurs dans l'alvéole. Cette co-localisation est le signe de la transition épithélio-mésenchymateuse. Récemment, Zhou et al ont également observé par immunohistochimie et western blot l'augmentation de l'expression de marqueurs

mésenchymateux, la vimentine et l' α -SMA, dans le poumon, après irradiation en thorax entier, à 20 Gy chez le rat³¹⁶. Les auteurs ont également observé une diminution de l'expression de l'E-cadhérine. Cependant, cette étude ne présente pas de co-marquage des marqueurs mésenchymateux et épithéliaux, ce qui donnerait une information sur la co-localisation des deux types de marqueurs dans la même cellule, signe de l'EMT. Lu et al ont également mesuré l'expression de ces marqueurs par westernblot, *in vitro*, sur des pneumocytes de type II de rat irradiés au cobalt 60 à une dose de 8 Gy. Ils ont observé, après irradiation, la diminution de l'expression de l'E-cadhérine et l'augmentation de la vimentine et de l' α -SMA³¹⁷. Cette étude ne comporte pas de co-marquage pour ces marqueurs. Lors des travaux de thèse du Dr Lavigne (irradiation thorax entier), réalisés au laboratoire, des co-immunomarquages ont été réalisés avec le Sft-PC et l' α -SMA ou la SM22- α . Très ponctuellement, la co-localisation de ces marqueurs a pu être observée dans l'alvéole, mais n'a pas pu être quantifiée³¹⁸. Le même co-marquage a été réalisé sur les poumons irradiés au cours de l'étude de l'effet volume et de l'effet de la dose pendant ces travaux de thèse mais cette co-localisation n'a pas été observée. Comme mentionné précédemment, l'EMT est un processus très dynamique, donc difficile à observer et la co-localisation des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux est transitoire. L'EMT est généralement liée à l'inflammation, l'observation de l'EMT nécessite donc peut être de l'étude de temps plus précoces que ceux auxquels nous nous sommes intéressés.

Un autre phénomène de transdifférenciation proche de l'EMT est impliqué dans le développement des lésions radio-induites, et a notamment été observé dans un contexte de fibrose pulmonaire radio-induite, de fibrose rectale radio-induite et de dommages vasculaires. Il s'agit de la transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT). De la même manière que l'EMT, l'EndoMT est un changement de phénotype : la cellule endothéliale perd ces marqueurs endothéliaux, par exemple : le *von Willebrand factor* (vWF), et acquiert les marqueurs du phénotype mésenchymateux. Les mêmes voies de signalisation sont impliquées dans l'EMT et l'EndoMT. Le rôle de l'EndoMT les lésions radio-induites au rectum a été mis en lumière par les travaux du Dr Mintet lors de sa thèse au LRMed. Les cellules microvasculaires intestinales humaines irradiées *in vitro* présentaient une modification de l'expression génique correspondant à l'EndoMT³¹⁹. Les auteurs ont pu mettre en évidence que l'EndoMT était un phénomène visible non seulement *in vitro* mais également *in vivo* et notamment dans un contexte de rectite radique chez l'Homme. Lavigne et al au LRMed ont ce sont intéressés aux cellules endothéliales pulmonaires et leur rôle dans le développement de la

fibrose pulmonaire radio-induite après irradiation en thorax entier. Les auteurs ont observé la co-localisation du vWF et de l' α -SMA, *in vivo*, deux semaines après l'irradiation. Aucune trace d'EndoMT n'a pu être observée à des temps plus tardifs³¹⁸. Lavigne et al ont confirmé ces observations *in vitro* avec des cellules microvasculaires de poumon (HMVEC-L), irradiées à une dose de 10 Gy et analysées sept jours après. L'analyse de l'expression des gènes a révélé une augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux et des médiateurs de la voie de signalisation du TGF- β (dont TGF- β 2). L'expression des marqueurs endothéliaux est restée inchangée par rapport aux valeurs contrôles. Lors de l'immunomarquage, les cellules étaient positives pour l' α -SMA, SM22- α et la vimentine et l'organisation de la *Vascular Endothelial Cadherin* (Ve-Cad, marqueur endothélial) était perturbée. Ces observations ont confirmé l'activation des cellules endothéliales et leur entrée en EndoMT³¹⁸. En se plaçant dans des conditions stéréotaxiques d'irradiation, Lavigne et al n'ont, cependant, pas pu observer de phénomènes d'EndoMT²⁹³. Au cours de ce projet, nous avons réalisé des co-marquages vWF/ α sma sans parvenir à observer de l'EndoMT. Une fois encore, l'étude de temps plus précoces après irradiation pourrait permettre la mise en évidence d'un processus d'EndoMT, qui est connu pour être lié aux processus inflammatoires aigus. Ces deux mécanismes, l'EMT et l'EndoMT sont donc impliqués dans la réponse aux rayonnements ionisants et notamment les processus fibrotiques, que ce soit dans le poumon ou dans le rectum. Bien que difficile à observer car très dynamique, ils sont très intéressants et pourraient être des cibles thérapeutiques intéressantes.

La fibrose se caractérise par des dépôts de fibres de collagènes au sein de la matrice extracellulaire, dus à la prolifération et à la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, ainsi que la transdifférenciation des cellules épithéliales et endothéliales en myofibroblastes. Finkelstein et al en 1994 et Rubin et al en 1995 ont montré une augmentation de l'expression des gènes des collagènes I et III après irradiation en thorax entier chez la souris^{93,320}. Les gènes des collagènes, COL3A1, COL1A2 et COL1A1 ont donc été mesurés. Les gènes des collagènes présentent globalement le même profil d'expression que les gènes mésenchymateux mentionnés précédemment. Les gènes des collagènes sont surexprimés par les cellules épithéliales bronchiques et très largement surexprimés par les cellules épithéliales bronchioliques, corroborant l'hypothèse de l'EMT. Ils sont exprimés à des valeurs proches des valeurs contrôles par les fibroblastes, ce qui est assez surprenant. Les cellules musculaires lisses ont, elles, tendance à sous exprimer les gènes des collagènes.

Des gènes du cycle cellulaire ont également été mesurés pour les quatre lignées. Les cellules bronchiques, bronchioliques, musculaires lisses et les fibroblastes montrent une sous-expression de la *cyclin-dependent Kinase 1* (CDK1) et de la *lamin B1* (LMNB1) marque de l'arrêt radio-induit du cycle cellulaire en phase G1, ce quel que soit le protocole d'irradiation. Les gènes marqueurs de la sénescence, comme p16, p21 et la *serpine1*, sont également surexprimés par toutes les lignées, indépendamment du protocole d'irradiation. Les protéines p16 et p21 sont des *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors* (CDKI). Les différentes étapes du cycle cellulaires sont régulées par des complexes protéiques composés des *cyclin* et des *Cyclin-Dependent Kinase* (CDK). Les CDKI inhibent la formation de ces complexes cyclin-CDK. L'implication de la protéine p21, dont l'expression est sous le contrôle de la protéine p53, dans les processus de sénescence a été montré par Noda et al³²¹. La protéine p16 est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1³²². Les travaux du Dr Soysouvanh au LRMed ont montré que l'irradiation pulmonaire en conditions stéréotaxiques (90 Gy dose unique ou 5x20 Gy) induit l'expression de p16 dans un modèle de souris C57bl/6 transgénique p16-luc. Ce modèle permet de suivre l'expression de la protéine p16 par bioluminescence grâce à la luciférase. Il a démontré que l'expression de p16 persistait jusqu'à 21 mois post-irradiation. Les cellules exprimant des marques de sénescence comme l'expression de p16 ou l'expression de la β -galactosidase sont essentiellement observées autour du patch fibreux. Ces cellules sénescents regroupent plusieurs types cellulaires : des macrophages, des pneumocytes de type II et des cellules endothéliales. Ces travaux ont également mis en avant l'implication de la voie de signalisation de l'IL-1 dans la régulation du SASP. L'immunoréactivité du récepteur à l'IL-1, IL1R1, est augmentée au niveau du patch lésionnel. L'IL-1 est également surexprimée au niveau transcriptionnel. La *serpine1* est un gène codant pour le *Plasminogen Activator Inhibitor-1* (PAI-1). PAI-1 a également été identifié comme un marqueur et un médiateur de la sénescence, via la voie du TGF- β ³²³.

Globalement, il n'y a pas d'effet marquant de la dose par fraction sur la réponse cellulaire aux rayonnements ionisants. Ceci dit, les protocoles d'irradiation, même s'ils ont des doses par fraction très différentes, possèdent la même BED_{3Gy}. Des protocoles de fractionnement avec une BED_{3Gy} identique devraient avoir un effet biologique proche, quelle que soit la dose par fraction. Au final, c'est ce qu'on observe ici, à BED_{3Gy} constante, la dose par fraction n'influe pas l'expression des gènes de manière drastique. L'effet biologique des cinq protocoles est proche. La BED semble donc être un paramètre robuste du modèle linéaire quadratique, en tout cas *in vitro*. Cela fait sens puisque le modèle linéaire quadratique a été

construit à partir de données acquises *in vitro*, notamment à partir des résultats de tests de clonogénicité réalisés sur des lignées cellulaires saines ou cancéreuses²¹⁷. Cependant, nous avons vu avec les résultats de l'étude de l'effet du fractionnement de la dose chez la souris, que la BED n'est pas aussi robuste *in vivo*. Notamment avec ce résultat étonnant sur les cellules club : la perte cellulaire était plus importante à 1x20 Gy, avec une BED_{3Gy} de 153 qu'à 3x20 Gy avec une BED_{3Gy} de 460. Il faut tout de même avoir en tête qu'*in vivo*, on fait face à un organisme dans sa globalité, donc à un système biologique intégré, complexe, avec des variabilités importantes. La BED est donc probablement moins bien adaptées aux études *in vivo* qu'aux études *in vitro*. L'efficacité clinique de la radiothérapie stéréotaxique s'explique par une « nouvelle radiobiologie » : les mécanismes radiobiologiques de réponse aux fortes doses par fraction diffèrent de ceux observés conventionnellement. Notamment avec l'apparition de l'apoptose endothéliale pour des doses supérieures à 8/10 Gy^{223,239}. Actuellement cette « nouvelle radiobiologie » des fortes doses par fraction alimente une controverse quant à la validité du modèle linéaire quadratique^{210,211,213,218}. Cette controverse remet donc en question également l'utilisation de la BED puisque celle-ci intègre certains paramètres du modèle linéaire quadratique, dont l' α/β ratio.

Une critique à faire sur cette étude porte sur les différents étalements des protocoles. En effet, l'étalement le plus court est d'une journée pour l'irradiation à 1x16,5 Gy contre 10 jours (8 jours d'irradiation + 2 jours de week-end) pour le protocole à 8x5 Gy. Nous avons quand même été attentifs à l'étalement des protocoles de fractionnement : même si celui de 8x5 Gy s'étale sur 10 jours, ceux de 4x7,5 Gy et 3x9 Gy s'étalent sur 8 jours. Plus la fraction était importante, plus le temps entre les fractions a été allongé. Le protocole de deux fractions de 11,3 Gy est lui étalé sur 5 jours. L'étalement du traitement ou facteur temps est un facteur toujours difficile à prendre en compte *in vitro*. On sait néanmoins que le facteur temps est un facteur pouvant largement influencer la réponse à l'irradiation en clinique. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 6, section 1 de l'introduction, ce facteur temps peut influencer deux des 5Rs de la radiobiologie :

- la réparation des dommages à l'ADN, de l'ordre des minutes/heures
- la régénération, de l'ordre des jours/semaines

De par ces deux paramètres, l'étalement du traitement en radiothérapie est très important pour la tumeur ou les tissus sains à réponse précoce. L'effet biologique du traitement risque d'être diminué si l'étalement du traitement augmente : cela laisse le temps aux cellules tumorales clonogènes de régénérer la tumeur. Il faudra dans ce cas considérer une augmentation de la

dose pour compenser le phénomène. Mais le facteur temps est un facteur complexe en radiothérapie. D'ailleurs, il est absent du modèle linéaire quadratique. Son absence n'a pas d'incidence lorsque l'on considère un tissu à réponse tardive, le facteur temps ayant peu d'influence sur ces tissus. Le problème est qu'il n'y a pas de modèle mathématique permettant de retranscrire ce phénomène complexe¹⁸⁶.

Perspective directe, en cours au laboratoire :
implication des macrophages dans le
développement des lésions pulmonaires radio-
induites

Nous avons vu dans le chapitre 6, section 4 que le compartiment immunitaire a un impact sur la réponse aux fortes doses des tissus tumoraux. Il en a également un sur la réponse des tissus sains aux fortes doses et le développement des effets secondaires après radiothérapie. Nous avons vu précédemment, aux chapitres 1, 2 et 4, que les macrophages font partie des cellules résidentes de l'alvéole et du parenchyme pulmonaire. Ils sont essentiels à l'homéostasie pulmonaire et sont recrutés et activés en cas d'agression, comme par exemple après irradiation. Ils contribuent alors à la réponse du tissu pulmonaire sain aux rayonnements ionisants mais leur rôle reste à élucider. Les travaux de Meziani et al ont récemment mis en lumière l'implication des macrophages dans le développement de la fibrose pulmonaire radio-induite grâce à un modèle préclinique d'irradiation en thorax entier à une dose de 16 Gy¹³¹. Tandis que les monocytes et les neutrophiles infiltrent l'alvéole pulmonaire lors de la phase inflammatoire précoce, les macrophages alvéolaires et interstitiels s'accumulent durant la phase tardive du développement de la fibrose pulmonaire radio-induite. D'ailleurs, l'irradiation n'impacte pas les macrophages alvéolaires et interstitiels de la même manière : les macrophages interstitiels acquièrent un profil plutôt anti-inflammatoire alors que les macrophages alvéolaires portent des marqueurs anti-inflammatoires et pro-inflammatoires. De plus, les macrophages interstitiels expriment l'Arginase 1 (Arg-1) 40 fois plus après irradiation dans les zones fibreuses que les macrophages alvéolaires et 400 fois plus par rapport aux macrophages interstitiels non irradiés. Ces macrophages interstitiels sont capables d'activer des fibroblastes non irradiés en myofibroblastes sécrétant des composants de la matrice extracellulaire et du TGF- β 1 lorsqu'ils sont en co-culture *in vitro*. La déplétion spécifique de ces macrophages interstitiels activés par l'irradiation permet d'inhiber le développement de la fibrose pulmonaire radio-induite¹³¹. Les macrophages jouent donc un rôle central dans la mise en place de la fibrose pulmonaire. Le volume d'irradiation étant déterminant dans la réponse pulmonaire à l'irradiation, explorer le rôle des macrophages dans le contexte de l'irradiation en conditions stéréotaxiques pourrait aboutir à des résultats très différents.

