



HAL
open science

Rôle des sous-populations de macrophages dans les lésions pulmonaires induites par irradiation stéréotaxique chez la souris

Sarah Braga Cohen

► **To cite this version:**

Sarah Braga Cohen. Rôle des sous-populations de macrophages dans les lésions pulmonaires induites par irradiation stéréotaxique chez la souris. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL057 . tel-04345463v1

HAL Id: tel-04345463

<https://irsn.hal.science/tel-04345463v1>

Submitted on 14 Dec 2023 (v1), last revised 26 Feb 2024 (v2)

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.

Rôle des sous-populations de macrophages dans les lésions pulmonaires induites par irradiation stéréotaxique chez la souris

*Role of macrophage subpopulations in lung injury induced
by stereotactic irradiation in mice*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 582 : cancérologie : biologie - médecine - santé (CBMS)
Spécialité de doctorat : Sciences du Cancer
Graduate School : Life Science and Health. Référent : Faculté de médecine

Thèse préparée au **Laboratoire de Radiobiologie des Expositions Médicales** (Paris Saclay, IRSN), sous la direction de **Agnès FRANCOIS**, Ingénieure de Recherche, PhD, HDR

Thèse soutenue à Paris Saclay, le 05 juin 2023, par

Sarah BRAGA-COHEN

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Yolanda PREZADO Directrice de recherche, Institut Curie	Présidente du jury
Stéphane SUPIOT Professeur, Institut de cancérologie de l'Ouest	Rapporteur et Examineur
Céline MIRJOLET Chargée de recherche Centre GF Leclerc	Rapporteuse et Examinatrice
Charles FOUILLADE Chargé de recherche, Institut Curie	Examineur
Lydia MEZIANI Chargée de recherche, Gustave Roussy	Examinatrice
Philippe LE ROUZIC Professeur, Centre de recherche Saint-Antoine	Examineur

Titre : Rôle des sous-populations de macrophages dans les lésions pulmonaires induites par irradiation stéréotaxique chez la souris

Mots clés : Irradiation stéréotaxique – Macrophages – Poumon – Tissus sains

Résumé : La radiothérapie stéréotaxique (SBRT) est une alternative thérapeutique pour les patients atteints de cancer bronchique et à haut risque chirurgical. C'est une technique de haute précision, permettant l'irradiation de très petits volumes. Certains patients développent néanmoins une fibrose pulmonaire. Notre modèle préclinique de SBRT permet d'irradier environ 4% du poumon des souris et a montré un infiltrat de macrophages. L'objectif a été de caractériser les différentes sous-populations de macrophages pulmonaires, et leur rôle présumé dans le développement des lésions pulmonaires focales radio-induites.

Des techniques d'imagerie, d'histologie, de cytométrie et séquençage d'ARN, nous ont permis d'observer l'absence d'impact du recrutement des macrophages sur la gravité des lésions ainsi que la présence de macrophages alvéolaires proliférants après irradiation. Ceux-ci verraient leur métabolisme basculer d'une utilisation énergétique des acides gras vers une biosynthèse de cholestérol.

Title : Role of macrophage subpopulations in lung injury induced by stereotactic irradiation in mice

Keywords : Stereotactic irradiation – Macrophages – Lung – Healthy tissue

Abstract : Stereotactic Body Radiation Therapy (SBRT) is a therapeutic alternative for patients with bronchial cancer at high surgical risk. It is a high-precision technique, allowing the irradiation of very small volumes. However, some patients develop pulmonary fibrosis. Our preclinical SBRT model allows to irradiate about 4% of the mouse lung and has shown a macrophage infiltrate. The objective was to characterize the different subpopulations of pulmonary macrophages, and their presumed role in the development of focal radiation-induced lung lesions.

Imaging, histology, cytometry, and single cell RNAseq techniques allowed us to observe the absence of impact of macrophage recruitment on the severity of the lesions as well as the presence of proliferating alveolar macrophages after irradiation. Their metabolism may switch from energetic use of fatty acids to cholesterol biosynthesis.

« Il faudrait essayer d'être heureux, ne serait-ce que pour donner l'exemple. »

Jacques Prévert

“La vérité scientifique sera toujours plus belle que les créations de notre imagination
et que les illusions de notre ignorance.”

Claude Bernard

(Célèbre scientifique et rue de Manon, future célèbre scientifique)

A toutes les personnes qui m'ont inspirée et aidée pendant cette thèse,

Remerciements

En premier lieu je souhaite remercier chaque membre de mon jury :

- Le **Dr. Yolanda PREZADO** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.
- Le **Dr. Stéphane SUPIOT** et le **Dr. Céline MIRJOLET** d'avoir accepté d'être mes rapporteurs. Merci pour le temps que vous avez passé à lire et évaluer ce manuscrit.
- Le **Dr. Charles FOUILLADE** et le **Dr. Lydia MEZIANI** pour leur regard critique sur mon travail de thèse en tant qu'examineur.
- Et enfin le **Dr. Philippe LE ROUZIC**, vous avez été mon professeur pendant mes études et il me tenait à cœur que vous fassiez partie de mon jury de thèse.

Je n'oublie pas bien sûr les trois chercheurs qui m'ont suivie chaque année durant ces presque 4 ans, les docteurs **Michele MONDINI**, **Vanessa PETIT** et **Delphine DESCAMPS**. Merci pour nos échanges, construits et intéressants qui m'ont fait avancer. Je remercie **Stéphane ILLIANO**, notre chef de service, et **Christine BARTIZEL**, son adjointe, pour m'avoir accueillie au sein du SERAMED.

Je n'aurais pas assez d'un livre pour décrire tout ce que ces presque 4 ans de thèse m'ont apportée sur le plan scientifique, bien sûr, mais également sur le plan humain. Je commence donc par **TOUS** vous remercier d'avoir partagé avec moi ces moments joyeux, parfois difficiles, mais surtout enrichissants.

Je vais bien évidemment commencer par **Agnès**, ma directrice de thèse. Merci de m'avoir choisie pour ce stage de master 2 et pour cette thèse. Je te remercie pour absolument tout : ta gentillesse, ta bienveillance, ton humour, tes conseils, tes critiques (constructives 😊), la correction de mes (nombreuses) fautes d'orthographe, et j'en oublie forcément. J'ai appris à tes côtés que tout n'avait pas besoin de se faire dans l'empressement (enfin j'ai toujours des progrès à faire !) et que surtout « pas de panique, ça va le faire ». La liste de toutes les choses que j'ai apprises à tes côtés est trop longue pour toutes les citer ici. Tu m'as donné les armes pour le reste de ma carrière et je t'en remercie énormément. Si je peux devenir ne serait-ce que la moitié de la chercheuse que tu es, je serai déjà très fière !

Je remercie également **Fabien**, mon chef de laboratoire. Merci pour ton accessibilité, tes conseils et ton regard critique sur mon travail. Travailler à tes côtés a été très enrichissant pour moi. J'espère que tu te rappelleras de moi aussi pour mes qualités scientifiques et pas seulement comme « bout en train du service » 😊 !

L'autre moitié de chercheuse que j'aimerais être, c'est **Morgane**. Au-delà de ton investissement dans mon projet de thèse, je te remercie de ton soutien sans faille, de tes conseils, de tes avis et de toutes les fois où tu m'as remonté le moral. Sans toi, je pense que j'aurais baissé les bras plusieurs fois. Mais merci surtout pour toutes les conversations pendant ces longues heures de SARRP, pour ta revue critique des restaurants du moment et tes conseils de voyages ! J'ai prévu de tout faire !

Merci à **Olivier** pour ta bienveillance et ton souci du détail dans la préparation de mon article et de mes présentations. Je n'oublie pas **Vincent** qui m'a aidée à comprendre la chose complexe qu'est la cytométrie en flux. Je me pose souvent la question de ta consommation de gel par an pour réussir à faire tenir tes cheveux dressés sur la tête 😊 Je remercie également **Jan BAIJER** qui m'a aidée à me former à la cytométrie en flux et la maîtrise de flow Jo.

Je remercie **Christelle, Valérie, Georges** et **Claire** pour m'avoir guidée dans mes manip au laboratoire et pour m'avoir aidée quand j'en ai eu besoin ! Et bien sûr pour les discussions autour du café sur à peu près tous les sujets !

Je souhaitais également remercier **Noëlle, Alexandra, Christine** et **Alain** pour l'accueil qu'ils m'ont fait au laboratoire, pour leur bienveillance et les discussions qui m'ont permis d'affûter mon esprit critique.

Comment ne pas remercier **Chloé**, la mascotte haute en couleurs du laboratoire ! Merci pour ta bonne humeur et pour ta gentillesse ! Mais je ne te remercie pas pour les gâteaux, les bonbons et chocolats qui sont devenus des kilos difficiles à perdre ! Je remercie également **Véronique** pour sa disponibilité, je te souhaite le meilleur pour la suite.

J'ai fait ma thèse au LRMed mais j'ai été soutenue également par l'autre laboratoire du service, le LRAcc ! Je remercie **Gaetan** pour sa bienveillance, j'espère avoir appris de ta diplomatie légendaire, j'en ai bien besoin ! Je ne pouvais pas parler du LRAcc sans mentionner **Pascale**, avec qui j'ai formé le pôle événementiel du SERAMED ! Avec **Eric**,

Bruno et **Delphine**, je vous remercie pour les franches parties de rigolade et pour vos encouragements ! Merci à **Maâmar** pour ses encouragements bienveillants et ses conseils. Je remercie également **Juan**, **Géraldine**, **Stéphane**, **Céline B.**, **Céline L** et le nouveau venu **Guillaume**. pour leur gentillesse et les échanges que nous avons pu avoir. Merci à **Amine** de m'avoir guidée dans le brouillard qu'est l'analyse sur R du single cell et pour tes conseils.