Parmi les lésions observées après irradiation stéréotaxique pulmonaire avec notre modèle, nous avons pu observer l'apparition de clusters de macrophages dans le parenchyme pulmonaire ainsi que l'apparition d'une écharpe de macrophages de type spumeux autour de la lésion focale. Les macrophages sont des acteurs du développement de la fibrose : ils peuvent recruter d'autres cellules immunitaires et jouent un rôle dans l'inflammation et la réponse tissulaire pulmonaire. Ces données ont donc donné jour à un nouveau sujet de thèse,

qui sera réalisé au laboratoire par Sarah Braga-Cohen (2019-2022), et qui consistera à identifier et comprendre le rôle des sous-populations de macrophages dans l'initiation et le développement des lésions pulmonaires radio-induites par une irradiation stéréotaxique chez la souris.

Le phénotype des macrophages formant les clusters dans le parenchyme et l'écharpe autour de la lésion sera identifié par immunohistochimie, puis, par cytométrie en flux, sur des macrophages alvéolaires prélevés par lavage broncho-alvéolaire et des macrophages interstitiels obtenus par digestion du tissu pulmonaire. Le but sera ensuite de déterminer l'origine des macrophages observés : prolifèrent-ils sur place ou sont-ils recrutés à partir de la circulation sanguine ? Pour répondre à cette question, un modèle de parabiose a été mis en place au laboratoire. La parabiose consiste à connecter chirurgicalement la circulation sanguine de deux souris, une souris sauvage et une souris exprimant la Green Fluorescent Protein (GFP, une protéine verte que l'on peut suivre par immunofluorescence), afin de faire circuler dans le système sanguin de la souris sauvage des cellules GFP+. En irradiant le poumon de la souris sauvage et en suivant les macrophages positifs à la GFP, l'origine circulante des macrophages présents dans le tissu irradié pourra être confirmée. Grâce à l'utilisation d'une souche de souris knock-out pour le gène CCR2, gène impliqué dans le recrutement des monocytes, l'impact d'un déficit de recrutement des monocytes dans la gravité des lésions pourra être évalué par comparaison avec des souris sauvages. Enfin, le modèle choisi pour ce futur projet de thèse a été basé sur les résultats obtenus au cours de mon projet. Les études seront faites après irradiation avec le collimateur 3x3 mm² à des doses de 60 Gy (effets précoces modérés et évolution vers la fibrose) et 80 Gy (effets précoces sévères puis évolution vers la fibrose).

Conclusion Générale

De façon générale, ce projet a permis d'apporter de nouvelles connaissances radiobiologiques et radiopathologiques sur l'irradiation stéréotaxique. En effet, cette pratique est de plus en plus utilisée en clinique car elle s'est révélée être très efficace pour les patients inopérables atteints d'un cancer bronchopulmonaire non à petites cellules de stade précoce. La modélisation de l'irradiation stéréotaxique chez la souris faisait face à un verrou technologique qui a sauté avec l'acquisition du SARRP. Le SARRP nous a permis de mettre en place un modèle d'irradiation stéréotaxique pertinent par rapport à la pratique clinique.

Cette étude descriptive a permis d'étudier l'impact du volume d'irradiation, de la dose totale et du fractionnement de la dose. Ainsi, le volume d'irradiation impacte la survie des souris qui est compromise par l'apparition de la bronchiolite oblitérante. Le volume irradié par le collimateur 3x3 mm² semble être une limite pour l'apparition de la bronchiolite oblitérante. Globalement, l'irradiation avec le collimateur 1 mm de diamètre n'a que très peu de conséquences sur le parenchyme pulmonaire et ne permet pas d'observer de la fibrose pulmonaire radio-induite. Mais les irradiations avec le collimateur 1 mm de diamètre ont mis en avant la réaction globale du parenchyme pulmonaire : en effet, même si il ne provoque pas de lésion, l'épaississement des septa alvéolaires et la réponse inflammatoire sont présents dans l'ensemble des poumons. Au contraire, les volumes irradiés avec les collimateurs 7x7 mm² et 10x10 mm² sont trop importants pour pouvoir observer les effets tardifs. Cependant, les volumes d'irradiation restreints, comme ceux obtenus avec le collimateur 3x3 mm², sont bien supportés par le poumon. En effet, le poumon possède une organisation tissulaire dite en parallèle, avec des sous-unités fonctionnelles indépendantes les unes des autres. C'est ce qui permet au poumon de supporter des points chauds d'irradiation sur de petits volumes. Le collimateur 3x3 mm² induit une fibrose pulmonaire radio-induite. Cette fibrose résulte d'une prolifération des pneumocytes de type II et une perte suffisante des cellules club. Le collimateur 3x3 mm² permet non seulement l'étude des effets précoces et tardifs de l'irradiation stéréotaxique, mais aussi une forte escalade de dose. Cette forte escalade de dose a mis en lumière la dose unique de 60 Gy, pour laquelle les réactions précoces du parenchyme pulmonaire n'étaient pas visibles sur les images acquises au μ CT. Néanmoins, six mois plus tard, la fibrose pulmonaire était bien visible sur les images μ CT. Cette dose est très intéressante du point de vue physiopathologique car l'enchaînement des réactions précoces et tardives est proche des observations faites en clinique chez l'Homme. Cette escalade de dose, de 20 à 120 Gy, a mis en évidence un décalage dans le temps de la réaction de cicatrisation aux très fortes doses. Quand la lésion est trop sévère, la réaction proliférative des

pneumocytes de type II arrive plus tardivement. Cependant, l'administration de dose unique ne fait pas partie de la pratique clinique en radiothérapie stéréotaxique thoracique. C'est pourquoi l'étude du fractionnement de la dose était nécessaire. Une BED_{3Gy} de plus de 100 Gy est associée à un risque de développer des effets tardifs sévères. Ici il a fallu doubler et tripler cette BED pour pouvoir observer de la fibrose pulmonaire radio-induite chez la souris.

Ces travaux montrent qu'une modélisation préclinique de l'irradiation stéréotaxique pertinente d'un point de vue clinique est possible. On sait déjà que les réponses de la tumeur, des tissus sains ainsi que de l'immunité sont différentes aux fortes doses par fraction de celles bien caractérisées en radiothérapie conventionnelle. Le SARRP nous permet de diminuer les volumes d'irradiation et de nous placer dans des conditions stéréotaxiques. C'est-à-dire d'exposer de petits volumes à de très fortes doses et donc nous permettre de nous placer dans des conditions cliniques. Cependant la question des doses administrées chez le rongeur, bien loin de celles administrées clinique, reste l'un des points faibles de ce notre modèle. Pour pouvoir générer de la fibrose pulmonaire radio-induite dans de si petits volumes chez le rongeur, il faut forcément administrer une forte dose. Une dose beaucoup plus forte que les 20 Gy administrés en thorax entier. Il faut aussi garder en tête que ce n'est pas le patch lésionnel généré lors de l'irradiation qui nous intéresse mais plutôt la réaction de la zone se trouvant autour, au niveau de l'isodose 30%. En effet, en clinique, le volume cible correspondant au patch lésionnel dans notre modèle est occupé par une tumeur. De plus, les résultats obtenus en clinique montrent que ce sont les volumes recevant une dose moins forte qui sont prédictifs du développement de la fibrose pulmonaire radio-induite, comme le V_{5Gy} et le V_{20Gy} . D'où l'objectif du laboratoire et de l'unité INSERM 1030 de l'Institut Gustave Roussy de développer un modèle d'irradiation stéréotaxique avec une tumeur, en arc-thérapie chez la souris.

Annexes

Annexe 1 : Modélisation préclinique de l'irradiation stéréotaxique pulmonaire en arc-thérapie, guidée par l'image, associée à un logiciel de planification de traitement chez la souris C57bl/6JRJ.

La mise en place de notre modèle préclinique d'irradiation stéréotaxique pulmonaire en arc-thérapie chez la souris a été possible grâce au *Small Animal Radiation Research Platform* (SARRP, Xstrahl Ltd., UK). Le SARRP est un irradiateur du petit animal de haute précision guidé par l'image. Il est composé d'un tube à rayon X classique utilisant des tensions allant de 30 à 225 kV et d'une cible en tungstène.

La filtration inhérente du SARRP est de 0,8 mm de béryllium et deux filtrations additionnelles peuvent être utilisées : 0,15 mm de cuivre pour l'irradiation et 1 mm d'Aluminium pour l'imagerie. Le tube à rayon X est couplé à un bras rotatif pouvant tourner à plus ou moins 180°. En conditions de traitement le SARRP permet de réaliser des irradiations en faisceau unique, multifaisceaux ou en arc-thérapie grâce à la rotation du tube, ou en champs non coplanaires grâce à la rotation du lit de traitement. L'acquisition des images scanner repose sur la technique de *Cone Beam Computed Tomography* (CBCT). Les images sont acquises grâce à un détecteur plan embarqué et à la rotation de la table de traitement. Le SARRP dispose également d'un système d'imagerie portale grâce à une caméra CCD. Pour finir, le SARRP est associé à un logiciel de planification de traitement, Muriplan®. Ce logiciel possède un algorithme de superposition-convolution corrigés pour les basses énergies. Il permet d'obtenir la distribution de la dose en trois dimensions ainsi que les histogrammes dose-volume. La mise en place des différentes configurations d'irradiation, le pilotage du SARRP ainsi toute la dosimétrie ont été effectués par le Docteur Morgane Dos Santos, physicienne de l'IRSN.

Dans notre modèle préclinique d'irradiation, la première étape du traitement est l'acquisition des images CBCT afin de placer l'isocentre de notre volume cible. Les images CBCT ont été acquises en utilisant un champ de 20x20 cm², une haute tension de 60 kV, une intensité de 0,8 mA, avec une filtration inhérente de 0,8 mm de béryllium et une filtration additionnelle de 1 mm d'aluminium, en faisceau continu, avec une rotation à 360° du lit de traitement se situant entre le tube à rayon X et le détecteur (Figure 28A). 236 projections sont obtenues de cette façon et une image 3D de l'animal est reconstruite. Ces images de l'animal sont transférées au logiciel Muriplan® (Xstrahl, Ltd) où la balistique du traitement est déterminée et la dose calculée. L'image est segmentée en différentes sections : l'air, le poumon, le tissu adipeux, les tissus mous et les os. Ensuite l'isocentre est positionné au centre du poumon gauche. Le collimateur est choisi (Figure 28B) et le faisceau est calibré pour délivrer la dose d'intérêt à l'isocentre, en utilisant le collimateur d'intérêt sur un lit de traitement immobile, en arc-thérapie de 240°, de -120° à +120°, pour éviter au maximum l'irradiation du cœur. Les irradiations sont réalisées avec une tension de 220 kV et une intensité de 13 mA en utilisant cette

fois ci la filtration additionnelle de 0,15 mm de cuivre. Ce couple haute tension-intensité est la configuration référence pour le calcul de la dose par le logiciel Muriplan®. La précision de l'irradiation dans la configuration de traitement choisie est assurée par les histogrammes dose-volume et les courbes isodoses calculés par le logiciel Muriplan®.

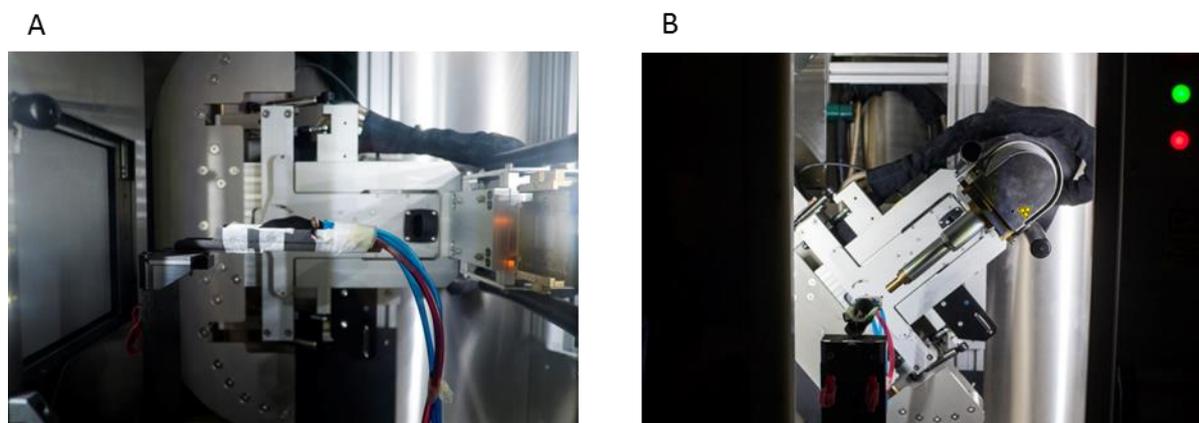


Figure 28 : Le SARRP en configuration A : d'imagerie, avec le détecteur sur la gauche et la source à droite, B : d'irradiation avec le collimateur (source : médiathèque IRSN)

1. Etude de l'effet du volume d'irradiation

Les irradiations pour l'étude de l'effet du volume d'irradiation ont été réalisées en dose unique de 90 Gy avec 4 collimateurs différents : 1 mm de diamètre, 3x3 mm², 7x7 mm² et 10x10 mm². Les courbes isodoses calculées pour une dose de 90 Gy sont présentées Figure 29. Les courbes isodoses correspondent aux volumes où sont déposés 10% et 20% de la dose en vert, 60% de la dose en jaune, 80% de la dose en orange, 95 et 100% de la dose en orange foncé et 105% de la dose en rouge.

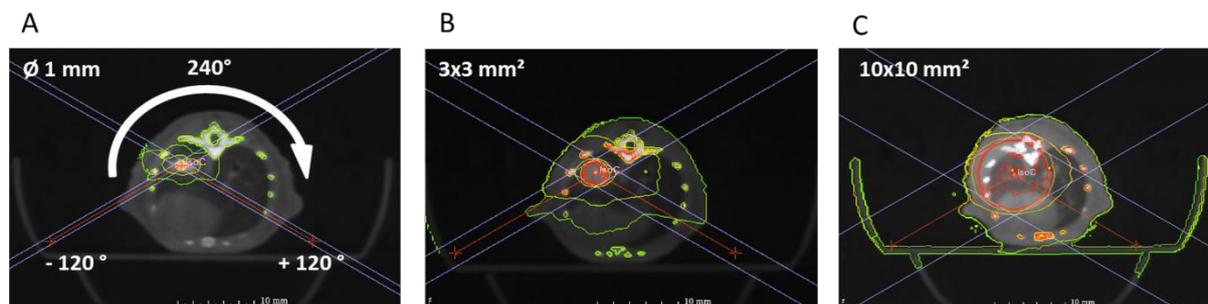


Figure 29 : Courbes isodoses calculées par le logiciel Muriplan® lors de la planification du traitement pour une dose unique de 90 Gy. (Source : Morgane Dos Santos, IRSN)

A : collimateur 1 mm de diamètre, B : collimateur 3x3 mm², C : collimateur 10x10 mm²

Les différents volumes irradiés : le volume cible, le poumon gauche, le poumon droit et le cœur sont contourés sur les images scanner et permettent une reconstruction en 3D de ces volumes. Le contourage de ces volumes associé aux courbes isodoses permet au logiciel Muriplan® de calculer les histogrammes dose-volume pour ces différents volumes. Les histogrammes dose-volume de l'étude de l'effet du volume d'irradiation sont présentés Figure 30.