Ma thèse n'aurait pas été possible sans l'aide du GSEA ! Merci à **Delphine** pour ses encouragements et ses blagues. Mais je ne te remercie pas pour des demandes d'analyse rétrospective ou les dossiers de comité d'éthique 😊. Je remercie particulièrement **Amandine**, pour les moments à discuter de tout, pour l'écoute quand ça n'allait pas, pour l'aide apportée pendant les manips et pour les clopes (oups ^^) ! Et bien sûr pour finir, **Romain** ! Même si t'es parfois grognon, merci pour toute l'aide que tu m'as apportée, pour les moments de convivialité qu'on a partagés, et pour les cigarettes (oui encore) !!! Merci à **Fred** pour les moments sympas au café !

Merci à **Olivier Diez** pour les encouragements, les moments conviviaux, et les clopes (oui je suis une grande taxeuse).

Passons aux « jeunes » du laboratoire ! Vous savez tous que j'ai fait partie d'un trio infernal pendant ma thèse, **les triplettes maléfiques** comme nous a surnommées Morgane. D'abord, le petit ange du trio, **Ségo** ! Il paraît qu'au début, tu avais un peu de mal avec mon côté brut de décoffrage... mais je ne t'ai pas laissé le choix ! Et je suis contente de te compter parmi mes amis proches ! Te taquiner a fait partie de mes activités préférées pendant ces 4 années de thèse (t'es la chef de file de la team premier degré), j'espère que tu ne m'en tiendras pas rigueur 😊. En parlant de rigueur, tu es l'une des scientifiques les plus rigoureuses que je connaisse, et je suis sûre que la suite de ta carrière ne sera jalonnée que de réussites ! De toute façon Ségo, n'oublie pas, « Résiste ! Prouve que tu existes ! » 😊

Le 3^{ème} mousquetaire, c'est **Manon** ! Calme et sérieuse au premier abord, j'ai vu se dévoiler **Dark Manon** au fil des années ! Je te remercie pour l'aide en physique, les questions naïves de biologie (auxquelles je n'ai pas toujours les réponses), les pauses, les gâteaux, les bonbons, les retours en voiture tardifs, les rigolades... La liste est longue ! J'ai toujours été scotchée par ton intelligence et tes connaissances scientifiques, mais ce que je préfère c'est ta curiosité ! Ma thèse m'a apporté beaucoup de choses, mais j'ai surtout gagné deux amies que j'estime sincèrement. Merci beaucoup pour tout (et de toute façon on se voit sûrement samedi soir, n'oubliez pas les chips 😊) !

Je ne pouvais pas oublier **Yoann** ! Tu as été mon meilleur compagnon de pause, toujours prêt à lâcher une clope (beaucoup beaucoup de clopes), à discuter actualité, politique, science, commérage parfois ^^ Merci pour tout ! J'espère te compter longtemps parmi mes amis !

Je souhaite remercier **Emilie**, post-doc pendant le début de ma thèse ! Merci pour ta joie de vivre, ton humour et tes cigarettes aussi ! Nos discussions m'ont manqué pendant la fin de ma thèse ! Si tu finis par répondre à mes messages, on ira boire un café 😊

Merci à **Alexia** et **Annaïg** qui m'ont appris les ficelles du statut de thésarde avec bienveillance ! Je souhaite le meilleur à mes deux co-thésardes de la même année, **Lydia** et **Mallia** ! Je vous remercie pour les moments de convivialité et le soutien dans l'intense expérience qu'est la thèse. J'ai été ravie de vous avoir à mes côtés au début de ma thèse. Je remercie **Clément**, avec qui j'ai partagé mon bureau pendant ces années de thèse, de sa gentillesse. Je souhaite bon courage à **Martin**, qui a toute ma confiance pour réussir à terminer sa thèse avec brio et pour tous les défis qu'il aura à relever ! Merci à **Lucie** pour les discussions toujours intéressantes et de m'avoir obligée à aller bosser même quand je ne voulais pas ! Bon courage à **Quentin**, pour ta thèse et pour la gestion de l'ADIN, attention je veille au grain ! Merci pour ta bonne humeur hyper communicative ! Merci à **Paul**, le petit pote de l'IGR, pour les conversations interminables 😊. Je remercie également les doctorants du LRTox avec qui j'ai partagé pas mal de cafés (et de pintes) : **Goran, Théo et Florian**. Merci à **Louis** et **Yann** pour les moments de convivialité !

Parmi les post-docs du labo, je remercie **Jérémy** pour son aide pour les manip de single cell et sa gentillesse ! Merci à **Batoul** pour sa douceur, sa bienveillance et ses conseils pour Montpellier ! Je souhaite la bienvenue, au dernier arrivé, **Diego**, tu es arrivé dans un super labo ! Merci à **Haser** pour les moments sympatiques pendant les pauses cigarettes (encore et toujours) !

Je vous jure que je n'ai pas passé toute ma thèse à bavarder, à faire des pauses café et à fumer, j'ai aussi bossé 😊

Pendant ma thèse, j'ai été la présidente de l'ADIN pendant deux mandats et je souhaite remercier les anciens et les nouveaux membres : **Sékolène, Marie, Coralie, Manon, Quentin, Sarmini, Claire, Anne-Laure, Théo, Florian, Diane, Enya et Martial**. Merci pour votre investissement à tous. Je laisse l'association entre les mains de **Quentin**, je compte sur vous pour le surveiller 😊. Je suis sûre que vous allez réussir à mener à bien encore plein de beaux projets ! Je remercie tous les doctorants de l'IRSN adhérents à l'association de m'avoir fait confiance pour ces deux mandats, j'espère avoir été à la hauteur.

Je remercie les nouvelles thésardes pour le vent de fraîcheur qu'elles ont apporté au labo : **Sarmini, Claire et Anne-Laure**. Je vous souhaite plein de bonnes choses pour la suite de votre thèse, et surtout du courage (pour la rédaction 😊) ! Merci à **Nathalie** pour sa douceur et à **Miray** pour sa gentillesse. Bon courage également à **Arthur** !

Merci au gouvernement d'avoir voulu fusionner l'IRSN et l'ASN, sans qui je n'aurais pas pu être une militante/chanteuse de slogan/manifestante/hooligan en plus d'être une doctorante ! Merci à **Léa MARION** pour ces revisites de classiques à la sauce IRSN (on reste l'IRSN-euh) ! Plus sérieusement je remercie l'**Intersyndicale** pour son investissement et de m'avoir fait confiance pour représenter les doctorants pendant ces moments de manifestation.

Cette aventure humaine et scientifique riche de rencontres se termine, vous me laisserez tous un souvenir impérissable (vous m'excuserez si j'en ai oublié).

J'aimerais maintenant remercier mes meilleures amies **Prune** et **Fleur**, qui m'ont écoutée parler de mes macrophages ! Merci de m'avoir remonté le moral, de vous être toujours intéressées à toutes mes expériences, d'avoir écouté mes présentations, d'avoir corrigé mes fautes ... La liste est longue ! Vous avez été un soutien important et sans faille ! J'ai hâte de continuer à vous rabattre les oreilles avec mes futurs projets ! 😊

Je voudrais remercier **Anna**, on s'est rencontrées à des moments pas faciles et on a été présentes l'une pour l'autre depuis. Merci pour tout !

Je remercie **tous mes amis présents autour de moi** dans les bons moments !
Que nos rires résonnent encore longtemps !

Merci à ma sœur, **Ileana**, qui m'inspire par sa force de caractère, ce qui m'a empêché de baisser les bras souvent, surtout sur la fin de la rédaction du manuscrit. Si tu veux te moquer de moi (parce que je sais que ça tu n'arrêteras pas) maintenant tu pourras le faire seulement en m'appelant docteure 😊

A **Maximilien**, merci d'avoir été celui qui supporte mes sautes d'humeur, mes coups de blues, mes incertitudes pendant cette thèse. Sans toi, je n'y serais pas arrivée, c'est sûr. Merci d'être presque devenu un biologiste à force que je te rabatte les oreilles avec ma thèse. Merci de m'avoir tellement soutenue que tu m'as dit que tu me suivrais n'importe où m'emmènerait ma carrière. Merci de venir avec moi à Montpellier pour la suite, c'est un grand changement pour nous deux mais on relèvera tous les défis à deux comme on le fait depuis le début !

Pour finir, vous en avez tous entendu parler, toutes mes expressions sont à l'origine les siennes, j'aimerais remercier ma **Maman**. Merci de m'avoir inculqué la curiosité, la contradiction et le questionnement de tout, c'est grâce à cela que j'ai pu devenir chercheuse. Merci de m'avoir donné confiance en moi et d'avoir toujours cru en moi, si un jour je gagne effectivement un prix Nobel ce sera grâce à ça 😊. J'espère continuer de te rendre fière.

Enfin, **Papa**, j'espère que tu es fier de moi. J'aurai aimé que tu sois là pour voir que je suis devenue, le nouveau Docteur Braga.

Publications et Communications

Publications

Braga-Cohen S, Lavigne J, Dos Santos M, Tarlet G, Buard V, Baijer J, Guipaud O, Paget V, Deutsch E, Benadjaoud MA, Mondini M, Milliat F and François A. Evidence of alveolar macrophage metabolic shift following SBRT-induced lung fibrosis in mice.

Soumis dans Nature Communications.