Les doses moyennes délivrées dans les différents volumes délimités par contourage des images volumétriques 3D sont calculées à partir des histogrammes dose-volume. Les doses moyennes au poumon gauche (en excluant le volume cible), au poumon droit et au cœur, pour une dose unique de 90 Gy, avec les différents collimateurs sont présentées tableau 5.

Collimateur	Ø1 mm	3x3 mm ²	10x10 mm ²
Poumon gauche	2,50 Gy	19,20 Gy	63,50 Gy
Poumon droit	0,70 Gy	6,81 Gy	46,96 Gy
Cœur	0,40 Gy	3,74 Gy	48,72 Gy

Tableau 5 : Doses moyennes délivrées dans les différents volumes thoraciques (source : Morgane Dos Santos, IRSN)

Le temps d'irradiation pour administrer une dose unique de 90 Gy, en arc-thérapie est compris entre 2069 et 2248 secondes avec le collimateur 1 mm de diamètre, entre 2112 et 2349 secondes pour le collimateur 3x3 mm², entre 2204 et 2381 secondes pour le collimateur 7x7 mm² et entre 2074 et 2190 secondes pour le collimateur 10x10 mm². Les temps d'irradiation varient d'un collimateur à l'autre en fonction de la taille de champ et des différents tissus traversés.

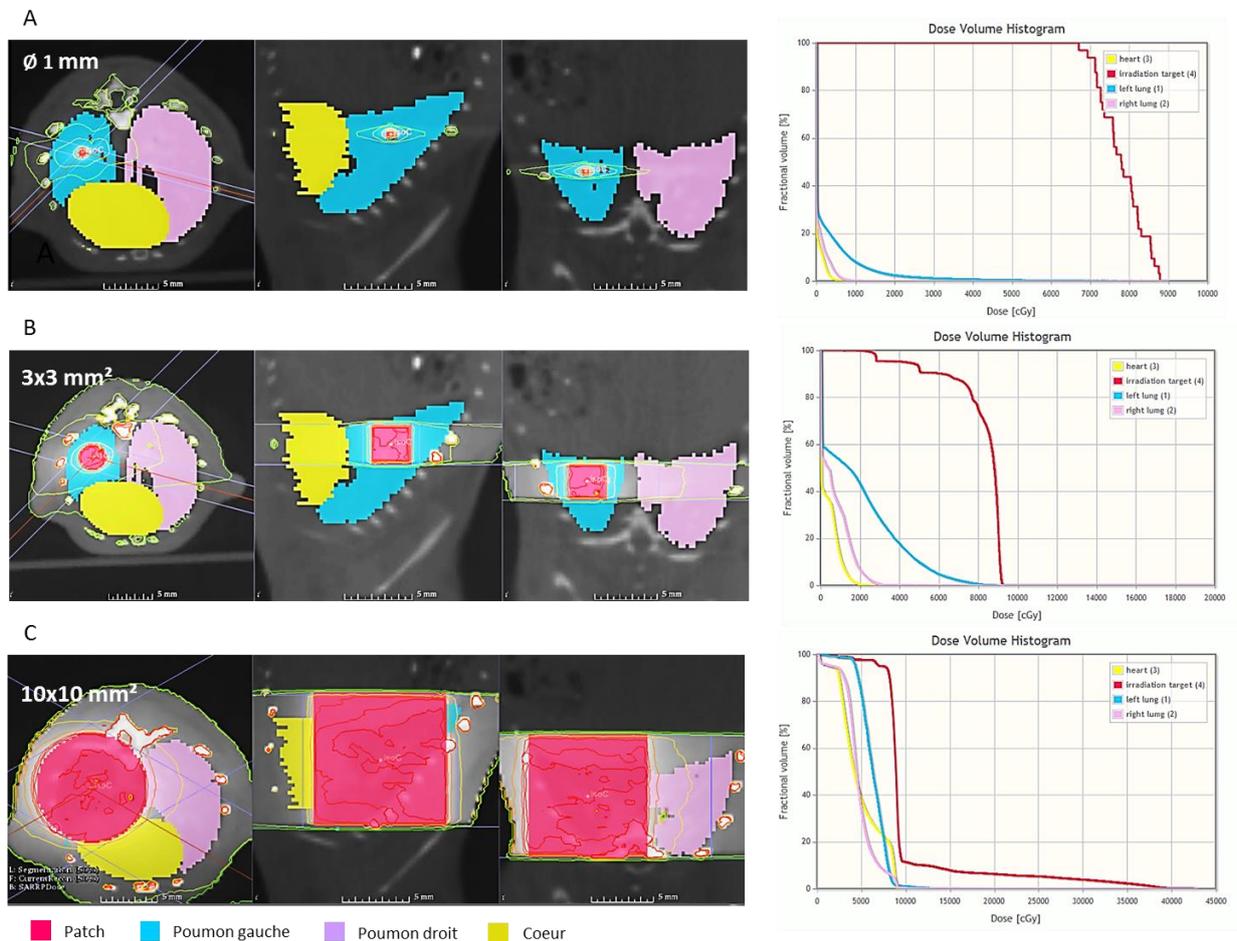


Figure 30 : Contourage des différents volumes et histogrammes dose-volume obtenus pour des irradiations en dose unique de 90 Gy avec les collimateurs 1 mm de diamètre (A), 3x3 mm² (B) et 10x10 mm² (C) source : Morgane Dos Santos, IRSN

Les données mentionnées ci-dessus ne sont pas disponibles pour le collimateur 7x7 mm² car ce collimateur a été conçu par la physicienne Morgane Dos Santos. Il n'est donc pas enregistré dans le logiciel de plan de traitement. Toutes les données concernant le collimateur 7x7 mm², sa conception et sa dosimétrie sont disponibles dans les données supplémentaires de l'article « *Preclinical model of arc therapy stereotactic ablative lung irradiation in the mouse : volume and dose effects* » (Bertho et al, manuscrit soumis à IJROBP).

D'après le contourage effectué sur les images CBCT, les volumes d'irradiation ont été calculés. Le volume pulmonaire total (poumon droit et poumon gauche) de la souris est d'environ 0,5 cm³. La distribution de la dose en arc-thérapie génère un volume d'irradiation de forme cylindrique. Les volumes d'irradiation des différents collimateurs sont présentés tableau 6.

	Volume irradié (cm³)	Pourcentage du volume pulmonaire de la souris
Ø1 mm	0.000785	0.157%
3x3 mm²	0.021	4,2%
7x7 mm²	0.269	53,8%
10x10 mm²	0.785	100%

Tableau 6 : Volume irradié par les différents collimateurs (source : Morgane Dos Santos, IRSN)

2. Étude de l'effet de la dose totale

Les irradiations de l'étude de l'effet de la dose ont été réalisées avec le collimateur 3x3 mm², en dose unique de 20, 40, 60, 80, 100 ou 120 Gy. Les courbes isodose, le contourage des différents volumes d'intérêt (patch, poumon gauche, poumon droit et cœur) ainsi que les histogrammes dose-volume sont présentés Figure 31.

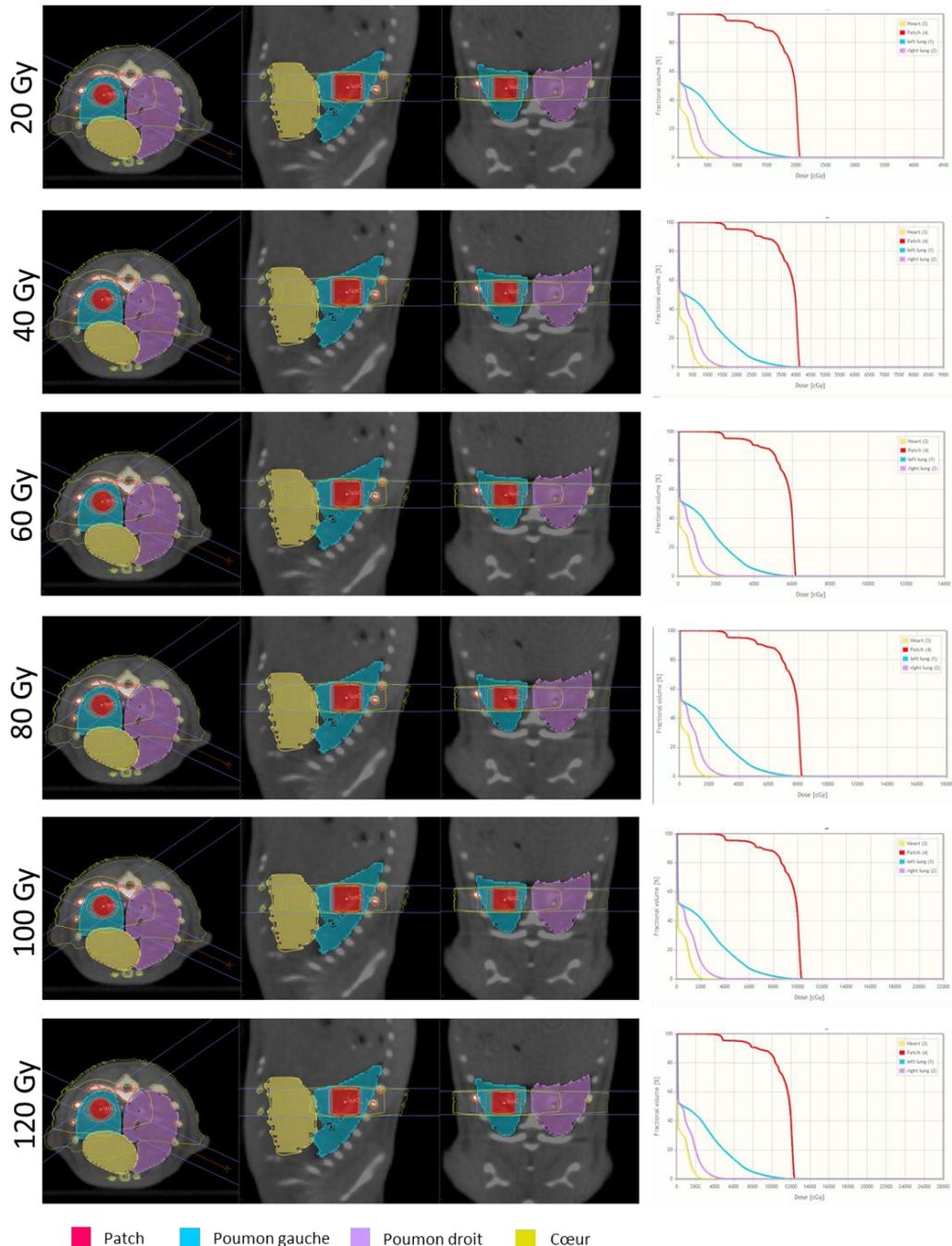


Figure 31 : Courbes isodose, contourage des différents volumes d'intérêt et histogrammes dose-volume de l'étude de l'effet de la dose (source : Morgane Dos Santos, IRSN)

A partir de ces données, les doses moyennes reçues par le poumon gauche (en dehors du volume cible), le poumon droit et le cœur ont été calculées pour les différentes doses administrées au volume cible avec le collimateur 3x3 mm². Les doses moyennes sont présentées tableau 7.

Dose à la cible	20 Gy	40 Gy	60 Gy	80 Gy	100 Gy	120 Gy
Poumon gauche	3.97 Gy	7.94 Gy	11.91 Gy	15.88 Gy	19.85 Gy	23.83 Gy
Poumon droit	1.16 Gy	3.22 Gy	4.83 Gy	6.44 Gy	8.05 Gy	9.67 Gy
Cœur	0.76 Gy	1.53 Gy	2.30 Gy	3.07 Gy	3.83 Gy	4.60 Gy

Tableau 7 : Doses moyennes délivrées dans les différents volumes thoraciques lors de l'étude de l'effet de la dose (source : Morgane Dos Santos, IRSN)

La figure 32 montre les différentes doses moyennes pour chaque volume d'intérêt : dose prescrite, dose au volume cible, dose moyenne au poumon gauche, au poumon droit et au cœur. Cette représentation graphique permet de se rendre également compte du débordement de la dose en dehors du volume cible, pour un même volume d'irradiation (3x3 mm²), en fonction de la dose prescrite.

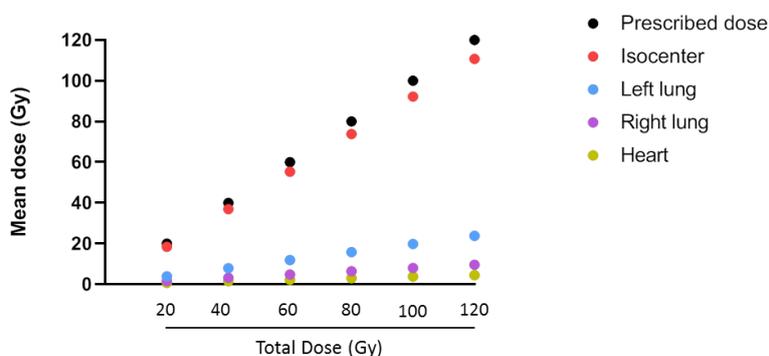


Figure 32 : dose prescrite, dose à l'isocentre et aux différents volumes d'intérêt de l'étude de l'effet de la dose totale

Les temps d'irradiation pour les différentes doses administrées sont récapitulés tableau 8.

Dose totale au volume cible	Temps d'irradiation (s)
20 Gy	485 - 514
40 Gy	974 - 1041
60 Gy	1473 - 1538
80 Gy	1969 - 2038
100 Gy	2453 - 2591
120 Gy	2943 - 3123

Tableau 8 : Temps d'irradiation pour les différentes doses d'intérêt de l'étude de l'effet de la dose totale (source : Morgane Dos Santos, IRSN)

3. Etude de l'effet du fractionnement de la dose

Le challenge de ce projet d'étude sur le fractionnement de la dose a été le repositionnement des souris. Le Docteur Dos Santos a donc conçu un lit pour le repositionnement des souris. Ainsi, les souris étaient dans une position reproductible : sur le ventre, les pattes écartées de la même distance (Figure 33).

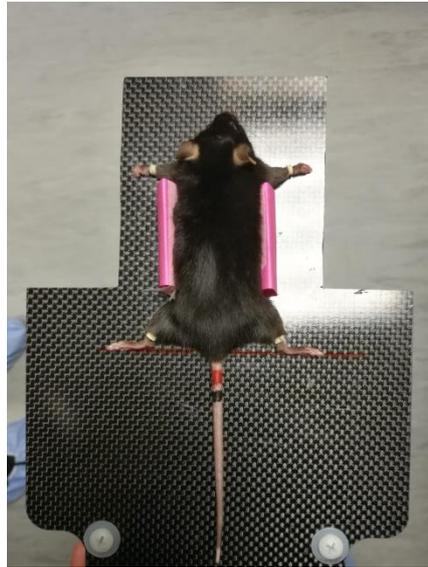


Figure 33 : Lit de repositionnement mis au point par Morgane Dos Santos pour l'étude du fractionnement de la dose.

Le repositionnement des animaux a ensuite été ajusté grâce aux images CBCT acquises avec le SARRP. A chaque fraction, une image CBCT a été acquise, les courbes isodoses calculées puis cette image a été superposée à celle acquise lors de la première fraction. L'image CBCT et les courbes isodoses guidaient ainsi l'ajustement de la position de l'animal (Figure 34).

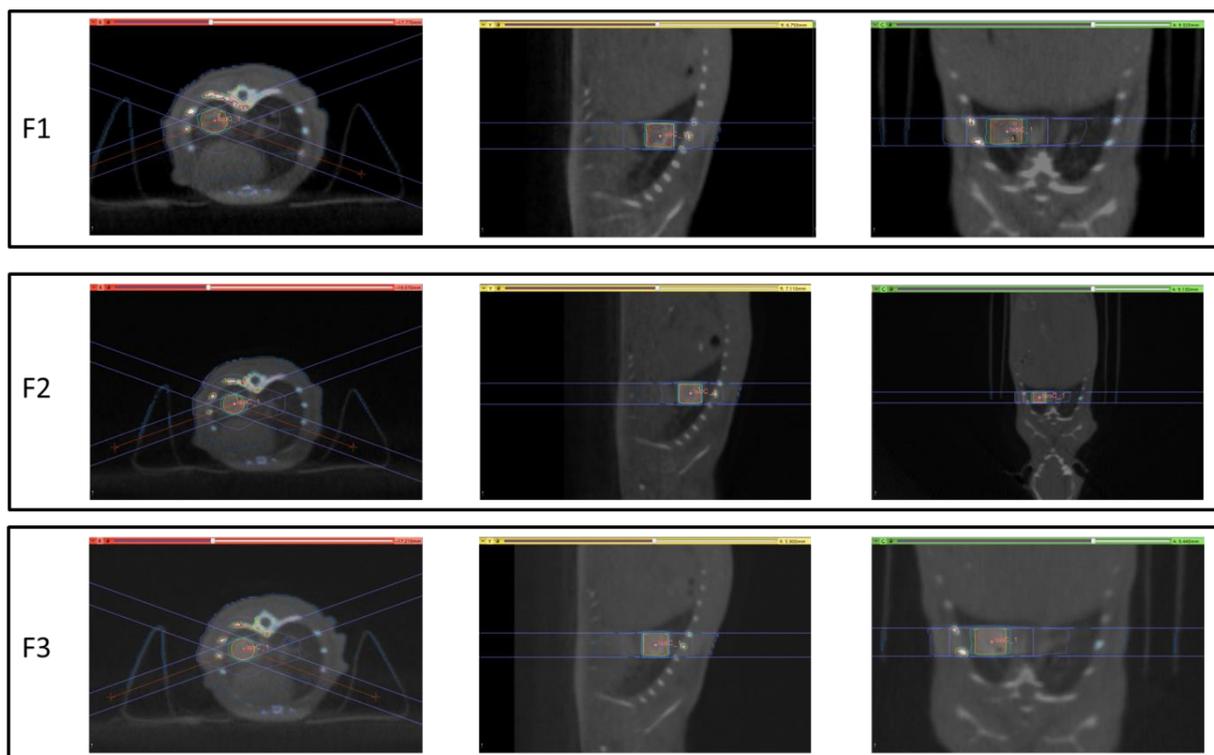


Figure 34 : Images CBCT acquises au SARRP permettant le repositionnement des animaux

F1 : fraction 1, F2 : fraction 2, F3 : fraction 3. Images acquises pour la souris F7 n°1 irradiée à 3x50 Gy (source : Morgane Dos Santos)

Annexe 2 : Liste des gènes mesurés pour l'étude in vivo de l'effet de l'irradiation stéréotaxique pulmonaire

Gene	Fonction	Reference
clara/club cell secretory protein (<i>ccsp</i>)	Exprimé par les cellules club	Mm00442046
cytochrome p450 2F2 (<i>cyp2f2</i>)	Exprimé par les cellules club	Mm00484087
forkhead box J1 (<i>foxj1</i>)	Exprimé par les cellules ciliées, impliqué dans la ciliogénèse	Mm01267279
surfactant protein C (<i>sftpc</i>)	Exprimé par les pneumocytes de type II, impliqué dans l'homéostasie alvéolaire	Mm00488144
endoglin (<i>eng</i>)	Récepteur du TGF- β impliqué dans l'angiogénèse	Mm00468252
interleukin 1-beta (<i>il-1 beta</i>)	Cytokine exprimée pendant la phase aiguë de la réponse inflammatoire par différents types cellulaires	Mm00434228
interleukin 6 (<i>il-6</i>)	Cytokine exprimée pendant la phase aiguë de la réponse inflammatoire par différents types cellulaires	Mm00446190
tumor necrosis factor (<i>tnf</i>)	Cytokine exprimée pendant la phase aiguë de la réponse inflammatoire, sécrété par les macrophages	Mm00443258
adhesion G protein-coupled receptor 1 (<i>emr1</i>)	Récepteur exprimé par les macrophages	Mm00802529
c-x-c motif chemokine ligand 2 (<i>cxcl-2</i>)	Chimiokine sécrétée par les macrophages, chimioattractant des neutrophiles	Mm00436450

Tableau 9 : gènes sélectionnés pour les études in vivo de l'effet du volume d'irradiation, de la dose totale et du fractionnement de la dose.

Annexe 3 : Liste des gènes sélectionnés pour la conception de carte l'étude in vitro de l'effet de la dose par fraction

Gène			Référence
<i>18S</i>	Eukaryotic 18S RNA	Gène de ménage	Hs99999901_s1
<i>ACTB</i>	β -actin	Gène de ménage	Hs99999903_m1
<i>PPIA</i>	Peptidylprolyl isomérase	Gène de ménage	Hs99999904_m1
<i>TBP</i>	TATA-box binding Protein	Gène de ménage	Hs00427620_m1
<i>ACTA2</i>	α -SMA : Alpha Smooth Muscle Actin	Sénescence	Hs00909449_m1
<i>CDKN1A</i>	p21 Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A	Sénescence	Hs00355782_m1
<i>CDKN2A</i>	p16 Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A	Sénescence	Hs00923894_m1
<i>GADD45A</i>	Growth Arrest and DNA Damage inducible alpha	Sénescence	Hs00169255_m1
<i>LMNB1</i>	Lamin B1	Sénescence	Hs01059210_m1
<i>TAGLN</i>	SM22 α - Transgelin	Sénescence	Hs00162558_m1
<i>TGFB1</i>	Transforming Growth Factor beta 1	Sénescence	Hs00998133_m1
<i>PAI1</i>	SERPINE1 Serpin family E member 1	Sénescence	Hs01126606_m1
<i>CDH1</i>	Cadherin 1	Adhésion	Hs01023895_m1
<i>FN1</i>	Fibronectin 1	Adhésion	Hs01549976_m1
<i>ICAM1</i>	InterCellular Adhesion Molecule 1	Adhésion	Hs00164932_m1
<i>VIM</i>	Vimentin	Adhésion	Hs00958111_m1
<i>CCL2</i>	C-C motif chemokine ligand 2	Inflammation	Hs00234140_m1
<i>CCL3</i>	C-C motif chemokine ligand 3	Inflammation	Hs00234142_m1
<i>CXCL12</i>	C-X-C motif chemokine ligand 12	Inflammation	Hs00171022_m1
<i>CXCL2</i>	C-X-C motif chemokine ligand 2	Inflammation	Hs00601975_m1
<i>CXCR4</i>	C-X-C motif chemokine ligand 4	Inflammation	Hs00237052_m1
<i>IL10</i>	Interleukin 10	Inflammation	Hs00961622_m1
<i>IL1A</i>	Interleukin 1A	Inflammation	Hs00174092_m1
<i>IL1B</i>	Interleukin 1B	Inflammation	Hs01555410_m1
<i>IL6</i>	Interleukin 6	Inflammation	Hs00985639_m1
<i>IL8</i>	Interleukin 8	Inflammation	Hs00174103_m1
<i>BRCA</i>	BRCA1, DNA repair associated	Cycle cellulaire	Hs01556193_m1
<i>CDK1</i>	Cyclin-Dependent Kinase 1	Cycle cellulaire	Hs00938777_m1
<i>CHEK2</i>	Checkpoint kinase 2	Cycle cellulaire	Hs00200485_m1
<i>PPMD1</i>	WIP1 - Protein Phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ Dependent 1D	Cycle cellulaire	Hs01013292_m1
<i>BAX</i>	BCL2 associated X, apoptosis regulator	Apoptose	Hs00180269_m1
<i>BCL2</i>	BCL2, apoptosis regulator	Apoptose	Hs00608023_m1
<i>BIRC5</i>	Baculoviral IAP repeat containing 5	Apoptose	Hs00978503_m1
<i>FAS</i>	Fas cell surface death receptor	Apoptose	Hs00236330_m1
<i>PTEN</i>	Phosphatase and Tensin homolog	Apoptose	Hs02621230_s1
<i>PRKAA1</i>	Protein Kinase AMP-Activated Catalytic Subunit alpha 1	Signalisation	Hs01562315_m1
<i>EGF</i>	Epidermal Growth Factor	Signalisation	Hs01099990_m1
<i>JAK2</i>	Janus kinase 2	Signalisation	Hs01078136_m1
<i>STAT3</i>	Signal Transducer and Activator of Transcription 3	Signalisation	Hs00374280_m1
<i>ATF4</i>	Activating Transcription Factor 4	Facteur de transcription	Hs00909569_g1
<i>HEY2</i>	Hes-Related family BHLH Transcription Factor with YRPW	Facteur de transcription	Hs00232622_m1

HIF1A	Hypoxia Inducible Factor 1 alpha subunit	Facteur de transcription	Hs00153153_m1
NFE2L2	NRF2 Nuclear Factor, erythroid 2 like 2	Facteur de transcription	Hs00975960_m1
COL1A1	Collagen Type I alpha 1 chain	Matrice extracellulaire	Hs00164004_m1
COL1A2	Collagen Type I alpha 2 chain	Matrice extracellulaire	Hs01028956_m1
COL3A1	Collagen Type III alpha 1 chain	Matrice extracellulaire	Hs00943809_m1
MMP2	Matrix Metallopeptidase 2	Matrice extracellulaire	Hs01548727_m1
MMP9	Matrix Metallopeptidase 9	Matrice extracellulaire	Hs00957562_m1

Tableau 10 : gènes sélectionnés pour l'étude in vitro de l'effet de la dose par fraction.

Bibliographie

1. Minnich, D. J. & Mathisen, D. J. Anatomy of the Trachea, Carina, and Bronchi. *Thorac. Surg. Clin.* **17**, 571–585 (2007).
2. Guillot, L. *et al.* Alveolar epithelial cells: Master regulators of lung homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 2568–2573 (2013).
3. Fehrenbach, H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir. Res.* **2**, 33–46 (2001).
4. Mason, R. J. Biology of alveolar type II cells. *Respirology* **11**, 12–15 (2006).
5. Johnson, M. D., Allen, L., Widdicombe, J. H., Barbry, P. & Dobbs, L. G. Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 1966–1971 (2002).
6. Ferrari, J. D. *et al.* Type I Alveolar Epithelial Cells Mount Innate Immune Responses during Pneumococcal Pneumonia. *J. Immunol.* **189**, 2450–2459 (2012).
7. Thorley, A. J. *et al.* Innate immune responses to bacterial ligands in the peripheral human Lung - Role of alveolar epithelial TLR expression and signalling. *PLoS One* **6**, (2011).
8. Wong, M. H. & Johnson, M. D. Differential Response of Primary Alveolar Type I and Type II Cells to LPS Stimulation. *PLoS One* **8**, 1–13 (2013).
9. Barkauskas, C. E. *et al.* Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. **123**, 3025–3036 (2013).
10. Bernhard, W. Lung surfactant: Function and composition in the context of development and respiratory physiology. *Ann. Anat.* **208**, 146–150 (2016).
11. Schröder, H., Sollfrank, L., Paulsen, F., Bräuer, L. & Schicht, M. Recombinant expression of surfactant protein H (SFTA3) in *Escherichia coli*. *Ann. Anat.* **208**, 129–134 (2016).
12. Schicht, M. *et al.* SFTA3, a novel protein of the lung: Three-dimensional structure, characterisation and immune activation. *Eur. Respir. J.* **44**, 447–456 (2014).
13. Griese, M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: State of the art. *Eur. Respir. J.* **13**, 1455–1476 (1999).
14. Truffert, P. *et al.* Déficit constitutionnel en protéine B du surfactant pulmonaire: présentation clinique, diagnostic histologique et moléculaire. *Arch. Pédiatrie* **7**, 641–644 (2002).
15. Stevens, T. Functional and Molecular Heterogeneity of Pulmonary Endothelial Cells. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **8**, 453–457 (2011).
16. Garbi, N. & Lambrecht, B. N. Location, function, and ontogeny of pulmonary macrophages during the steady state. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **469**, 561–572 (2017).
17. Tan, S. Y. S. & Krasnow, M. A. Developmental origin of lung macrophage diversity. *Development* **143**, 1318–1327 (2016).
18. Morales-Nebreda, L., Misharin, A. V., Perlman, H. & Scott Budinger, G. R. The heterogeneity of lung macrophages in the susceptibility to disease. *Eur. Respir. Rev.* **24**, 505–509 (2015).
19. Lohmann-Matthes, M.-L., Steinmüller, C. & Franke-Ullman, G. Pulmonary Macrophages. *Eur. Respir. J.* 629–649 (1994). doi:10.1183/09031936.94.07091678

20. European Lung Foundation. *La santé respiratoire en Europe - Faits et chiffres 2014*. (2014).
21. Pirina, P., Foschino Barbaro, M. P., Paleari, D. & Spanevello, A. Small airway inflammation and extrafine inhaled corticosteroids plus long-acting beta2-agonists formulations in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.* **143**, 74–81 (2018).
22. Shaykhiiev, R. & Crystal, R. G. Early Events in the Pathogenesis of Chronic Obstructive. **11**, (2014).
23. Baraldo, S., Turato, G. & Saetta, M. Pathophysiology of the small airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* **84**, 89–97 (2012).
24. National Heart Lung and Blood Institute. U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health [Internet]. Expert Panel Report 3: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma (EPR-3). Jul. Available from: <http://www.nhlbi.nih.gov/heal> (2007).
25. Mims, J. W. Asthma: Definitions and pathophysiology. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **5**, S2–S6 (2015).
26. Boulet, L. P. Airway remodeling in asthma: Update on mechanisms and therapeutic approaches. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **24**, 56–62 (2018).
27. Gauthier, M., Ray, A. & Wenzel, S. E. Evolving concepts of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **192**, 660–668 (2015).
28. Zafari, Z., FitzGerald, J. M., Dairi, M., Alshabanat, A. & Albanyan, O. Asthma and COPD Overlap Syndrome (ACOS): A Systematic Review and Meta Analysis. *PLoS One* **10**, e0136065 (2015).
29. Richeldi, L., Collard, H. R. & Jones, M. G. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* **389**, 1941–1952 (2017).
30. Martinez, F. J. *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, (2017).
31. Llanos, O. & Hamzeh, N. Sarcoidosis. *Med. Clin. North Am.* **103**, 527–534 (2019).
32. Carmona, E. M., Kalra, S. & Ryu, J. H. Pulmonary Sarcoidosis: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin. Proc.* **91**, 946–954 (2016).
33. Bonifazi, M., Gasparini, S., Alfieri, V. & Renzoni, E. A. Pulmonary Sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med* 437–449 (2017). doi:10.1055/s-0037-1603766
34. Institut National du Cancer. Cancers broncho-pulmonaires - Du diagnostic au suivi. (2016).
35. Lantuéjoul, S., Salameire, D. & Brambilla, E. Évolution de la classification histologique des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules Evolution of the histological classification of non-small- cell lung carcinoma. **XX**, (2011).
36. Van Meerbeeck, J. P., Fennell, D. A. & De Ruyscher, D. K. M. Small cell lung cancer. *Lancet* **378**, 1741–1755 (2011).
37. Gazdar, A. F., Bunn, P. A. & Minna, J. D. Small-cell lung cancer: What we know, what we need to know and the path forward. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 725–737 (2017).
38. Ochsner, A. The development of pulmonary surgery, with special emphasis on carcinoma and bronchiectasis. *Am. J. Surg.* **135**, 732–746 (1978).