Bertho A, Dos Santos M, **Braga-Cohen S**, Buard V, Paget V, Guipaud O, Tarlet G, Milliat F, François A. Preclinical Model of Stereotactic Ablative Lung Irradiation Using Arc Delivery in the Mouse: Is Fractionation Worthwhile? *Front Med (Lausanne)*. 2021 Dec 24. doi: 10.3389/fmed.2021.794324.

Communications orales

Braga-Cohen S, Lavigne J, Dos Santos M, Tarlet G, Buard V, Baijer J, Guipaud O, Paget V, Deutsch E, Benadjaoud MA, Mondini M, Milliat F and François A. *Shift métabolique des macrophages alvéolaires au cours de la fibrose tissulaire induite par irradiation d'un petit volume pulmonaire chez la souris. Société Française de Radiothérapie Oncologie, Montpellier, France 2023, abstract soumis.*

Braga-Cohen S, Dos Santos M, Benadjaoud MA, Lavigne J, Tarlet G, Buard V, Demarquay C, Mondini M, Deutsch E, Milliat F et François A. Une sous-population de macrophages alvéolaires proliférants impliquée dans le développement de lésions stéréotaxiques pulmonaires chez la souris ? Société Française de Biologie des Radiations, Saint-Raphaël, France, 2022.

Braga-Cohen S, Dos Santos M, Buard V, Demarquay C, Milliat F et François A. Rôles des sous-populations de macrophages dans les lésions pulmonaires induites par irradiation stéréotaxique chez la souris. Journée des thèses de l'IRSN 2021, La Colle-sur-Loup, France, 2022.

Braga-Cohen S, Dos Santos M, Buard V, Demarquay C, Milliat F et François A. Mais qui sont ces macrophages qui en font trop ? Concours « 3 min pour une thèse », Journée des thèses de l'IRSN 2021, La Colle-sur-Loup, France, 2022

Braga-Cohen S, Dos Santos M, Milliat F et François A. Rôles des sous-populations de macrophages dans les lésions pulmonaires induites par irradiation stéréotaxique chez la souris. Société Française de Radioprotection, Conférence virtuelle, 2021.

Braga-Cohen S, Dos Santos M, Buard V, Demarquay C, Milliat F et François A. Rôles des sous-populations de macrophages dans les lésions pulmonaires induites par irradiation stéréotaxique chez la souris. Journée des thèses de l'IRSN 2021, Conférence virtuel, 2021.

Braga-Cohen S, Dos Santos M, Buard V, Demarquay C, Milliat F et François A. Rôles des sous-populations de macrophages dans les lésions pulmonaires induites par irradiation stéréotaxique chez la souris. Journées des doctorants de l'Ecole Doctorale de Cancérologie, Villejuif, France, 2021.

Communications affichées

Braga-Cohen S, Dos Santos M, Benadjaoud MA, Lavigne J, Tarlet G, Mondini M, Deutsch E, Milliat F et François A. An *in situ* proliferating alveolar macrophage subpopulation involved in the development of pulmonary stereotactic lesions in mice. Société Française d'Immunologie, Nice, France, 2022.

Braga-Cohen S, Dos Santos M, Baijer J, Buard V, Demarquay C, Milliat F et François A. Macrophage subpopulations in stereotactic radiation-induced lung injury in mice. European Society for Therapeutic Radiology and Oncology, Madrid, Espagne, 2021.

Braga-Cohen S, Baijer J, Dos Santos M, Buard V, Demarquay C, Milliat F et François A. Macrophage subpopulations in stereotactic radiation-induced lung injury in mice. ImmunoRad, Paris, France, 2021.

Braga-Cohen S, Dos Santos M, Baijer J, Buard V, Demarquay C, Milliat F et François A. Macrophage subpopulations in stereotactic radiation-induced lung injury in mice. The European Radiation Research Society, Conférence virtuelle (Lund, Suède), 2020.

Prix

1^{er} prix Antoine Bécère de la meilleure communication orale : Braga-Cohen S, Dos Santos M, Benadjaoud MA, Lavigne J, Tarlet G, Buard V, Demarquay C, Mondini M, Deutsch E, Milliat F et François A. Une sous-population de macrophages alvéolaires proliférant impliquée dans le développement de lésions stéréotaxiques pulmonaires chez la souris ? Société Française de Biologie des Radiations, Saint-Raphaël, France, 2022.

Poster Award : Braga-Cohen S, Dos Santos M, Baijer J, Buard V, Demarquay C, Milliat F et François A. Macrophage subpopulations in stereotactic radiation-induced lung injury in mice. The European Radiation Research Society, Conférence virtuelle (Lund, Suède), 2020.

Sommaire

Publications et Communications	9
Table des figures et des tableaux	14
Etat de l'art.....	19
Chapitre 1 : L'anatomie pulmonaire	20
1) Voies aériennes supérieures	21
a. Cavités nasales.....	21
b. Sinus paranasaux, Pharynx et Larynx.....	21
2) Voies aériennes inférieures.....	22
a. La trachée.....	22
b. Les poumons.....	22
c. Les bronches et les bronchioles	23
d. Histologie de l'épithélium pulmonaire.....	23
3) L'alvéole pulmonaire.....	26
a. Les cellules épithéliales alvéolaires	27
b. Les capillaires pulmonaires	28
c. Les fibroblastes alvéolaires	30
d. Les macrophages alvéolaires.....	30
Chapitre 2 : Les macrophages pulmonaires	31
1) Origines et différenciation des macrophages pulmonaires	33
2) Les macrophages alvéolaires	35
3) Les macrophages interstitiels	38
4) Les macrophages recrutés	39
5) Le paradigme de la polarisation des macrophages	41
Chapitre 3 : Pathologies pulmonaires et macrophages.....	46
1) La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO).....	48
2) La Fibrose idiopathique pulmonaire.....	53
3) Les cancers broncho-pulmonaires.....	59
Chapitre 4 : Prise en charge du CBNPC par SBRT.....	64

1) Un bon candidat pour la SBRT : le poumon	66
2) La prise en compte du risque dans le traitement par SBRT du CBNPC	68
a) Les modèles prédictifs mathématiques.....	68
b) Organes à risque en SBRT pulmonaire et toxicité associée	72
3) La SBRT pulmonaire : en pratique.....	74
4) Effets secondaires associés à la SBRT	76
a) Les éléments diagnostiques	76
b) Les facteurs de risque.....	81
c) Prise en charge thérapeutique des séquelles pulmonaires de la SBRT	83
Chapitre 5 : Radiobiologie des fortes doses par fraction et radiopathologie pulmonaire	85
1) Les 6Rs de la radiobiologie associée à l'hypofractionnement sévère.....	86
a) R éparation des dommages sublétaux.....	87
b) R edistribution dans le cycle cellulaire	87
c) R éoxygénation.....	88
d) R epopulation	88
e) R adiosensibilité intrinsèque.....	89
f) R éactivation immunitaire	89
g) Effets vasculaires de l'hypofractionnement sévère.....	92
2) Réponse pulmonaire aux rayonnements ionisants.....	94
a) Dommages induits à l'endothélium	94
b) Dommages épithéliaux.....	96
c) Activation du mésenchyme	97
d) Réponse inflammatoire	97
3) Rôle des macrophages dans la réponse pulmonaire aux rayonnements ionisants	98
a) Effet des rayonnements ionisants sur les macrophages.....	98
b) Métabolisme des macrophages après irradiation	100
c) Origine des macrophages présents après irradiation pulmonaire	103
Problématique et Objectifs	105
Résultats	108
Evidence of alveolar macrophage metabolic shift following SBRT-induced lung fibrosis in mice.	109
Détermination de l'origine de l'envahissement macrophagique radio-induit par le modèle de parabiose	147

1) Principe et organisation du projet.....	147
2) Mise au point du modèle de chirurgie.....	148
3) Test de recherche de macrophages GFP ⁺ après SBRT pulmonaire chez la souris sauvage.....	149
4) Bilan du projet global.....	150
Déplétion des macrophages alvéolaires par instillation intranasale de liposomes clodronate.....	152
Objectifs :	152
Résultats et évaluation critique :	154
1) Vérification de la déplétion des macrophages alvéolaires par cytométrie en flux ..	154
2) Observations histologiques des souris non irradiées.....	155
3) Observations chez les souris irradiées à 80 Gy	156
Discussion et Perspectives	159
Est-ce que le modèle d'irradiation pulmonaire au SARRP est le plus pertinent ?	161
Comment différencier les macrophages présents à la lésion pulmonaire après irradiation stéréotaxique ?	168
Quel est l'impact de l'origine des macrophages dans les lésions pulmonaires induites par irradiation stéréotaxique ?	173
Quel est l'impact de l'environnement tumoral dans les lésions radio-induites aux tissus sains ?	181
Les macrophages pourraient-ils interagir avec d'autres types cellulaires dans les lésions radio-induites ?.....	183
Conclusion générale.....	185
Annexes.....	189
Bibliographie.....	202