39. Abbas, A. E. Surgical Management of Lung Cancer: History, Evolution, and Modern Advances. *Curr. Oncol. Rep.* **20**, 98 (2018).
40. Modlin, I. M., Bodei, L. & Kidd, M. A Historical Appreciation of Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasia. *Thorac. Surg. Clin.* **24**, 235–255 (2014).
41. Horn, L. & Johnson, D. H. Evarts A. Graham and the First Pneumonectomy for Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 3268–3275 (2008).
42. Shimkin, M. B., Connelly, R. R., Marcus, S. C. & Cutler, S. J. Pneumonectomy and lobectomy in bronchogenic carcinoma. A comparison of end results of the Overholt and Ochsner clinics. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **44**, 503–519 (1962).
43. Lung Cancer Study Group (Prepared by Robert J. Ginsberg, MD, and Lawrence V. Rubinstein, P. Randomized Trial of Lobectomy Versus Limited Resection for T1 NO Non-Small Cell Lung Cancer. *Ann. Thorac. Surg.* **60**, 615 (1995).
44. Khaitan, P. G. & D’Amico, T. A. Milestones in thoracic surgery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **155**, 2779–2789 (2018).
45. Despeignes, V. Observation concernant un cas de cancer de l’estomac traité par les rayons Rontgen. 428 (1896).
46. Foray, N. Victor Despeignes, the Forgotten Pioneer of Radiation Oncology. *Int. J. Radiat. Oncol.* **96**, 717–721 (2016).
47. Foray, N. Claudius Regaud (1870-1940) : Relecture des archives d’un pionnier de la radiobiologie et de la radiothérapie. *Cancer/Radiothérapie* **16**, 315–321 (2012).
48. Coutard, H. Principles of X Ray Therapy of Malignant Diseases. *Lancet* (1934). doi:10.1016/s0140-6736(00)90085-0
49. Durdux, C., Bibault, J.-E. & Jaffré, F. Principes et techniques de la radiothérapie thoracique des carcinomes bronchiques non à petites cellules (CBNPC). *Rev. des Mal. Respir. Actual.* **10**, 303–313 (2018).
50. Chan, C., Lang, S., Rowbottom, C., Guckenberger, M. & Faivre-Finn, C. Intensity-modulated radiotherapy for lung cancer: Current status and future developments. *J. Thorac. Oncol.* **9**, 1598–1608 (2014).
51. Lefebvre, L., Doré, M. & Giraud, P. Nouvelles techniques et bénéfices attendus pour la radiothérapie du cancer du poumon New techniques and potential benefits for radiotherapy of lung cancer. *Cancer / Radiother.* **18**, 473–479 (2014).
52. Yom, S. S. *et al.* Initial Evaluation of Treatment-Related Pneumonitis in Advanced-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated With Concurrent Chemotherapy and Intensity-Modulated Radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **68**, 94–102 (2007).
53. Liao, Z. X. *et al.* Influence of Technologic Advances on Outcomes in Patients With Unresectable, Locally Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Receiving Concomitant Chemoradiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **76**, 775–781 (2010).
54. Chun, S. G. *et al.* Comparison of 3-D Conformal and Intensity Modulated Radiation Therapy Outcomes for Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer in NRG Oncology/RTOG 0617. *Int. J. Radiat. Oncol.* **93**, S1–S2 (2015).

55. Koshy, M. *et al.* Association between intensity modulated radiotherapy and survival in patients with stage III non-small cell lung cancer treated with chemoradiotherapy. *Lung Cancer* **108**, 222–227 (2017).
56. Solberg, Timothy D. Siddon, Robert L., and K. B. Historical Development of Stereotactic Ablative Radiotherapy. *Radiat. Oncol.* **39**, 191–197 (2012).
57. Dieterich, S., Green, O. & Booth, J. SBRT targets that move with respiration. *Phys. Medica* **56**, 19–24 (2018).
58. Menten, M. J., Wetscherek, A. & Fast, M. F. MRI-guided lung SBRT: Present and future developments. *Phys. Medica* **44**, 139–149 (2017).
59. Franks, K. N., Jain, P. & Snee, M. P. Stereotactic ablative body radiotherapy for lung cancer. *Clin. Oncol.* **27**, 280–289 (2015).
60. Lefebvre, L., Dore, M. & Giraud, P. [New techniques and potential benefits for radiotherapy of lung cancer]. *Cancer Radiother.* **18**, 473–479 (2014).
61. Menoux, I., Le Fèvre, C., Noël, G. & Antoni, D. Radiation-induced lung toxicity predictors after stereotactic radiation therapy for non-small cell lung carcinoma stage I. *Cancer/Radiotherapie* **22**, 826–838 (2018).
62. De Ruyscher, D. *et al.* European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) recommendations for planning and delivery of high-dose, high precision radiotherapy for lung cancer. *Radiother. Oncol.* **124**, 1–10 (2017).
63. Widder, J., Postmus, D., Ubbels, J. F., Wiegman, E. M. & Langendijk, J. A. Survival and quality of life after stereotactic or 3D-conformal radiotherapy for inoperable early-stage lung cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **81**, 291–297 (2011).
64. Nyman, J. *et al.* SPACE – A randomized study of SBRT vs conventional fractionated radiotherapy in medically inoperable stage I NSCLC. *Radiother. Oncol.* **121**, 1–8 (2016).
65. Ball, D. *et al.* Stereotactic ablative radiotherapy versus standard radiotherapy in stage 1 non-small-cell lung cancer (TROG 09.02 CHISEL): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* **20**, (2019).
66. Videtic, G. M. *et al.* Long-term Follow-up on NRG Oncology RTOG 0915 (NCCTG N0927): A Randomized Phase 2 Study Comparing 2 Stereotactic Body Radiation Therapy Schedules for Medically Inoperable Patients With Stage I Peripheral Non-Small Cell Lung Cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **103**, 1077–1084 (2019).
67. Koshy, M., Malik, R., Weichselbaum, R. R. & Sher, D. J. Increasing radiation therapy dose is associated with improved survival in patients undergoing stereotactic body radiation therapy for stage I non-small-cell lung cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **91**, 344–350 (2015).
68. Lanni, T. B., Grills, I. S., Kestin, L. L. & Robertson, J. M. Stereotactic radiotherapy reduces treatment cost while improving overall survival and local control over standard fractionated radiation therapy for medically inoperable non-small-cell lung cancer. *Am. J. Clin. Oncol. Cancer Clin. Trials* **34**, 494–498 (2011).
69. Blais, E. *et al.* Lung dose constraints for normo-fractionated radiotherapy and for stereotactic body radiation therapy. *Cancer/Radiotherapie* **21**, 584–596 (2017).

70. Pollom, E. L., Chin, A. L., Diehn, M., Loo, B. W. & Chang, D. T. Normal Tissue Constraints for Abdominal and Thoracic Stereotactic Body Radiotherapy. *Semin. Radiat. Oncol.* **27**, 197–208 (2017).
71. Noël, G., Antoni, D., Barillot, I. & Chauvet, B. Délimitation des organes à risque et contraintes dosimétriques. *Cancer/Radiothérapie* **20**, S36–S60 (2016).
72. De Rose, F. *et al.* Organs at risk in lung SBRT. *Phys. Medica* **44**, 131–138 (2017).
73. Doyen, J., Giraud, P. & Belkacemi, Y. Dose de tolérance des tissus sains : le cœur & Normal tissue tolerance to external beam radiation therapy : Cardiac structures. **14**, 319–326 (2010).
74. 3. Definition of Volumes. *J. Int. Comm. Radiat. Units Meas.* **14**, 55–63 (2017).
75. Timmerman, R. D. An Overview of Hypofractionation and Introduction to This Issue of Seminars in Radiation Oncology. *Semin. Radiat. Oncol.* **18**, 215–222 (2008).
76. Guckenberger, M. *et al.* Definition of stereotactic body radiotherapy/Definition der stereotaktischen Strahlentherapie. *Strahlentherapie und Onkol.* **190**, 26–33 (2013).
77. Hanna, G. G. *et al.* UK Consensus on Normal Tissue Dose Constraints for Stereotactic Radiotherapy. *Clin. Oncol.* **30**, 5–14 (2018).
78. Chang, J. Y., Bezjak, A. & Mornex, F. Stereotactic ablative radiotherapy for centrally located early stage non-small-cell lung cancer: What we have learned. *J. Thorac. Oncol.* **10**, 577–585 (2015).
79. Timmerman, R. *et al.* Excessive toxicity when treating central tumors in a phase II study of stereotactic body radiation therapy for medically inoperable early-stage lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**, 4833–4839 (2006).
80. Song, S. Y. *et al.* Fractionated stereotactic body radiation therapy for medically inoperable stage I lung cancer adjacent to central large bronchus. *Lung Cancer* **66**, 89–93 (2009).
81. Corradetti, M. N., Haas, A. R. & Rengan, R. Central-Airway Necrosis after Stereotactic Body-Radiation Therapy. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2327–2329 (2012).
82. Yang, M. & Timmerman, R. Stereotactic Ablative Radiotherapy Uncertainties: Delineation, Setup and Motion. *Semin. Radiat. Oncol.* **28**, 207–217 (2018).
83. Barillot, I. *et al.* Bases référentielles de la radiothérapie en conditions stéréotaxiques pour les tumeurs ou métastases bronchopulmonaires, hépatiques, prostatiques, des voies aérodigestives supérieures, cérébrales et osseuses. *Cancer/Radiothérapie* **22**, 660–681 (2018).
84. Timmerman, R. *et al.* Stereotactic Body Radiation Therapy for Inoperable Early Stage Lung Cancer. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **17**, 1070–1076 (2010).
85. Yamashita, H. Radiation pneumonitis after stereotactic radiation therapy for lung cancer. *World J. Radiol.* **6**, 708 (2014).
86. Guckenberger, M. *et al.* Dose – response relationship for radiation-induced pneumonitis after pulmonary stereotactic body radiotherapy. *Radiother. Oncol.* **97**, 65–70 (2010).
87. 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.* **82**, 457–462 (2012).

88. Zhao, J. *et al.* Simple Factors Associated With Radiation-Induced Lung Toxicity After Stereotactic Body Radiation Therapy of the Thorax: A Pooled Analysis of 88 Studies. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **95**, 1357–1366 (2016).
89. Borst, G. R. *et al.* Radiation pneumonitis in patients treated for malignant pulmonary lesions with hypofractionated radiation therapy. *Radiother. Oncol.* **91**, 307–313 (2009).
90. Vallard, A. *et al.* Prévention médicale et traitement des complications pulmonaires secondaires à la radiothérapie. *Cancer/Radiothérapie* **21**, 411–423 (2017).
91. Rube, C. E. *et al.* Irradiation induces a biphasic expression of pro-inflammatory cytokines in the lung. *Strahlentherapie und Onkol.* **180**, 442–448 (2004).
92. Bledsoe, T. J., Nath, S. K. & Decker, R. H. Radiation Pneumonitis. *Clin. Chest Med.* **38**, 201–208 (2017).
93. Rubin, P. *et al.* Perpetual cascade of cytokines post-irradiation leads to pulmonary fibrosis. **3016**, (1995).
94. Johnston, C. J. *et al.* Early and Persistent Alterations in the Expression of Interleukin-1 α , Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor α mRNA Levels.pdf. (1996).
95. Kalash, R. *et al.* Differences in irradiated lung gene transcription between fibrosis-prone C57BL/6NHsd and fibrosis-resistant C3file:///C:/Users/Lenovo/Desktop/2012, Innate immune responses to Pseudomonas aeruginosa infection.pdfH/HeNHsd mice. *In Vivo* **28**, 147–171 (2014).
96. Kalash, R. *et al.* Effects of thoracic irradiation on pulmonary endothelial compared to alveolar type-II cells in fibrosis-prone C57BL/6NTac mice. *In Vivo (Brooklyn)*. **27**, 291–298 (2013).
97. Sternlicht, M. D. *et al.* Radiation-induced pulmonary gene expression changes are attenuated by the CTGF antibody Pamrevlumab. *Respir. Res.* **19**, 1–16 (2018).
98. Groves, A. M., Johnston, C. J., Misra, R. S., William, J. P. & Finkelstein, J. N. Whole lung irradiation results in pulmonary macrophage alterations that are subpopulation and strain specific. *Radiat. Research Soc.* 639–649 (2015). doi:10.1667/RR14178.1
99. De Leve, S. *et al.* Loss of CD73 prevents accumulation of alternatively activated macrophages and the formation of prefibrotic macrophage clusters in irradiated lungs. *FASEB J.* **31**, 2869–2880 (2017).
100. Beach, T. A., Groves, A. M., Williams, J. P. & Finkelstein, J. N. Modeling radiation-induced lung injury: lessons learned from whole thorax irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **0**, 1–16 (2018).
101. Almeida, C. *et al.* The Role of Alveolar Epithelium in Radiation-Induced Lung Injury. *PLoS One* **8**, 1–9 (2013).
102. Dörr, W., Bertmann, S. & Herrmann, T. Radiation induced lung reactions in breast cancer therapy. *Strahlentherapie und Onkol.* **181**, 567–573 (2005).
103. Fröhlich, D. Untersuchungen zur Strahlenpneumopathie. I: Analytische klinischer und röntgendiagnostischer Befunde. *Radiobiol. Radiother. (Berl)*. **28**, 309–319 (1987).
104. Lagerwaard, F. J., Haasbeek, C. J. A., Smit, E. F., Slotman, B. J. & Senan, S. Outcomes of Risk-Adapted Fractionated Stereotactic Radiotherapy for Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **70**, 685–692 (2008).