Table des figures et des tableaux

<i>Figure 1 : Anatomie pulmonaire et composition de l'épithélium</i>	<i>24</i>
<i>Figure 2 : Différences de composition entre épithéliums murin et humain de la trachée à l'alvéole</i>	<i>25</i>
<i>Figure 3 : L'alvéole pulmonaire</i>	<i>29</i>
<i>Figure 4 : Recrutement monocytaire et macrophages résidents dans les tissus</i>	<i>33</i>
<i>Figure 5 : Origine des macrophages résidents pulmonaires.....</i>	<i>34</i>
<i>Figure 6 : Catabolisme du surfactant dans les macrophages alvéolaires.....</i>	<i>37</i>
<i>Figure 7 : Le paradigme de la polarisation des macrophages</i>	<i>42</i>
<i>Figure 8 : Métabolisme des macrophages M1.....</i>	<i>43</i>
<i>Figure 9: Métabolisme des macrophages M2.....</i>	<i>44</i>
<i>Figure 10 : Pourcentage des décès liés à une pathologie respiratoire</i>	<i>47</i>
<i>Figure 11 : Exemples d'image scanner et de figures histologiques du poumon observées chez les patients atteints de BPCO</i>	<i>49</i>
<i>Figure 12: Image Scanner et histologie caractéristiques des poumons de patients atteints de fibrose idiopathique pulmonaire).....</i>	<i>54</i>
<i>Figure 13 : Effet de la polarisation macrophagique sur les cellules tumorales</i>	<i>63</i>
<i>Figure 14 : Appareil de radiothérapie stéréotaxique</i>	<i>65</i>
<i>Figure 15 : Le poumon, un bon candidat pour la SBRT.....</i>	<i>67</i>
<i>Figure 16 : Représentation graphique du modèle linéaire quadratique avec les implications des paramètres α et β..</i>	<i>69</i>
<i>Figure 17 : La « No Fly Zone » en SBRT pulmonaire</i>	<i>73</i>
<i>Figure 18 : Les volumes définis dans la planification de traitement en radiothérapie externe</i>	<i>75</i>
<i>Figure 19 : Motifs de modifications précoces du parenchyme pulmonaire après SBRT</i>	<i>79</i>
<i>Figure 20 : Motifs de modifications tardives du parenchyme pulmonaire après SBRT.....</i>	<i>79</i>
<i>Figure 21: Les 6 R de la radiobiologie.....</i>	<i>91</i>
<i>Figure 22 : Effets radiobiologiques des fortes doses par fraction sur les tumeurs.....</i>	<i>93</i>
<i>Figure 23 :Macrophage spumeux et précurseurs de la gouttelette lipidique.....</i>	<i>102</i>
<i>Figure 24 : Implication des macrophages dans la fibrose radio-induite pulmonaire.....</i>	<i>104</i>
<i>Figure 25: Modèle de parabiose</i>	<i>148</i>
<i>Figure 26 : Chimérisme sanguin dans le modèle de parabiose.....</i>	<i>149</i>
<i>Figure 27 : Recrutement des macrophages dans le modèle de parabiose.....</i>	<i>150</i>
<i>Figure 28 : Protocole de parabiose mis à jour à la suite des problèmes post-opératoires.....</i>	<i>151</i>
<i>Figure 29 : Absence de recrutement des macrophages dans le nouveau modèle de parabiose.....</i>	<i>151</i>
<i>Figure 30 : Déplétion des macrophages alvéolaires par instillation intra-nasale de liposomes clodronate.....</i>	<i>153</i>
<i>Figure 31 : Quantification des macrophages alvéolaires et interstitiels</i>	<i>154</i>
<i>Figure 32 : Images représentatives des dommages observés sur coupes de tissus pulmonaires de souris non irradiées, après instillation intranasale de liposomes PBS ou de liposomes clodronate.</i>	<i>155</i>
<i>Figure 33 : Analyses des images microCT</i>	<i>157</i>
<i>Figure 34 : Images représentatives des dommages observés sur coupes de tissus pulmonaires de souris 1 mois après irradiation focale à 80 Gy, après instillation intranasale de liposomes PBS ou de liposomes clodronate.....</i>	<i>158</i>
<i>Figure 35 : Schéma bilan de l'impact du modèle d'irradiation sur l'implication des macrophages dans les lésions pulmonaires radio-induites.....</i>	<i>188</i>
 <i>Tableau 1 : Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 5 pour la pneumopathie radique et la fibrose pulmonaire radio-induite</i>	 <i>77</i>

Liste des abréviations

μCT	Micro-Computed Tomography
3D-CRT	3-Dimensional Conformal Radiation Therapy
ABCA1	ATP-binding cassette A1
ABCA3	ATP-binding cassette A3
ABCG1	ATP Binding Cassette Subfamily G Member 1
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADORA2B	Adenosine A2b Receptor
ALF	Alveolar Lining Fluid
ARN	Acide Ribonucléique
aSMase	Sphingomyélinase acide
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adénosine Triphosphate
α-SMA	Alpha-Smooth Muscle Actin
BAL	Broncho-Alveolar Lavage
BASCs	Bronchio-Alveolar Stem Cells
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BED	Biological Effective Dose
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BPCO	Bronchopneumopathie Chronique Obstructive
BrdU	Bromodéoxyuridine
CBNPC	Cancer Broncho-pulmonaire Non à Petites Cellules
CBPC	Cancer Broncho-pulmonaire à Petites Cellules
CCLX	Chemokine Ligand type X
CCRX	C-C chemokine receptor type X
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CSFR1	Colony Stimulating Factor receptor 1
CTCAE	Common Toxicity Criteria for Adverse Events
CTV	Clinical Target Volume
CXCLX	C-X-C Motif Chemokine Ligand X
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
D _{max}	Dose Maximale

EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	Epithelial-to-Mesenchymal Transition
EndoMT	Endothelial-to-Mesenchymal Transition
EQD2	Dose Equivalente à 2 Gy
ESTRO	European Society for Radiotherapy and Oncology
ETS	Erythroblast Transformation Specific
FIP	Fibrose Idiopathique Pulmonaire
FPR	Fibrose Pulmonaire Radio-induite
GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating factor
GOLD	The Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
GTV	Gross Target Volume
HES	Hématoxyline-Eosine-Safran
HIF-1 α	Hypoxia-Inducible Factor-1 α
HPGD	15-Hydroxyprostaglandine Dehydrogenase
HU	Unité Hounsfield
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
II-X	Interleukine X
IMRT	Intensity Modulated Radiation Therapy
INF γ	Interféron gamma
IRCU	International Commission on Radiation Units
ITV	Internal Target Volume
KL-6	Krebs von den Lungen-6
KO	Knock-Out
LDL	Low Density Lipoprotein
LINAC	Linear Accelerator
LP-CLO	Liposome-Clodronate
LP-PBS	Liposome-PBS
LPS	Lipopolysaccharide
Ly6c	Lymphocyte antigen 6 C
Ly6G	Lymphocyte antigen 6 G
M1	Macrophage de type 1

M2	Macrophage de type 2
MA	Macrophage Alvéolaire
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1 (autre nom de CCL2)
MCU	Uniporteur de Calcium Mitochondrial
MHC II	Major Histocompatibility Complex type II
MI	Macrophage Interstitiel
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory protein 1 α
MLQ	Modèle Linéaire Quadratique
MLQg	Modèle Linéaire Quadratique généralisé
MLQL	Modèle Linéaire Quadratique Linéaire
MnSOD	Manganèse SuperOxyde Dismutase
MUC5B	Mucine 5B
NK	Natural Killer
NO	Oxyde Nitrique
OAR	Organ At Risk
PAP	Protéinoase Alvéolaire Pulmonaire
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PD-1	Programmed cell Death 1
PD-L1	Programmed cell Death Ligand 1
PD-L2	Programmed cell Death Ligand 2
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-Activated γ
PR	Pneumopathie Radique
PRV	Planning Organ at Risk Volume
PTV	Planning Target Volume
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
RTEL1	Regulator of Telomere Length Helicase 1
SARRP	Small Animal Radiation Research Platform
SASP	Senescent Associated Secretory Phenotype
SBRT	Stereotactic Body Radiation Therapy
SFED	Dose équivalente à une seule fraction
Sft-PA	Surfactant Protein A
Sft-PC	Surfactant Protein C

Sft-PD	Surfactant Protein D
Single Cells RNAseq	Séquençage transcriptomique sur cellule unique
SMS	Senescence-Messaging Secretome
SPP1	Secreted Phosphoprotein 1
TAM	Tumor Associated Macrophage
TERC	Telomerase RNA Component
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TLR	Toll Like Receptor
TNF α	Tumor Necrosis Factor- α
Trex1	Three-prime Repair Exonuclease 1
UGB	Utéroglobine (autre nom de CCSP)
USC	Universal Survival Curve
V-ATPase	Vacuolar-type H ⁺ -ATP
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
V _x	Volume recevant X Gy

Etat de l'art

Chapitre 1 : L'anatomie pulmonaire

Les poumons font partie de l'appareil respiratoire. L'appareil respiratoire assure, pendant l'inspiration, l'apport nécessaire de dioxygène à l'organisme, et élimine, pendant l'expiration, le dioxyde de carbone.