105. Baumann, P. *et al.* Outcome in a prospective phase II trial of medically inoperable stage I non-small-cell lung cancer patients treated with stereotactic body radiotherapy. *J. Clin. Oncol.* **27**, 3290–3296 (2009).
106. Perl, A. K. T., Riethmacher, D. & Whitsett, J. A. Conditional depletion of airway progenitor cells induces peribronchiolar fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**, 511–521 (2011).
107. Groves, A. M. *et al.* A Potential Biomarker for Predicting the Risk of Radiation-Induced Fibrosis in the Lung. *Radiat. Res.* **190**, 513–525 (2018).
108. Zhang, Y., Zhang, X., Rabbani, Z. N., Jackson, I. L. & Vujaskovic, Z. Oxidative stress mediates radiation lung injury by inducing apoptosis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **83**, 740–748 (2012).
109. Shelton, D. N., Chang, E., Whittier, P. S., Choi, D. & Funk, W. D. Microarray analysis of replicative senescence. *Curr. Biol.* **9**, 939–945 (1999).
110. Sagiv, A. & Krizhanovsky, V. Immunosurveillance of senescent cells: The bright side of the senescence program. *Biogerontology* **14**, 617–628 (2013).
111. Muñoz-Espín, D. & Serrano, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 482 (2014).
112. Citrin, D. E. *et al.* Role of type II pneumocyte senescence in radiation-induced lung fibrosis. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 1474–1484 (2013).
113. He, Y. *et al.* Cellular senescence and radiation-induced pulmonary fibrosis. *Transl. Res.* 1–8 (2019). doi:10.1016/j.trsl.2019.03.006
114. 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. Biol. Phys.* **99**, 353–361 (2017).
115. Citrin, D. E. *et al.* Radiation-Induced Fibrosis: Mechanisms and Opportunities to Mitigate. **5**, 1–8 (2016).
116. Hanania, A. N., Mainwaring, W., Ghebre, Y. T., Hanania, N. A. & Ludwig, M. Radiation-Induced Lung Injury: Assessment and Management. *Chest* 1–13 (2019). doi:10.1016/j.chest.2019.03.033
117. Lekkerkerker, A. N., Aarbiou, J., Van Es, T. & Janssen, R. A. J. Cellular Players in Lung Fibrosis. *Curr. Pharm. Des.* **18**, 4093–4102 (2012).
118. Weiskirchen, R., Weiskirchen, S. & Tacke, F. Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. *Mol. Aspects Med.* **65**, 2–15 (2019).
119. Kasai, H., Allen, J. T., Mason, R. M., Kamimura, T. & Zhang, Z. TGF- β 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir. Res.* **6**, 56 (2005).
120. Cho, J. G., Lee, A., Chang, W., Lee, M. S. & Kim, J. Endothelial to mesenchymal transition represents a key link in the interaction between inflammation and endothelial dysfunction. *Front. Immunol.* **9**, 3–5 (2018).
121. Westbury, C. B. & Yarnold, J. R. Radiation Fibrosis - Current Clinical and Therapeutic Perspectives. *Clin. Oncol.* **24**, 657–672 (2012).

122. Low, R. B., Woodcock-Mitchell, J., Evans, J. N. & Adler, K. B. Actin content of normal and of bleomycin-fibrotic rat lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* **129**, 311–316 (1984).
123. Hashimoto, N., Chensue, S. W., Sem, H. & Invest, J. C. Bone marrow – derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. **113**, 243–252 (2004).
124. Danto, S. I., Shannon, J. M., Borok, Z., Zabski, S. M. & Crandall, E. D. Reversible transdifferentiation of alveolar epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **12**, 497–502 (1995).
125. Adamson, I. Y. R., Oung, L. & Bowden, D. H. Relationship of alveolar epithelial injury and repair to the induction of pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* **130**, 377–83 (1988).
126. 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).
127. Shieh, J. M., Tseng, H. Y., Jung, F., Yang, S. H. & Lin, J. C. Elevation of IL-6 and IL-33 Levels in Serum Associated with Lung Fibrosis and Skeletal Muscle Wasting in a Bleomycin-Induced Lung Injury Mouse Model. *Mediators Inflamm.* **2019**, 7947596 (2019).
128. Wu, L. *et al.* IL-33 Can Promote the Process of Pulmonary Fibrosis by Inducing the Imbalance Between MMP-9 and TIMP-1. *Inflammation* **41**, 878–885 (2018).
129. Abrial, C. Caractérisation de la polarisation des macrophages pulmonaires humains et voies de régulation. (2016).
130. Zhang, H. *et al.* The Development of Classically and Alternatively Activated Macrophages Has Different Effects on The Varied Stages of Radiation-induced Pulmonary Injury in Mice. *J. Radiat. Res.* **52**, 717–726 (2011).
131. Meziani, L. *et al.* CSF1R inhibition prevents radiation pulmonary fibrosis by depletion of interstitial macrophages. *Eur. Respir. J.* **51**, 1–13 (2017).
132. Linda, A., Trovo, M. & Bradley, J. D. Radiation injury of the lung after stereotactic body radiation therapy (SBRT) for lung cancer: A timeline and pattern of CT changes. *Eur. J. Radiol.* **79**, 147–154 (2011).
133. Benveniste, M. F. K. *et al.* New era of radiotherapy: An update in radiation-induced lung disease. *Clin. Radiol.* **68**, e275–e290 (2013).
134. Anscher, mitchell s *et al.* Plasma Transforming Groth Factor for Radiation Pneumonitis. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **41**, 1029–1035 (1998).
135. Fu, X. L. *et al.* Predicting the risk of symptomatic radiation-induced lung injury using both the physical and biologic parameters V30 and transforming growth factor β . *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **50**, 899–908 (2001).
136. Zhao, L. *et al.* The predictive role of plasma TGF- β 1 during radiation therapy for radiation-induced lung toxicity deserves further study in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **59**, 232–239 (2008).
137. Zhao, L. *et al.* Elevation of Plasma TGF- β 1 During Radiation Therapy Predicts Radiation-Induced Lung Toxicity in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer: A Combined Analysis From Beijing and Michigan. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **74**, 1385–1390 (2009).

138. Evans, E. S. *et al.* Does transforming growth factor- β 1 predict for radiation-induced pneumonitis in patients treated for lung cancer? *Cytokine* **35**, 186–192 (2006).
139. Stenmark, M. H. *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.* **84**, e217–e222 (2012).
140. Mathelier-Fusade, P., Delers, F. & Engler, R. Interleukine-8. *Immuno-analyse Biol. Spécialisée* **5**, 9–13 (1990).
141. Wang, S. *et al.* Plasma Levels of IL-8 and TGF- β 1 Predict Radiation-Induced Lung Toxicity in Non-Small Cell Lung Cancer: A Validation Study. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **98**, 615–621 (2017).
142. Yamashita, H. *et al.* Prescreening based on the presence of CT-scan abnormalities and biomarkers (KL-6 and SP-D) may reduce severe radiation pneumonitis after stereotactic radiotherapy. 1–9 (2010).
143. Ishii, Y. & Kitamura, S. Soluble intercellular adhesion molecule-1 as an early detection marker for radiation pneumonitis. *Eur. Respir. J.* **13**, 733–738 (1999).
144. Blais, E. *et al.* Doses aux organes à risque en radiothérapie conformationnelle et en radiothérapie stéréotaxique : le poumon. *Cancer/Radiothérapie* **21**, 604–612 (2017).
145. Zhao, J. *et al.* Simple Factors Associated With Radiation-Induced Lung Toxicity After Stereotactic Body Radiation Therapy of the Thorax: A Pooled Analysis of 88 Studies. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **95**, 1357–1366 (2016).
146. Rasmi, R. R. & Guruvayoorappan, C. Pulmonary injury associated with radiation therapy – Assessment , complications and therapeutic targets. *Biomed. Pharmacother.* **89**, 1092–1104 (2017).
147. Shi, S., Zeng, Z., Ye, L., Huang, Y. & He, J. Risk Factors Associated With Symptomatic Radiation Pneumonitis After Stereotactic Body Radiation Therapy for Stage I Non–Small Cell Lung Cancer. *Technol. Cancer Res. Treat.* **16**, 316–320 (2017).
148. Baker, R. *et al.* Clinical and dosimetric predictors of radiation pneumonitis in a large series of patients treated with stereotactic body radiation therapy to the lung. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **85**, 190–195 (2013).
149. Paper, F. Predicting risk factors for radiation pneumonitis after stereotactic body radiation therapy for primary or metastatic lung tumours. (2017).
150. Xiong, H. *et al.* ATM polymorphisms predict severe radiation pneumonitis in patients with non-small cell lung cancer treated with definitive radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **85**, 1066–1073 (2013).
151. Zhang, L. *et al.* ATM polymorphisms are associated with risk of radiation-induced pneumonitis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **77**, 1360–1368 (2010).
152. Mak, R. H. *et al.* A single-nucleotide polymorphism in the methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene is associated with risk of radiation pneumonitis in lung cancer patients treated with thoracic radiation therapy. *Cancer* **118**, 3654–3665 (2012).
153. Nakamura, M. *et al.* Dosimetric factors predicting radiation pneumonitis after CyberKnife

stereotactic body radiotherapy for peripheral lung cancer. doi:10.1259/bjr.20160560

154. Chang, J. Y. *et al.* Clinical outcome and predictors of survival and pneumonitis after stereotactic ablative radiotherapy for stage I non-small cell lung cancer. *Radiat. Oncol.* **7**, 1–10 (2012).
155. Chang, J. Y. *et al.* Stereotactic ablative radiation therapy for centrally located early stage or isolated parenchymal recurrences of non-small cell lung cancer: How to fly in a 'no fly zone'. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **88**, 1120–1128 (2014).
156. Antonadou, D. *et al.* Randomized phase III trial of radiation treatment +/- amifostine in patients with advanced-stage lung cancer.[Erratum appears in *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002 Sep 1;54(1):308], [Erratum appears in *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002 Apr 1;52(5):1458]. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **51**, 915–922 (2001).
157. Movsas, B. *et al.* Randomized trial of amifostine in locally advanced non-small-cell lung cancer patients receiving chemotherapy and hyperfractionated radiation: Radiation Therapy Oncology Group trial 98-01. *J. Clin. Oncol.* **23**, 2145–2154 (2005).
158. Ward, W. F., Kim, Y. T., Molteni, A. & Solliday, N. H. Radiation-induced pulmonary endothelial dysfunction in rats : modification by an inhibitor of angiotensin converting enzyme. **15**, 135–140 (1988).
159. Ward, W. F., Molteni, A., Tsao, C.-H. & Hinz, J. M. Captopril reduces collagen and mast cell accumulation in irradiated rat lung. **19**, 1405–1409 (1990).
160. Ward, W. F., Lin, P.-J. P., Wong, P. S., Behnia, R. & Jalali, N. Radiation Pneumonitis in Rats and Its Modification by the Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Captopril Evaluated by High-Resolution Computed Tomography. *Radiat. Res.* **135**, 81 (1993).
161. Kharofa, J., Cohen, E. P., Tomic, R., Xiang, Q. & Gore, E. Decreased risk of radiation pneumonitis with incidental concurrent use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and thoracic radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **84**, 238–243 (2012).
162. Small, W. *et al.* Utility of the ACE inhibitor captopril in mitigating radiation-associated pulmonary toxicity in lung cancer: Results from NRG Oncology RTOG 0123. **41**, 396–401 (2018).
163. Ozturk, B., Egehan, I., Atavci, S. & Kitapci, M. Pentoxifylline in prevention of radiation-induced lung toxicity in patients with breast and lung cancer: a double-blind randomized trial. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **58**, 213–9 (2004).
164. Misirlioglu, C. H., Demirkasimoglu, T., Kucukplakci, B., Sanri, E. & Altundag, K. Pentoxifylline and alpha-tocopherol in prevention of radiation-induced lung toxicity in patients with lung cancer. *Med. Oncol.* **24**, 308–311 (2007).
165. Murtha, L. A. *et al.* The processes and mechanisms of cardiac and pulmonary fibrosis. *Front. Physiol.* **8**, 1–15 (2017).
166. Qin, W. *et al.* Antifibrotic Agent Pirfenidone Protects against Development of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis in a Murine Model. *Radiat. Res.* **190**, 396–403 (2018).
167. De Ruysscher, D. *et al.* Nintedanib reduces radiation-induced microscopic lung fibrosis but this cannot be monitored by CT imaging: A preclinical study with a high precision image-guided irradiator. *Radiother. Oncol.* **124**, 482–487 (2017).

168. Epperly, M. *et al.* Prevention of late effects of irradiation lung damage by manganese superoxide dismutase gene therapy. *Gene Ther.* **5**, 196–208 (1998).
169. Williams, J. P., Johnston, C. J. & Finkelstein, J. N. Treatment for Radiation-Induced Pulmonary Late Effects. **377**, 364–377 (2009).
170. Abernathy, L. M. *et al.* Soy Isoflavones Promote Radioprotection of Normal Lung Tissue by Inhibition of Radiation-Induced Activation of Macrophages and Neutrophils. *J. Thorac. Oncol.* **10**, 1703–1712 (2015).
171. Calveley, V. L. *et al.* Genistein Can Mitigate the Effect of Radiation on Rat Lung Tissue. *Radiat. Res.* **173**, 602–611 (2010).
172. Meziari, L., Deutsch, E. & Mondini, M. Macrophages in radiation injury: a new therapeutic target. *Oncoimmunology* **7**, 1–4 (2018).
173. Williams, J. P. *et al.* Effect of Administration of Lovastatin on the Development of Late Pulmonary Effects after Whole-Lung Irradiation in a Murine Model. *Radiat. Res.* **161**, 560–567 (2006).
174. Adawi, A. *et al.* Blockade of CD40-CD40 ligand interactions protects against radiation- induced pulmonary inflammation and fibrosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **89**, 222–230 (1998).
175. Yavas, G. *et al.* The effect of Halofuginone in the amelioration of radiation induced-lung fibrosis. *Med. Hypotheses* **80**, 357–359 (2013).
176. Chung, S. I. *et al.* IL-13 is a therapeutic target in radiation lung injury. *Sci. Rep.* **6**, 39714 (2016).
177. Bickelhaupt, S. *et al.* Effects of CTGF Blockade on Attenuation and Reversal of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **109**, 1–11 (2017).
178. Lacombe, J. & Zenhausern, F. Emergence of miR-34a in radiation therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **109**, 69–78 (2017).
179. Kwon, O. S. *et al.* Induction of miR-21 by stereotactic body radiotherapy contributes to the pulmonary fibrotic response. *PLoS One* **11**, 1–16 (2016).
180. Sémont, A. *et al.* Mesenchymal Stem Cells Increase Self-Renewal of Small Intestinal Epithelium and Accelerate Structural Recovery after Radiation Injury. in *Tissue Engineering* (ed. Fisher, J. P.) 19–30 (Springer US, 2007).
181. Patete, C. L. & Glassberg, M. K. *Stem Cell Therapies for Lung Regeneration. Reference Module in Biomedical Sciences* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.65451-x
182. Chambers, D. C. *et al.* A phase 1b study of mesenchymal stromal cell therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. *Cytotherapy* **16**, S12 (2014).
183. Glassberg, M. K. *et al.* Allogeneic Human Mesenchymal Stem Cells in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis via Intravenous Delivery (AETHER): A Phase I Safety Clinical Trial. *Chest* **151**, 971–981 (2017).
184. Maria, O. M. *et al.* Mesenchymal stem cells adopt lung cell phenotype in normal and radiation-induced lung injury conditions. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **24**, 283–295 (2016).
185. Withers, H. R. *The Four R's of Radiotherapy. Advances in Radiation Biology* **5**, (ACADEMIC