1) Voies aériennes supérieures

Les voies aériennes supérieures se composent des fosses nasales, du pharynx et du larynx. Leur fonction principale est d'acheminer l'air vers les voies respiratoires inférieures. C'est en traversant les voies aériennes supérieures que l'air va être filtré, humidifié et mis à la bonne température afin qu'il soit dans l'état nécessaire à de meilleurs échanges gazeux dans les voies aériennes inférieures.

a. Cavités nasales

Le nez est le premier organe du système respiratoire en contact avec l'air. Il a deux fonctions principales : l'olfaction et le conditionnement de l'air inspiré (1). Chaque narine ouvre sur le vestibule nasal, séparé par le septum nasal, et contenant des cils nasaux afin d'empêcher les larges particules d'entrer dans les voies aériennes. Le vestibule nasal s'ouvre sur les fosses nasales. Ces fosses nasales contiennent différents types de muqueuses. La première est une muqueuse squameuse, composée d'un épithélium stratifié qui, vu sa localisation à l'entrée des voies aériennes, doit être résistante aux agressions physiques subies. La seconde muqueuse est la muqueuse respiratoire bordée par l'épithélium respiratoire. Pour finir, on trouve la muqueuse olfactive, bordée par un épithélium pseudostratifié spécialisé dans la fonction d'olfaction. Cet épithélium sensoriel est principalement composé de neurones olfactifs qui possèdent des récepteurs nécessaires à l'odorat et à la sensation du goût (2).

b. Sinus paranasaux, Pharynx et Larynx

Les fosses nasales sont entourées de quatre sinus paranasaux : les sinus maxillaires, les sinus frontaux, les sinus ethmoïdaux et les sinus sphénoïdaux. Ces sinus paranasaux sont tous bordés par un épithélium respiratoire pseudostratifié et sont considérés comme étant stériles (3), bien qu'étant proches des fosses nasales, elles-mêmes colonisées par des bactéries. Ils possèdent différents rôles tels que la défense immunitaire, l'humidification de l'air, ou encore l'augmentation de la résonance de la voix (4).

Dans la continuité, l'air se déplace ensuite dans le pharynx, qui descend vers les poumons et l'estomac. En effet, le pharynx possède un rôle dans la respiration mais également dans la digestion. D'un point de vue anatomique, le pharynx se divise en trois sections : le nasopharynx, l'oropharynx et l'hypopharynx.

Le dernier segment des voies aériennes supérieures est le larynx. Il est impliqué dans la respiration et dans la vocalisation. Il protège également la trachée contre les fausses routes alimentaires grâce à un cartilage, appelé épiglotte, qui s'ouvre et se ferme afin de laisser passer l'air mais d'empêcher la nourriture de passer.

2) Voies aériennes inférieures

Les voies aériennes inférieures, également appelées arbre bronchique, commencent sous le larynx et sont constituées de la trachée, qui se divise en deux bronches principales, des poumons gauche et droit, ainsi que de toutes les ramifications bronchiques, jusqu'aux alvéoles, où ont lieu les échanges gazeux entre l'air et le sang. L'arbre bronchique assure principalement la fonction de respiration du système respiratoire.

a. La trachée

La trachée est un tube membranaire d'environ 12 cm qui forme le tronc de l'arbre bronchique pulmonaire. Elle s'étend du larynx au thorax, et finit par se diviser en deux bronches principales au niveau du hile pulmonaire. Chacune des bronches principales alimente un poumon. Chez l'humain, l'épithélium pulmonaire est pseudostratifié, c'est-à-dire que toutes les cellules sont ancrées à la lame basale bien que celles-ci soient organisées en strates (Figure 1). La trachée possède un tissu de soutien sous la lame basale, le chorion. Il est vascularisé et innervé. Sous le chorion se trouve la sous-muqueuse constituée principalement de glandes mixtes séromuqueuses. Les anneaux trachéaux en cartilage qui soutiennent l'épithélium sont maintenus par le muscle trachéal.

b. Les poumons

Les poumons sont situés dans le thorax et sont au nombre de deux. Le poumon gauche et le poumon droit sont séparés par le médiastin. Le médiastin est composé du cœur, des gros vaisseaux, de la trachée, de l'œsophage et des bronches principales. Les poumons sont contenus dans la plèvre, une membrane séreuse, composée de deux feuillets. La plèvre viscérale entoure les deux poumons, tandis que la plèvre pariétale entoure l'ensemble de la cage thoracique, comprenant le diaphragme et le médiastin. Entre ces deux feuillets, la cavité pleurale contient le liquide pleural qui permet le glissement des deux feuillets de la plèvre l'un sur l'autre pendant la respiration. La plèvre permet également de maintenir les poumons à leur place contre la paroi thoracique. Chaque poumon est composé de plus petites unités, appelées lobes pulmonaires, créées par les scissures pulmonaires. Le poumon droit est le plus gros poumon et se découpe en trois lobes, les lobes supérieur, moyen et inférieur, alors que

le poumon gauche ne se découpe qu'en deux lobes, le supérieur et l'inférieur. Chaque lobe est également divisé en segments indépendants, séparés par des cloisons conjonctives, qui recevront l'air depuis leurs propres bronches segmentaires.

Les recherches sur la physiologie et la physiopathologie pulmonaires utilisent très largement la souris, notamment grâce à ses nombreuses similarités histologiques ou de développement embryonnaire. Cependant, il existe certaines différences notables dans l'architecture des poumons ainsi que dans leur composition cellulaire entre l'Homme et la souris (Figure 2) (5). La différence principale est la distribution des lobes : alors que chez l'humain on observe deux lobes à gauche et trois à droite, la souris ne possède qu'un gros lobe unique à gauche et quatre lobes à droite. De plus, comme décrit plus haut, les lobes humains sont divisés en segments indépendants, ce qui n'est pas le cas chez la souris. D'autres différences seront décrites plus loin dans ce chapitre.

c. Les bronches et les bronchioles

La trachée se divise en deux bronches principales, qui alimentent chacune un des poumons, gauche et droit. La bronche principale gauche se divise en deux bronches lobaires alors que la bronche principale droite se divise en trois bronches lobaires. Les bronches lobaires se ramifient en bronches intermédiaires et enfin en bronches segmentaires. Ces bronches permettent d'aérer tous les sous-ensembles des poumons. Les bronches segmentaires se divisent en bronchioles qui donnent naissance aux bronchioles terminales et respiratoires. Les bronchioles sont caractérisées par une disparition du cartilage dans leur paroi par rapport aux bronches. Les bronchioles respiratoires sont les ramifications les plus petites de l'arbre bronchique avec un diamètre de moins d'un millimètre. Au bout de ces bronchioles respiratoires se trouvent les alvéoles.

d. Histologie de l'épithélium pulmonaire

Les parois des voies aériennes sont constituées de trois types de tissus :

- La muqueuse, principalement l'épithélium respiratoire dont la composition varie en fonction de sa localisation au sein de l'arbre bronchique, et qui sera détaillée ci-dessous.
- La sous-muqueuse, composante fibro-musculaire, plus ou moins cartilagineuse en fonction de sa localisation dans l'arbre bronchique.
- L'adventis, tissu conjonctif de soutien où circulent nerfs et vaisseaux.

L'épithélium repose sur le chorion, lui-même reposant sur le muscle Reissessen, dont l'épaisseur diminue le long de l'appareil respiratoire, et qui contrôle le diamètre de la lumière bronchique.

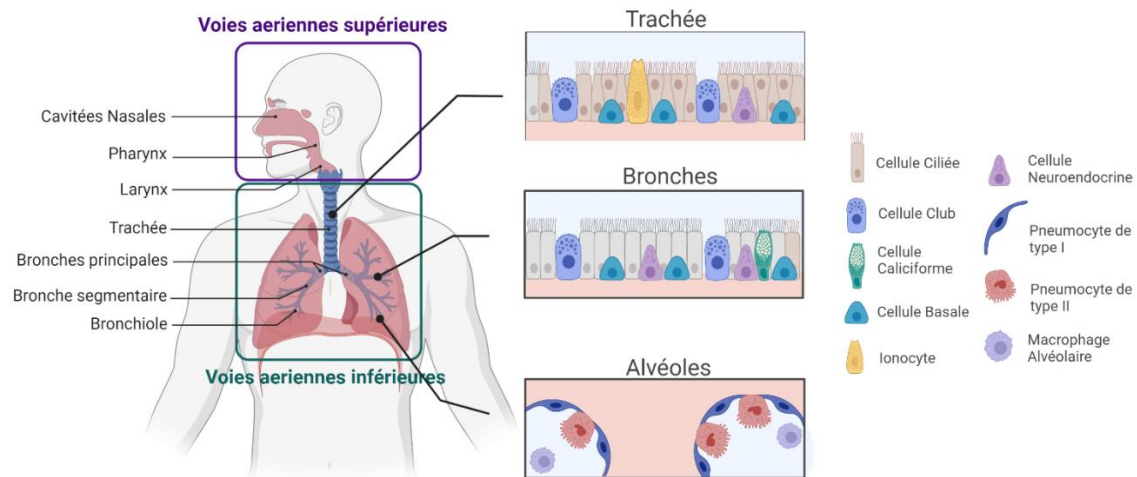


Figure 1 : Anatomie pulmonaire et composition de l'épithélium

La composition de l'épithélium pulmonaire n'est pas la même suivant la localisation dans les voies aériennes pulmonaires.

L'épithélium pulmonaire est un épithélium pseudostratifié, c'est-à-dire que malgré la superposition des cellules, toutes les cellules sont ancrées sur la lame basale. Cet épithélium est composé de différents types cellulaires (Figure 1) :

- Les cellules ciliées possèdent à leur surface apicale des cils, assurant ce que l'on appelle la clairance muco-ciliaire, qui permet l'élimination des pathogènes et des particules emprisonnées dans le mucus. Elles représentent 50 à 90 % des cellules épithéliales des voies respiratoires (6).
- Les cellules caliciformes ou à mucus : ces cellules secrètent des mucines, constituants du mucus, qui permettent d'emprisonner les particules étrangères. Ces cellules sont capables de se multiplier en réaction à une inflammation, ce qui a pour conséquence une augmentation de la quantité de mucus sécrété (7). Elles représentent 5 à 30 % des cellules des voies respiratoires (6).
- Les cellules séreuses secrètent des protéines entrant dans la composition du mucus.
- Les cellules neuroendocrines sont les cellules qui détectent les variations de pO₂ et de pCO₂. Elles synthétisent, stockent et secrètent des substances capables de stimuler les fibroblastes et de provoquer une vasoconstriction en réponse aux fluctuations d'oxygène, telles que la sérotonine ou la gastrine (8). Elles représentent moins de 1% de la population cellulaire de l'épithélium (9).
- Les ionocytes permettent la régulation du pH dans les bronches grâce à la présence à leur surface de la pompe à protons *Vacuolar-type H⁺-ATPase* (V-ATPase) et des canaux ioniques *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR), et de ce fait participent à la clairance mucociliaire. Les

ionocytes seraient une source importante de CFTR, récepteur muté impliqué dans la mucoviscidose, bien qu'elles ne représentent que 1 à 2% des cellules de l'épithélium pulmonaire (10).