- PRESS, INC., 1975).
186. Baumann, M. *et al.* Basic Clinical radiobiology Fourth Edition. (2009).
 187. Kallman, R. F. The Phenomenon of Reoxygenation and Its Implications for Fractionated Radiotherapy. *Radiology* **105**, 135–142 (1972).
 188. Macià i Garau, M. Radiobiology of stereotactic body radiation therapy (SBRT). *Reports Pract. Oncol. Radiother.* **22**, 86–95 (2017).
 189. Petersen, C. *et al.* Proliferation and micromilieu during fractionated irradiation of human FaDu squamous cell carcinoma in nude mice. *Int. J. Radiat. Biol.* **79**, 469–477 (2003).
 190. Petersen, C. *et al.* Repopulation of FADU human squamous cell carcinoma during fractionated radiotherapy correlates with reoxygenation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Physic* **51**, 483–493 (2001).
 191. Steel, G. G., McMillan, T. J. & Peacock, J. H. The 5Rs of Radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol.* **56**, 1045–1048 (1989).
 192. Kim, M.-S. *et al.* Radiobiological mechanisms of stereotactic body radiation therapy and stereotactic radiation surgery. *Radiat. Oncol. J.* **33**, 265 (2016).
 193. Song, C. W., Kim, M. S., Cho, L. C., Dusenbery, K. & Sperduto, P. W. Radiobiological basis of SBRT and SRS. *Int. J. Clin. Oncol.* **19**, 570–578 (2014).
 194. Liu, Q., Schneider, F., Ma, L., Wenz, F. & Herskind, C. Sublethal Damage (SLD) Repair: Relation to DNA Repair and Implications for Protracted Irradiation with Low-energy X-rays. *Int. J. Radiat. Oncol.* **81**, S715–S716 (2011).
 195. Shibamoto, Y., Miyakawa, A., Otsuka, S. & Iwata, H. Radiobiology of hypofractionated stereotactic radiotherapy: What are the optimal fractionation schedules? *J. Radiat. Res.* **57**, i76–i82 (2016).
 196. Fowler, J. F., Welsh, J. S. & Howard, S. P. Loss of biological effect in prolonged fraction delivery. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **59**, 242–249 (2004).
 197. Song, C. W., Park, H., Griffin, R. J. & Levitt, S. H. Radiobiology of Stereotactic Radiosurgery and Stereotactic Body Radiation Therapy. *Tech. Basis Radiat. Ther.* 51–61 (2012). doi:10.1007/174
 198. Park, H., Lyons, J. C., Griffin, R. J., Lim, B. U. & Song, C. W. Apoptosis and Cell Cycle Progression in an Acidic Environment after Irradiation. *Radiat. Res.* **153**, 295–304 (2006).
 199. Brown, J. M., Carlson, D. J. & Brenner, D. J. The tumor radiobiology of SRS and SBRT: Are more than the 5 Rs involved? *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **88**, 254–262 (2014).
 200. Thames, H. D., Rodney Withers, H., Peters, L. J. & Fletcher, G. H. Changes in early and late radiation responses with altered dose fractionation: Implications for dose-survival relationships. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **8**, 219–226 (1982).
 201. Foray, N. 1896 : comment la radiothérapie naissante a pu réunir Roentgen, Pasteur et les frères Lumière. *Cancer/Radiothérapie* **20**, 820–823 (2016).
 202. Cosset, J. M., Mornex, F. & Eschwège, F. Hypofractionnement en radiothérapie: L'éternel retour. *Cancer/Radiothérapie* **17**, 355–362 (2013).

203. Fletcher, G. H. Regaud Lecture Perspectives on the History of Radiotherapy. **12**, 253–271 (1988).
204. Cosset, J. M. The come-back of hypofractionation? *Cancer/Radiotherapie* **9**, 366–373 (2005).
205. Puck, T. T. & Marcus, P. L. Action of X-Rays on mammalian cells. *J. Exp. Med.* **103**, 653 (1956).
206. Curtis, S. . Lethal and potentially lethal lesions induced by radiation a unified repair model. *Radiat. Res.* 0–45 (1986).
207. Albrecht M. Kellerer and Harald H. Rossi, R. research. The theory of dual radiation action. *Curr. Top. Radiat. Res.* **8**, 85–158 (1972).
208. Chadwick, K. & Leenhouts, H. A molecular theory of cell survival. *Phys. Med. Biol* **18**, 78–87 (1973).
209. Joiner, M. C. *et al.* Hypersensitivity to very-low single radiation doses: Its relationship to the adaptive response and induced radioresistance. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **358**, 171–183 (1996).
210. Kirkpatrick, J. P., Meyer, J. J. & Marks, L. B. The Linear-Quadratic Model Is Inappropriate to Model High Dose per Fraction Effects in Radiosurgery. *Semin. Radiat. Oncol.* **18**, 240–243 (2008).
211. Kirkpatrick, J. P., Brenner, D. J. & Orton, C. G. Point/Counterpoint The linear-quadratic model is inappropriate to model high dose per fraction effects in radiosurgery. *Med. Phys.* **36**, 3381 (2009).
212. Wang, J. Z., Huang, Z., Lo, S. S., Yuh, W. T. C. & Mayr, N. a. A generalized linear-quadratic model for radiosurgery, stereotactic body radiation therapy, and high-dose rate brachytherapy. *Sci. Transl. Med.* **2**, 39ra48-39ra48 (2010).
213. Brenner, D. J., Badalà, F., Nouri-mahdavi, K. & Raoof, D. A. The Linear-Quadratic Model Is an Appropriate Methodology for Determining Isoeffective Doses at Large Doses Per Fraction. *Computer (Long. Beach. Calif).* **144**, 724–732 (2008).
214. Chapman, J. D. & Gillespie, C. J. The Power of Radiation Biophysics d Let ' s Use It. *Radiat. Oncol. Biol.* **84**, 309–311 (2012).
215. Bartkowiak, D., Högner, S., Nothdurft, W. & Röttinger, E. M. Cell cycle and growth response of CHO cells to X-irradiation: threshold-free repair at low doses. **50**, 221–227 (2001).
216. Garcia, L. M., Leblanc, J., Wilkins, D. & Raaphorst, G. P. Fitting the linear – quadratic model to detailed data sets for different dose ranges. (2006). doi:10.1088/0031-9155/51/11/009
217. Fowler, J. F. 21 Years of biologically effective dose. *Br. J. Radiol.* **83**, 554–568 (2010).
218. Song, C. W. *et al.* Radiobiology of Stereotactic Body Radiation Therapy/Stereotactic Radiosurgery and the Linear-Quadratic Model. *Int. J. Radiat. Oncol.* **87**, 18–19 (2013).
219. Guerrero, M. & Li, X. A. Extending the linear-quadratic model for large fraction doses pertinent to stereotactic radiotherapy. *Phys. Med. Biol.* **49**, 4825–4835 (2004).
220. Park, C., Papiez, L., Zhang, S., Story, M. & Timmerman, R. D. Universal Survival Curve and Single Fraction Equivalent Dose: Useful Tools in Understanding Potency of Ablative Radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **70**, 847–852 (2008).

221. Astrahan, M. Some implications of linear-quadratic-linear radiation dose-response with regard to hypofractionation Some implications of linear-quadratic-linear radiation dose-response with regard to hypofractionation. *Med. Phys.* **4161**, (2008).
222. Dutreix, J., Cosset, J. M. & Girinsky, T. [Biological equivalency of high single doses used in intraoperative irradiation]. *Bull. Cancer Radiother.* **77**, 125–134 (1990).
223. Paris, F. Endothelial Apoptosis as the Primary Lesion Initiating Intestinal Radiation Damage in Mice. *Science (80-.)*. **293**, 293–297 (2001).
224. Ng, Q. S. *et al.* Acute tumor vascular effects following fractionated radiotherapy in human lung cancer: In vivo whole tumor assessment using volumetric perfusion computed tomography. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **67**, 417–424 (2007).
225. MANTYLA, M. J., TOIVANEN, J. T., PITKANYEY, M. A. & REKONEN, A. H. Radiation-induced changes in regional blood flow in human tumors. **17**, 365–373 (1989).
226. Wong, H. H., Song, C. W. & Levitt, S. H. Early Changes in the Functional Vasculature of Walker Carcinoma 256 Following Irradiation. *Radiology* **108**, 429–434 (1973).
227. Song, C. W. *et al.* Indirect tumor cell death after high-dose hypofractionated irradiation: Implications for stereotactic body radiation therapy and stereotactic radiation surgery. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **93**, 166–172 (2015).
228. Solesvik, O. V. E. V, Rofstad, E. K. & Brustad, T. O. R. Vascular Changes in a Human Malignant Melanoma Xenograft following Single-Dose Irradiation in local areas with resulting hypoxic cells (1-3). These cells are proposed for some tumors to be the source of local regrowth ygenate efficiently during the cour. **128**, 115–128 (1984).
229. Kioi, M. *et al.* Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 694–705 (2010).
230. Lasnitzki, I. A Quantitative Analysis of the Direct and Indirect Action of X Radiation on Malignant Cells. **XX**, 240–247
231. Clement, J. J., Song, C. W. & Levitt, S. H. Changes in functional vascularity and cell number following X-irradiation of a murine carcinoma. (1976).
232. Clement, J. J., Tanaka, N. & Song, C. W. Tumor Reoxygenation and Postirradiation Vascular Changes. *Radiology* **127**, 799–803 (2014).
233. Song, C. W. & Levitt, S. H. Effect of X Irradiation on Vascularity of Normal Tissues and Experimental Tumor. *Radiology* **94**, 445–447 (1970).
234. Song, C. W., Payne, J. T. & Levitt, S. H. Vascularity and Blood Flow in X-Irradiated Walker Carcinoma 256 of Rats. *Radiat. Biol.* **104**, 693–697 (1972).
235. Ono, K., Kinashi, Y. & Suzuki, M. Selective irradiation of the blood vessels by using boron neutron capture reaction - development and its utilization. *Int. Assoc. Radiat. Res. (International)*
236. Lindblom, E. K., Dasu, A. & Toma-Dasu, I. Hypoxia Induced by Vascular Damage at High Doses Could Compromise the Outcome of Radiotherapy. *Anticancer Res.* **39**, 2337–2340 (2019).
237. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 417–27 (2011).

238. Oh, E. T. *et al.* Radiation-induced angiogenic signaling pathway in endothelial cells obtained from normal and cancer tissue of human breast. *Oncogene* **33**, 1229–1238 (2014).
239. Garcia-barros, A. M. *et al.* Tumor Response to Radiotherapy Regulated by Endothelial Cell Apoptosis. **300**, 1155–1159 (2003).
240. Supiot, S. & Paris, F. Radiobiologie appliquée à l'endothélium. *Cancer/Radiotherapie* **16**, 11–15 (2012).
241. Haimovitz-friedman, B. A. *et al.* Ionizing Radiation Acts on Cellular Membranes to Generate Ceramide and Initiate Apoptosis. *J. Exp. Med.* **180**, 525–535 (1994).
242. Paris, F. *et al.* Endothelial Apoptosis as the Primary Lesion Initiating Intestinal Radiation Damage in Mice. *Science (80-.)*. **293**, 293–297 (2001).
243. Abuodeh, Y., Venkat, P. & Kim, S. Systematic review of case reports on the abscopal effect. *Curr. Probl. Cancer* **40**, 25–37 (2016).
244. Golden, E. B., Demaria, S., Schiff, P. B., Chachoua, A. & Formenti, S. C. An Abscopal Response to Radiation and Ipilimumab in a Patient with Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Immunol. Res.* **1**, 365–372 (2013).
245. Postow, M. A. *et al.* Immunologic Correlates of the Abscopal Effect in a Patient with Melanoma. **366**, 925–931 (2012).
246. Stamell, E. F., Wolchok, J. D., Gnjatic, S., Lee, N. Y. & Brownell, I. The abscopal effect associated with a systemic anti-melanoma immune response. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **85**, 293–295 (2013).
247. Tefferi, A., Hiniker, S. M., Chen, D. S. & Knox, S. J. Abscopal Effect in a Patient with Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2035–2036 (2012).
248. Lumniczky, K. & Sáfrány, G. The impact of radiation therapy on the antitumor immunity: Local effects and systemic consequences. *Cancer Lett.* **356**, 114–125 (2015).
249. Lugade, A. A. *et al.* Local radiation therapy of B16 melanoma tumors increases the generation of tumor antigen-specific effector cells that traffic to the tumor. *J. Immunol.* **174**, 7516–23 (2005).
250. Lee, Y. *et al.* Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8 + T cells: Changing strategies for cancer treatment. *Blood* **114**, 589–595 (2009).
251. Marciscano, A. E. *et al.* Immunomodulatory Effects of Stereotactic Body Radiation Therapy: Preclinical Insights and Clinical Opportunities. *Int. J. Radiat. Oncol.* (2019). doi:10.1016/j.ijrobp.2019.02.046
252. Chen, D. S. & Mellman, I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* **541**, 321–330 (2017).
253. Tugues, S., Ducimetiere, L., Friebel, E. & Becher, B. Innate lymphoid cells as regulators of the tumor microenvironment. *Semin. Immunol.* 1–7 (2019). doi:10.1016/j.smim.2019.03.002
254. Sciences, M. Tumor Microenvironment as A “ Game Changer ” in Cancer Radiotherapy. 18–20 (2019).
255. Song, C. W. *et al.* Biological Principles of Stereotactic Body Radiation Therapy (SBRT) and