- Les cellules souches basales : ce sont des cellules conoïdales avec de larges noyaux. Elles assurent le renouvellement cellulaire de l'épithélium (11). Elles composent en moyenne 30% de l'épithélium pulmonaire (12).
- Les cellules Club sont des cellules sécrétrices en forme de dôme, non ciliées. Elles constituent les cellules épithéliales principales des bronchioles terminales et représentent en moyenne 9% de l'épithélium pulmonaire total (13). Elles jouent un rôle protecteur et détoxifiant grâce au cytochrome P450 qu'elles possèdent en grande quantité, ce qui leur permet de métaboliser plus rapidement les substances exogènes. Les cellules Club sont également capables de participer au renouvellement épithélial (13).

Ces différentes cellules qui composent l'épithélium respiratoire ne sont pas distribuées de manière homogène dans l'arbre bronchique (Figure 2).

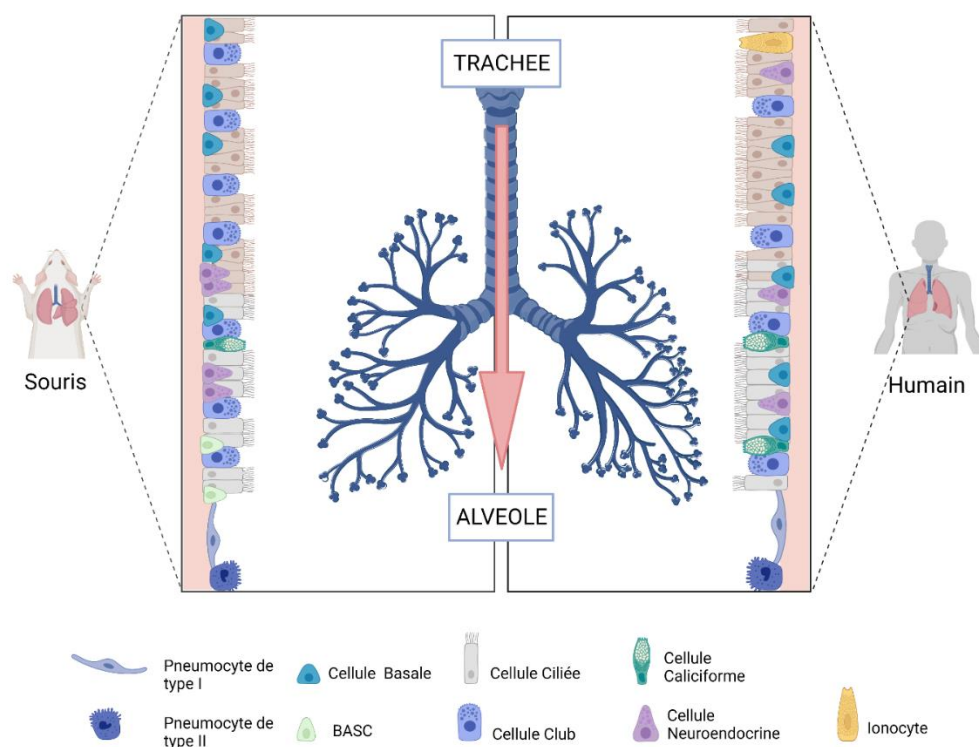


Figure 2 : Différences de composition entre épithéliums murin et humain de la trachée à l'alvéole

Bien que le modèle murin soit très utile et utilisé pour l'étude de la physiopathologie pulmonaire, les voies aériennes pulmonaires murines présentent des différences avec les voies aériennes humaines. BASC : Bronchio-Alveolar Stem Cell.

Comme déjà décrit plus haut, il existe un certain nombre de différences entre les systèmes respiratoires humain et murin. Une de ces différences est la composition cellulaire de l'épithélium (Figure 2). En effet, chez l'homme, l'épithélium de la trachée est principalement composé de cellules ciliées, de cellules basales et de cellules à mucus. L'épithélium des bronches est similaire à celui de la trachée mais se rajoutent les cellules Club, les cellules séreuses et les cellules neuroendocrines. Au contraire, l'épithélium pulmonaire murin, bien qu'également pseudostratifié, se compose principalement de cellules épithéliales non ciliées, avec moins de cellules à mucus que chez l'humain, mais plus riche en cellules basales (14). Les bronchioles sont principalement composées de cellules ciliées et de cellules Club, avec des clusters de cellules neuroendocrines présents aux embranchements des bronchioles. Alors que chez l'humain, les cellules basales sont présentes partout dans l'épithélium pulmonaire, chez la souris adulte, le plus grand nombre de cellules basales est retrouvé dans la trachée, et leur nombre diminue en même temps que le diamètre des bronches diminue. Il n'y a pas de cellules basales dans les bronches terminales (15, 16). Les bronchioles respiratoires humaines possèdent un épithélium cuboïdal aboutissant aux alvéoles bordées de cellules épithéliales alvéolaires, les pneumocytes. Les bronchioles terminales murines sont également bordées d'un épithélium cuboïdal, mais des différences sont observées dans le conduit de jonction bronchio-alvéolaire. Le conduit bronchio-alvéolaire est la transition entre les bronchioles et les alvéoles. Il contient chez la souris des cellules souches bronchio-alvéolaires spécifiques, les BASCs (Bronchio-Alveolar Stem Cells). Ces cellules expriment le marqueur des cellules Club (utéroglobine, UBG) et le marqueur des pneumocytes de type 2 (surfactant protéin C, SFTPC). Ces cellules semblent participer au renouvellement cellulaire des bronchioles et des alvéoles (17). Dans l'épithélium humain, ces cellules n'ont pas encore été identifiées (18).

3) L'alvéole pulmonaire

Les poumons humains adultes contiennent environ 500 millions d'alvéoles pulmonaires allant de 0.1 à 0.2 mm de diamètre, aux parois très fines (0.2 μm). En comparaison, la souris possède des alvéoles beaucoup plus petites, autour de 0.04 mm de diamètre, en fonction de la souche de la souris (19). Les parois alvéolaires sont appelées septas alvéolaires, et constituent le lieu des échanges gazeux. Ces septas élastiques permettent de s'étirer pendant l'inspiration et ainsi d'augmenter la surface disponible aux échanges gazeux, les parois des alvéoles étant en contact avec le réseau capillaire pulmonaire. Les septas alvéolaires sont bordés d'un épithélium aplati très spécifique composé principalement de deux types cellulaires : les pneumocytes de type I et les pneumocytes de type II (20). Ensemble, l'alvéole et les capillaires forment une membrane respiratoire qui permet l'hématose par simple diffusion : c'est-à-dire le

passage de l'O₂ des alvéoles aux capillaires et du CO₂ des capillaires aux alvéoles. Les fonctions principales de l'épithélium alvéolaire sont les échanges gazeux, la barrière physique entre l'air et le parenchyme pulmonaire et l'immunorégulation. Pour assurer ces différentes fonctions, l'alvéole se compose d'autres éléments tels que le surfactant ou les macrophages (Figure 3).

a. Les cellules épithéliales alvéolaires

L'épithélium alvéolaire est composé de pneumocytes de type I et de type II. Les pneumocytes de type I possèdent une morphologie qui leur permet d'assurer leur rôle dans les échanges gazeux ainsi que leur fonction de barrière physique contre les particules nocives (bactéries, virus, etc...). Les pneumocytes de types II assure le maintien et la régénération de l'épithélium alvéolaire (21).

Les pneumocytes de type I recouvrent 95% de la surface des alvéoles, bien que leur nombre ne dépasse pas celui des pneumocytes de type II. Leur morphologie longue et aplatie assure la maximisation de la surface d'échange entre les alvéoles et les capillaires. Les pneumocytes de type I, avec les capillaires, forment la barrière alvéolo-capillaire. Cette barrière doit être extrêmement fine, moins de 1µm, afin de permettre l'hématose par diffusion passive. En plus des cellules endothéliales des capillaires, les pneumocytes de type I sont également en contact direct avec les macrophages, présents dans les alvéoles, et participent ainsi à la réponse immunitaire. *In vitro*, des pneumocytes de type I immortalisés ont été montrés capables d'exprimer des récepteurs Toll-like (TLR) et de sécréter des cytokines pro-inflammatoires en réaction à une infection bactérienne (22). Les pneumocytes de type I participent également à la sécrétion du fluide alvéolaire (alveolar lining fluid ou ALF) et assurent essentiellement son équilibre ionique grâce à des canaux de transport actif de sodium et de potassium (23). Le liquide alvéolaire possède plusieurs fonctions : dans la respiration afin d'améliorer les échanges gazeux mais également dans la fonction de barrière protectrice en emprisonnant les particules pour qu'elles soient rejetées. Ce liquide est composé de protéines du surfactant, d'ions, d'hydrolases alvéolaires et de protéines immunitaires (24). Le fluide alvéolaire, s'il est en excès, peut conduire à un œdème alvéolaire et perturber les échanges gazeux.

Les pneumocytes de type II représentent 4% de la surface alvéolaire et leur fonction principale est de produire et de sécréter les protéines du surfactant. Ce sont les seules cellules à produire tous les composants du surfactant, et la protéine C du surfactant est un marqueur spécifique de ces cellules (25). Le surfactant est un agent tensioactif qui permet aux alvéoles de maintenir l'intégrité de leur structure et de les empêcher de collapser pendant l'expiration (26). En effet, un défaut de synthèse du surfactant entraîne une détresse respiratoire importante chez les grands prématurés (27). Le surfactant joue également un rôle important dans la lutte contre les micro-

organismes. Les pneumocytes de type II sont des cellules cuboïdales, avec un cytoplasme occupé en grande partie par des corps lamellaires qui permettent la production intensive des protéines du surfactant (28). Les microvillosités présentes à leur surface apicale sont utiles pour le recyclage du surfactant et l'élimination des microparticules. En effet, les protéines A et D du surfactant (Sft-PA et Sft-PD) sont capables d'agglomérer les microparticules, grâce à leurs groupements hydrophobes, afin qu'elles soient éliminées (29). Les pneumocytes de type II possèdent également une fonction immunorégulatrice importante. En effet, il a été montré dans des expériences *in vitro* de coculture de macrophages et de pneumocytes de type II, infectés par les pathogènes *Mycobacterium tuberculosis* ou *M. avium complex*, que les expressions géniques de *Tumor necrosis factor- α* (TNF α), de *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating factor* (GM-CSF), de *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP-1) et de l'Interleukine 8 (IL-8) étaient augmentées dans les pneumocytes de type II (30). Une autre fonction des pneumocytes de type II est la régénération de l'alvéole. Les pneumocytes de type II sont considérés comme les « cellules souches » de l'épithélium alvéolaire adulte. Ils sont capables de se multiplier et de se différencier en pneumocytes de type I en réponse à une lésion ou dans le cadre de l'homéostasie basale (31). En conditions homéostatiques, le renouvellement alvéolaire chez l'homme se fait en quatre à six semaines (32).

b. Les capillaires pulmonaires

Les cellules endothéliales composent les capillaires sanguins présents au niveau de la barrière alvéolo-capillaire. Ces cellules constituent une monocouche, appelée endothélium, et reposent sur une membrane basale. Parmi les cellules endothéliales des capillaires pulmonaires, il y a les aérocytes. Ils ont été récemment identifiés et n'expriment pas les marqueurs classiques des cellules endothéliales comme le facteur de Von Willebrand et expriment la HPGD (15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase) leur permettant de dégrader les prostaglandines (33). Les aérocytes participent à la structure de la membrane respiratoire avec les pneumocytes de type I et sont des cellules endothéliales spécialisées dans les échanges gazeux. L'endothélium, perméable, permet les échanges gazeux mais également le passage des nutriments et l'infiltration immunitaire. Il est capable de réguler sa perméabilité en modulant ses jonctions intercellulaires. Cette perméabilité, et l'action des pressions partielles de CO₂ et d'O₂, rendent possible l'hématose, c'est-à-dire la diffusion passive de l'O₂ vers le sang et du CO₂ vers les alvéoles (34, 35). Les cellules endothéliales régulent le passage des cellules immunitaires à travers les vaisseaux vers les tissus grâce à des molécules d'adhésion présentes à leur surface telles que *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1), *InterCellular Adhesion Molecule* (ICAM) ou encore *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* (PECAM-1) (36, 37).

Les capillaires sanguins au niveau de l'alvéole sont entourés par des cellules contractiles appelées péricytes, ancrées à la membrane basale de l'endothélium. Elles sont connues pour réguler l'angiogenèse et pour leur rôle dans le remodelage de la matrice extracellulaire en conditions pathologiques comme lors de la fibrose pulmonaire. De plus, les péricytes expriment également des gènes classiques de surveillance immunitaire, généralement attribués aux cellules immunitaires comme les macrophages. Ils sont également capables d'être une ancre pour les cellules immunitaires dans les tissus non lymphoïdes. En effet, il a été observé que les neutrophiles ou les monocytes pouvaient utiliser la gaine vasculaire des péricytes pour se déplacer. Les péricytes peuvent également être une source de myofibroblastes (38).

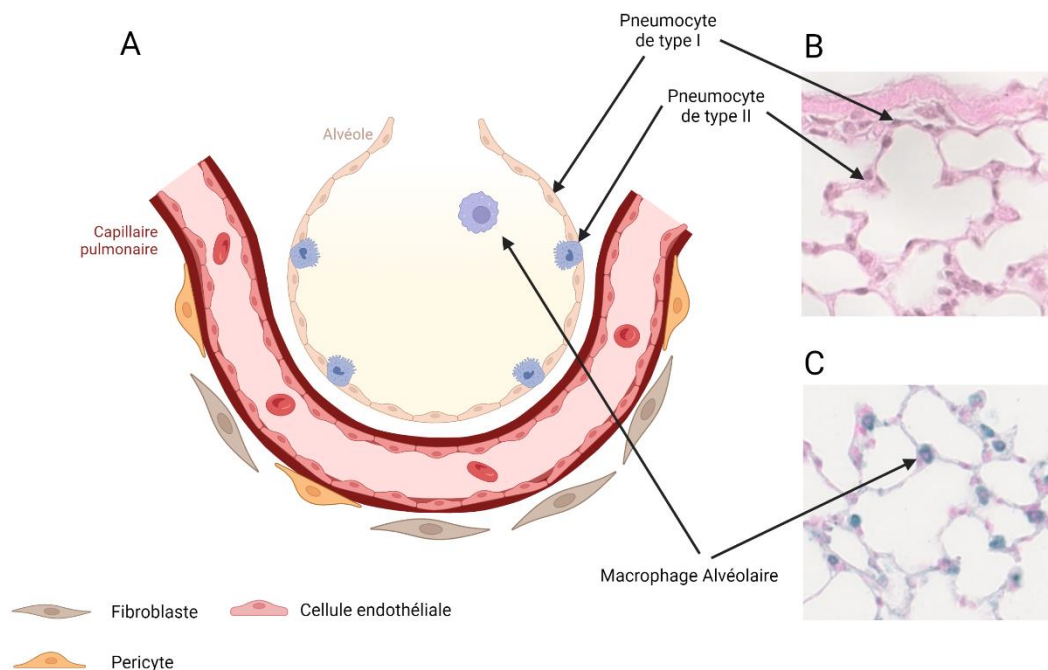


Figure 3 : L'alvéole pulmonaire

A : Schéma de l'alvéole pulmonaire. B : Image de coloration Hémalum-Eosine-Safran d'une alvéole de souris présentant des pneumocytes de types I et II. C : Image d'un marquage CD68 marquant les macrophages dans les alvéoles pulmonaires de souris.

c. Les fibroblastes alvéolaires

Les fibroblastes pulmonaires ne sont pas une population homogène, ils peuvent être très différents sur le plan des marqueurs exprimés, de leurs différentes sécrétions et de leur morphologie. Les fibroblastes majoritaires sont les fibroblastes résidents, présents dans le parenchyme pulmonaire entre les alvéoles. Ils participent à la production de la matrice extra cellulaire, nécessaire à la structure des poumons et à de bons échanges gazeux (39). Ils expriment également fortement les gènes associés à la production de collagènes (40). Les lipofibroblastes, eux, sont des fibroblastes riches en lipides, importants pour la prolifération des pneumocytes de type II et qui participent à la composition du surfactant (39). La présence des lipofibroblastes dans les poumons sains est discutée dans la littérature car ils sont principalement observés en conditions pathologiques (41). Ces différents types de fibroblastes peuvent être activés en myofibroblastes. Lorsqu'ils sont activés, ils expriment l' α -SMA et possèdent une activité contractile. Les myofibroblastes sont principalement impliqués dans le remodelage pulmonaire et la cicatrisation tissulaire. L'activation des fibroblastes est une composante importante des processus fibreux pulmonaires. En effet, le TGF- β , au centre de la pathogénèse de la fibrose pulmonaire (que cela soit pour la fibrose idiopathique pulmonaire ou dans la fibrose pulmonaire radio-induite), a pour action l'activation de différents types cellulaires en myofibroblastes (42, 43). L'implication des fibroblastes et de leur activation sera détaillée dans le chapitre dédié « Radiobiologie et radiopathologie pulmonaire ».

d. Les macrophages alvéolaires

Les macrophages alvéolaires sont présents dans les alvéoles mais ne font pas partie à proprement parler de la structure des alvéoles pulmonaires. Cependant, ils sont indispensables au bon fonctionnement de celles-ci. Les macrophages sont des cellules immunitaires très plastiques impliquées dans de nombreuses pathologies pulmonaires. En effet, étant donné leur localisation, les macrophages représentent la première barrière de défense contre l'extérieur, il y en a en moyenne un par alvéole en conditions normales. Il en existe différents types dans les poumons dont les caractéristiques et les fonctions seront détaillées dans le chapitre suivant « Macrophages pulmonaires ».