- Stereotactic Radiation Surgery (SRS): Indirect Cell Death. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* (2019). doi:10.1016/j.ijrobp.2019.02.047
256. Finkelstein, S. E. *et al.* The confluence of stereotactic ablative radiotherapy and tumor immunology. *Clin. Dev. Immunol.* **2011**, (2011).
257. Lee, P. P. *et al.* Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat. Med.* **5**, 677–685 (1999).
258. Demaria, S. *et al.* Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **58**, 862–870 (2004).
259. Liao, Y.-P. *et al.* Ionizing Radiation Affects Human MART-1 Melanoma Antigen Processing and Presentation by Dendritic Cells. *J. Immunol.* **173**, 2462–2469 (2004).
260. Demaria, S. *et al.* Immune-mediated inhibition of metastases after treatment with local radiation and CTLA-4 blockade in a mouse model of breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**, 728–734 (2005).
261. Dewan, M. Z. *et al.* Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5379–5388 (2009).
262. Lugade, A. A. *et al.* Radiation-Induced IFN- Production within the Tumor Microenvironment Influences Antitumor Immunity. *J. Immunol.* **180**, 3132–3139 (2014).
263. Twyman-Saint Victor, C. *et al.* Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature* **520**, 373–377 (2015).
264. Vanpouille-Box, C. *et al.* DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat. Commun.* **8**, 15618 (2017).
265. Jackson, I. L., Vujaskovic, Z. & Down, J. D. A Further Comparison of Pathologies after Thoracic Irradiation among Different Mouse Strains: Finding the Best Preclinical Model for Evaluating Therapies Directed Against Radiation-Induced Lung Damage. *Radiat. Res.* **175**, 510–518 (2011).
266. 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 (1989).
267. Travis, E. The sequence of histological changes in mouse lungs after total lung irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **15**, 345–347 (1980).
268. Beach, T. A., Johnston, C. J., Groves, A. M., Williams, J. P. & Finkelstein, J. N. Radiation induced pulmonary fibrosis as a model of progressive fibrosis: Contributions of DNA damage, inflammatory response and cellular senescence genes. *Exp. Lung Res.* **43**, 134–149 (2017).
269. Fleckenstein, K. *et al.* Temporal Onset of Hypoxia and Oxidative Stress After Pulmonary Irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **68**, 196–204 (2007).
270. 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.* **89**, 722–728 (2014).
271. Chung, E. *et al.* A truncated Plasminogen Activator Inhibitor-1 protein protects from

- pulmonary fibrosis mediated by irradiation in a murine model. *Cancer Res.* **75**, 1803–1803 (2015).
272. Johnston, C. J., Wright, T. W., Rubin, P. & Finkelstein, J. N. Alterations in the Expression of Chemokine Mrna Levels in Fibrosis-Resistant and -Sensitive Mice After Thoracic Irradiation. *Exp. Lung Res.* **24**, 321–337 (1998).
273. Rube, C. E. *et al.* The bronchiolar epithelium as a prominent source of pro-inflammatory cytokines after lung irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **61**, 1482–1492 (2005).
274. Chiang, C. S. *et al.* Compartmental responses after thoracic irradiation of mice: Strain differences. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **62**, 862–871 (2005).
275. Gross, N. J. & Balis, J. V. Functional, biochemical, and morphologic changes in alveolar macrophages following thoracic x-irradiation. *Lab. Invest.* **39**, 381–389 (1978).
276. Groves, A. M., Johnston, C. J., Misra, R. S., Williams, J. P. & Finkelstein, J. N. Effects of IL-4 on Pulmonary Fibrosis and the Accumulation and Phenotype of Macrophage Subpopulations Following Thoracic Irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **3002**, 1–36 (2016).
277. Kang, S. K. *et al.* Overexpression of extracellular superoxide dismutase protects mice from radiation-induced lung injury. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **57**, 1056–1066 (2003).
278. 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. Biol. Phys.* **99**, 353–361 (2017).
279. Ao, X. *et al.* Radiation produces differential changes in cytokine profiles in radiation lung fibrosis sensitive and resistant mice. *J. Hematol. Oncol.* **2**, 1–12 (2009).
280. Johnston, C. J. *et al.* Early alterations in cytokine expression in adult compared to developing lung in mice after radiation exposure. *Radiat. Res.* **173**, 522–535 (2010).
281. Manning, C. M. *et al.* Exacerbation of Lung Radiation Injury by Viral Infection: The Role of Clara Cells and Clara Cell Secretory Protein. *Radiat. Res.* **179**, 617–629 (2013).
282. Citrin, D. E. *et al.* Role of type II pneumocyte senescence in radiation-induced lung fibrosis. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 1474–1484 (2013).
283. 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.* **77**, 895–902 (2010).
284. 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.* **55**, 648–657 (2014).
285. Hong, Z., Geol, C., Hyo, L., Shim, S. & Jung, E. Time , Dose , and Volume Responses in a Mouse Pulmonary Injury Model Following Ablative Irradiation. *Lung* **194**, 81–90 (2016).
286. 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).
287. 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.* **182**, 83–91 (2014).

288. Zhang, Y., Zhang, X., Rabbani, Z. N., Jackson, I. L. & Vujaskovic, Z. Oxidative stress mediates radiation lung injury by inducing apoptosis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **83**, 740–748 (2012).
289. Zhou, C. *et al.* Quantitative assessment of radiation dose and fractionation effects on normal tissue by utilizing a novel lung fibrosis index model. *Radiat. Oncol.* **12**, 1–8 (2017).
290. Lockhart, S. P., Down, J. D. & Steel, G. G. Mouse hemithoracic irradiation and its interaction with cytotoxic drugs. *Radiother. Oncol.* **24**, 177–185 (1992).
291. Down, J. D., Nicholas, D. & Steel, G. G. Lung damage after hemithoracic irradiation: Dependence on mouse strain. *Radiother. Oncol.* **6**, 43–50 (1986).
292. Eldh, T. *et al.* Radiation-induced changes in breathing frequency and lung histology of C57BL/6J mice are time- and dose-dependent. *Strahlentherapie und Onkol.* **188**, 274–281 (2012).
293. Lavigne, J. *et al.* Lung Stereotactic Arc Therapy in Mice: Development of Radiation Pneumopathy and Influence of HIF-1 α Endothelial Deletion. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **104**, 279–290 (2019).
294. Du, S. *et al.* Stereotactic Body Radiation Therapy Delivery in a Genetically Engineered Mouse Model of Lung Cancer. *Int. J. Radiat. Oncol.* **96**, 529–537 (2016).
295. Dunne, V. *et al.* Inhibition of ataxia telangiectasia related-3 (ATR) improves therapeutic index in preclinical models of non-small cell lung cancer (NSCLC) radiotherapy. *Radiother. Oncol.* **124**, 475–481 (2017).
296. Zhao, J. *et al.* Simple Factors Associated With Radiation-Induced Lung Toxicity After Stereotactic Body Radiation Therapy of the Thorax: A Pooled Analysis of 88 Studies. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **95**, 1357–1366 (2016).
297. 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).
298. Rock, J. R. *et al.* Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, E1475–E1483 (2011).
299. Nadkarni, R. R., Abed, S. & Draper, J. S. Stem Cells in Pulmonary Disease and Regeneration. *Chest* **153**, 994–1003 (2018).
300. Österreicher, J. *et al.* The alveolar septal thickness and type II pneumocytes number in irradiated lungs, time expression and the effect of pentoxifylline. *Med. Arh.* **28**, 571–574 (2001).
301. Rawlins, E. L. *et al.* The Role of Scgb1a1+ Clara Cells in the Long-Term Maintenance and Repair of Lung Airway, but Not Alveolar, Epithelium. *Cell Stem Cell* **4**, 525–534 (2009).
302. Zheng, D. *et al.* Differentiation of Club Cells to Alveolar Epithelial Cells in Vitro. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).
303. Aoshiba, K. *et al.* A murine model of airway fibrosis induced by repeated naphthalene exposure. *Exp. Toxicol. Pathol.* **66**, 169–177 (2014).

304. Sisson, T. H. *et al.* Targeted injury of type II alveolar epithelial cells induces pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **181**, 254–263 (2010).
305. Slanina, J., Maschitzki, R. & Wannemacher, M. [Pulmonary reaction to radiation as depicted in chest x-rays following megavolt therapy of breast cancer]. *Radiologe* **27**, 181–191 (1987).
306. Polansky, S. M., Ravin, C. E. & Prosnitz, L. R. Pulmonary changes after primary irradiation for early breast carcinoma. *Am. J. Roentgenol.* **134**, 101–105 (1980).
307. 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).
308. Tsoutsou, P. G. & Koukourakis, M. I. Radiation pneumonitis and fibrosis: Mechanisms underlying its pathogenesis and implications for future research. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **66**, 1281–1293 (2006).
309. Granton, P. V. *et al.* A longitudinal evaluation of partial lung irradiation in mice by using a dedicated image-guided small animal irradiator. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **90**, 696–704 (2014).
310. Hackett, T. L. *et al.* Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor- β 1. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **180**, 122–133 (2009).
311. Jonsdottir, H. R. *et al.* Basal cells of the human airways acquire mesenchymal traits in idiopathic pulmonary fibrosis and in culture. *Lab. Investig.* **95**, 1418–1428 (2015).
312. Milara, J., Peiró, T., Serrano, A. & Cortijo, J. Epithelial to mesenchymal transition is increased in patients with COPD and induced by cigarette smoke. *Thorax* **68**, 410–420 (2013).
313. Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Natl. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 178–196 (2014).
314. Novakova-jiresova, A., Gamenen, M. M. Van, Coppes, R. P., Kampinga, H. H. & Groen, H. J. M. Transforming growth factor- β plasma dynamics and post-irradiation lung injury in lung cancer patients. **71**, 183–189 (2004).
315. Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. doi:10.1038/nrm3758
316. Zhou, J. *et al.* Lung tissue extracellular matrix-derived hydrogels protect against radiation-induced lung injury by suppressing epithelial–mesenchymal transition. *J. Cell. Physiol.* jcp.29143 (2019). doi:10.1002/jcp.29143
317. Lu, J. *et al.* Baicalin alleviates radiation-induced epithelial-mesenchymal transition of primary type II alveolar epithelial cells via TGF- β and ERK/GSK3 β signaling pathways. *Biomed. Pharmacother.* **95**, 1219–1224 (2017).
318. Lavigne, J. *et al.* Conditional Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Deletion in the Endothelial Compartment Has No Beneficial Effect on Radiation-Induced Whole-Lung Damage in Mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **99**, 972–982 (2017).
319. Mintet, E. *et al.* Identification of Endothelial-to-Mesenchymal Transition as a Potential Participant in Radiation Proctitis. *Am. J. Pathol.* **185**, 2550–2562 (2015).
320. Finkelstein, Jacob N., Johnston, C. J., Baggs, R. & Rubin, P. Early alterations in extracellular

- matrix and transforming growth factor beta gene expression in mouse lung indicative of late radiation fibrosis. *Int. J. Radiat. Biol.* **28**, 621–631 (1994).
321. Noda, A., Ning, Y., Venable, S. F., Pereira-Smith, O. M. & Smith, J. R. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of dna synthesis using an expression screen. *Experimental Cell Research* **211**, 90–98 (1994).
322. Serrano, M., Hannon, G. J. & Beach, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **366**, 704–707 (1993).
323. Vaughan, D. E., Rai, R., Khan, S. S., Eren, M. & Ghosh, A. K. PAI-1 is a Marker and a Mediator of Senescence. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**, 1446 (2017).

Résumé

La radiothérapie stéréotaxique permet l'irradiation de petits volumes avec une précision submillimétrique. La décroissance de dose rapide en dehors du volume cible permet l'utilisation de doses dites ablatives, allant de 6 à 20 Gy par fraction. La radiothérapie stéréotaxique est proposée comme alternative thérapeutique à la chirurgie chez les patients inopérables atteints d'un cancer bronchopulmonaire non à petites cellules de stade précoce. Malgré la diminution des volumes irradiés, les patients développent des effets secondaires comme la pneumopathie radique et la fibrose pulmonaire radio-induite. Le manque de données radiobiologiques aux fortes doses par fraction reste une problématique. Le but de ces travaux de thèse est donc d'acquérir, *in vivo*, des données originales en radiopathologie pulmonaire et *in vitro*, de déterminer la réponse cellulaire aux fortes doses par fraction. Le SARRP est un irradiateur du petit animal permettant la modélisation préclinique de l'irradiation stéréotaxique, en arc-thérapie, chez la souris. L'effet du volume d'irradiation est caractérisé grâce à quatre collimateurs (de 1 mm à 10x10 mm²), en dose unique de 90 Gy. Le collimateur 3x3 mm² a permis d'observer les effets précoces et tardifs de l'irradiation, avec l'apparition d'une fibrose pulmonaire radio-induite nécessitant la déplétion des cellules club et la réaction proliférative des pneumocytes de type II. L'étude de l'effet de la dose est réalisée grâce à une escalade de dose (20 à 120 Gy, 3x3 mm²). Cette étude a mis en avant d'une part que le volume pulmonaire irradié tolère de très fortes doses et d'autre part qu'une dose de 60 Gy est nécessaire pour générer une fibrose pulmonaire 6 mois après irradiation. L'étude du fractionnement est réalisée grâce à l'administration de trois fractions de 20, 28, 40 ou 50 Gy. Les données disponibles ont montré qu'il fallait une BED_{3Gy} (Biological Effective Dose) minimum de 200 Gy pour pouvoir observer de la fibrose pulmonaire radio-induite chez la souris. *In vitro*, différentes lignées cellulaires pulmonaires ont été irradiées selon 5 protocoles de fractionnement, à dose par fraction variable mais BED constante. L'analyse de 44 gènes montre que l'irradiation induit l'expression de marqueurs mésenchymateux ainsi que des collagènes par les lignées épithéliales, suggérant un processus de transition épithélio-mésenchymateuse. A BED constante, il n'y a pas d'effet notable de la dose par fraction dans notre modèle.

Mots-clés : radiothérapie stéréotaxique, modélisation préclinique, poumon, fibrose pulmonaire

Abstract

Stereotactic Body Radiation Therapy (SBRT) consists in irradiating small volumes with submillimetric accuracy. The rapid dose decay outside the target volume enables the use of ablative doses, from 6 to 20 Gy per fraction. SBRT is used to treat early stage non-small cells lung cancer as a therapeutic alternative to surgery in inoperable patients. Despite the decrease in irradiated volumes, patients still develop side effects as radiation pneumonitis and lung fibrosis. The lack of radiobiological data for high doses per fraction exposure remains an issue. The purpose of this thesis work is therefore to acquire, *in vivo*, original data in pulmonary radiopathology and *in vitro*, to determine the cellular response to high doses per fraction. The SARRP is a small animal radiation platform allowing lung SBRT modeling, in arc-therapy, in rodents. Effect of the irradiation volume is characterized by 4 different beam collimations (from 1 mm to 10x10mm²), at a dose of 90 Gy. The 3x3 mm² collimator allows the study of early and late effects of the irradiation, with the appearance of radiation-induced pulmonary fibrosis requiring depletion of club cells and reactive proliferation of type II pneumocytes. Dose effect study was conducted using a single dose range (from 20 to 120 Gy, 3x3mm²) and shows that limited lung volumes tolerate very high doses. It also shows that a dose of 60 Gy is necessary to generate pulmonary fibrosis 6 months after irradiation. Study of fractionation effect consists in delivered three fractions of 20, 28, 40 or 50 Gy. Available data showed that a minimum BED_{3Gy} (Biological Effective Dose) of 200 Gy was required to observe radiation-induced pulmonary fibrosis in mice. *In vitro*, different pulmonary cell lines were irradiated according to 5 fractionation protocols, at variable doses per fraction but constant BED. Analysis of 44 genes shows that irradiation induces the expression of mesenchymal markers as well as collagen by epithelial lines, suggesting an epithelial-mesenchymal transition process. At constant BED, there is no significant effect of dose per fraction in our model.

Key words: stereotactic body radiation therapy, preclinical modeling, lung, lung fibrosis