Chapitre 2 : Les macrophages pulmonaires

Les macrophages sont des cellules présentes dans tout l'organisme qui ont une fonction de soutien et de maintien de l'homéostasie tissulaire. Ce sont des cellules phagocytaires à l'interface entre les immunités innée et adaptative. En effet, elles sont à la fois des cellules actrices indispensables de la réaction inflammatoire mais également coordinatrices de l'activité leucocytaire. Les macrophages dits « résidents », présents physiologiquement au sein des tissus, sont parmi les premiers intervenants sur les lieux de l'inflammation. Les macrophages résidents vont phagocyter les antigènes présents dans les tissus et présenter à leur surface les peptides résultants afin d'éduquer le système immunitaire adaptatif (lymphocytes, NK, etc.). D'autre part, les macrophages peuvent être également issus de la différenciation monocytaire. En effet, lors de la réaction inflammatoire, des signaux chimioattractants, tels que des cytokines pro-inflammatoires, sont relargués dans la circulation ce qui permet le phénomène de recrutement des leucocytes. Parmi ces leucocytes, on retrouve les monocytes qui sont capables de traverser la paroi endothéliale, toujours sous l'action des cytokines chimioattractantes, et de se différencier en macrophages, dits « recrutés » (Figure 4). Les macrophages, qu'ils soient recrutés ou résidents, ont des caractéristiques associées à leur localisation dans l'organisme (Figure 4). Les cellules de Kupffer sont les macrophages présents dans le foie, ils sont en contact direct avec le sang ce qui leur permet d'éliminer les globules rouges sénescents et de réaliser une surveillance immunitaire. Les ostéoclastes sont les macrophages des os, ils participent au renouvellement osseux continu. Les cellules de la microglie sont les macrophages résidents du système nerveux central, ils ont une capacité phagocytaire importante et sont principalement impliqués dans la défense contre les pathogènes. Les macrophages pulmonaires, eux, servent notamment à cataboliser le surfactant. Il en existe différents types, qui seront détaillés dans la suite de ce chapitre.

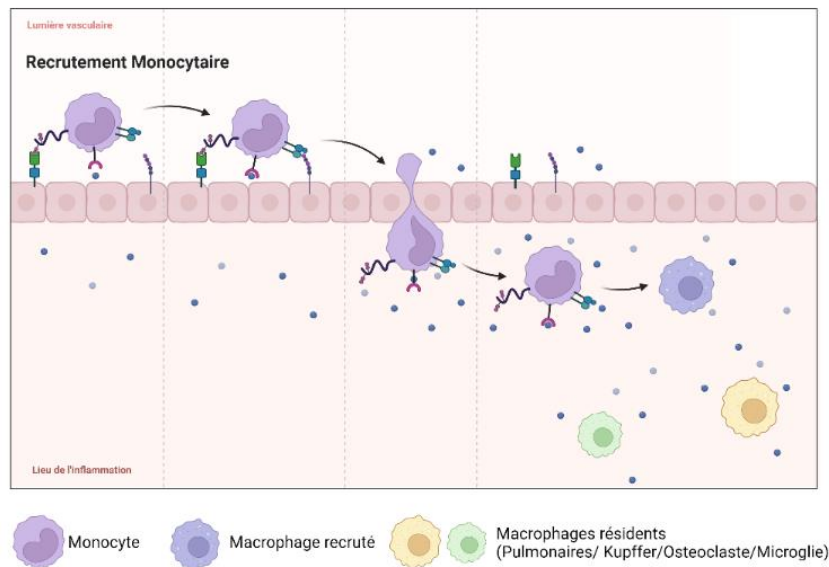


Figure 4 : Recrutement monocytaire et macrophages résidents dans les tissus

Les macrophages recrutés sont issus de la différenciation monocytaire, contrairement aux macrophages résidents, déjà présents dans les tissus.

1) Origines et différenciation des macrophages pulmonaires

Les macrophages recrutés sont issus de la différenciation monocytaire. Les macrophages résidents, eux, ont longtemps été considérés comme tous issus du sac vitellin pendant la vie embryonnaire et renouvelés pendant la vie post-natale par les macrophages issus de la circulation (44). Selon certaines hypothèses, dans l'interstitium pulmonaire, les macrophages fœtaux se différencieraient en macrophages interstitiels (MI) puis en macrophages alvéolaires (MA), qui seraient la forme définitive des macrophages pulmonaires (45, 46). Une fois la vie fœtale terminée, des macrophages infiltrants, issus de la circulation, seraient présents pour maintenir les stocks de MAs, avec comme forme intermédiaire, les MIs (47, 48). Cependant, notamment grâce à des expériences de parabiose, des études ont démontré que les MAs peuvent se diviser et proliférer indépendamment des MIs et des monocytes issus de la circulation (49). D'autre part, des expériences de lignage génétique ont montré que les MAs étaient dérivés du foie fœtal et non du sac vitellin (Figure 5) (50). Ces résultats ont poussé des chercheurs à suivre les différents groupes de macrophages résidents du poumon, afin de déterminer précisément leur origine. Chez la souris, via des immunomarquages sur des coupes d'embryons et un traçage génétique, trois vagues de colonisation des poumons par les macrophages ont été observées, deux pendant la vie fœtale et une post-natale (51). Ainsi, une première vague de macrophages issus du sac vitellin commence à arriver dans l'interstitium du poumon pendant le développement embryonnaire à partir du stade E.10.5. Deux jours plus tard, une seconde vague de macrophages, issus probablement du foie fœtal, arrive également dans l'interstitium

pulmonaire. Pendant la première semaine après la naissance, ces macrophages, issus de la deuxième vague de colonisation, entrent dans les alvéoles, nouvellement développées, pour devenir les MAs. Au même moment, la troisième vague de macrophages arrive au poumon pour remplacer seulement les MIs "primitifs" issus de la première vague de colonisation (Figure 5).

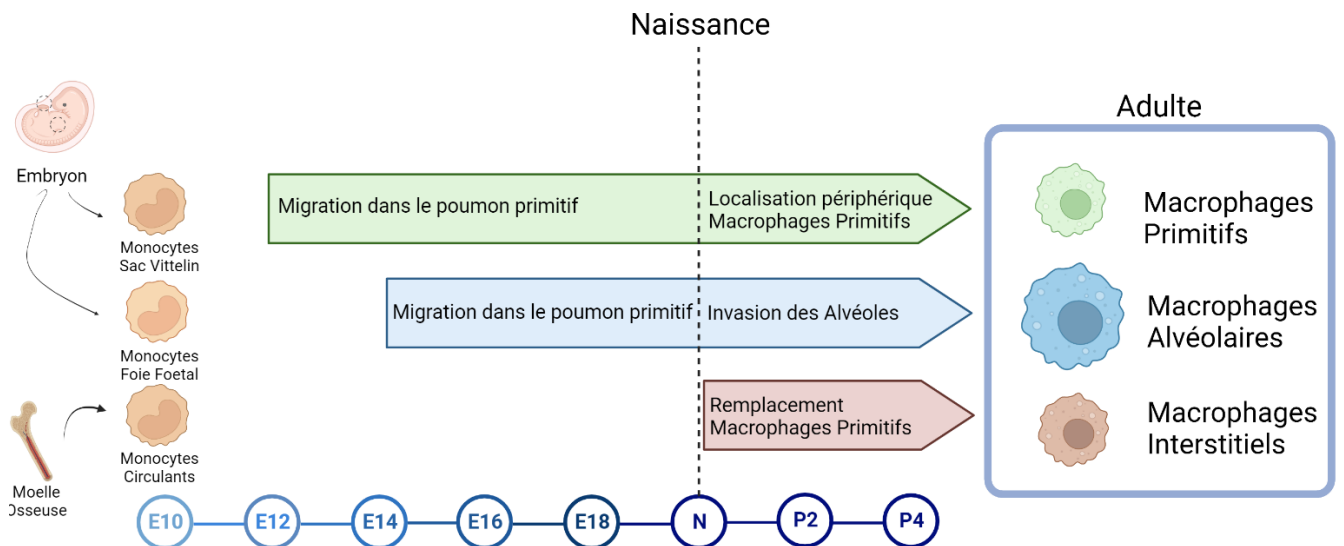


Figure 5 : Origine des macrophages résidents pulmonaires (51)

Les macrophages des poumons adultes possèdent des origines embryonnaires différentes. Les macrophages alvéolaires sont issus du foie fœtal et les macrophages interstitiels sont issus dans un premier temps du sac vitellin puis, après la naissance, de la différenciation monocytaire. Une fois la vie fœtale terminée, il est encore peu clair si les macrophages interstitiels peuvent se différencier en macrophages alvéolaires en réponse à une lésion ou si ce sont les macrophages issus de la différenciation monocytaire qui alimentent le pool de macrophages alvéolaires.

Des expériences de parabiose ont montré que lors de cette troisième vague, les macrophages sont issus de la circulation sanguine et donc de la différenciation monocytaire (51). Les macrophages alvéolaires et interstitiels ont des origines embryonnaires différentes, leur localisation définitive est bien définie par ces origines. Ils sont capables de maintenir leurs populations indépendamment l'une de l'autre. Cependant, lorsqu'une réaction inflammatoire se met en place, il y a un afflux de macrophages infiltrants capables de remplacer les macrophages résidents impactés (52). La différenciation des monocytes en MA est connue pour dépendre de la production du facteur de stimulation GM-CSF, notamment par les pneumocytes de type II (50). Le GM-CSF, lorsqu'il se fixe sur son récepteur, entraîne une cascade de réactions qui lui permettent d'exercer une influence sur différentes fonctions des MAs.

L'action du GM-CSF a lieu via l'activation du facteur de transcription PU.1, un membre de la famille des facteurs de transcription ETS (*Erythroblast Transformation Specific*) et régulateur de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (53). PU.1 est connu pour être impliqué dans la différenciation tardive des macrophages. Les gènes qu'il régule codent pour des récepteurs à la surface des MAs. PU.1 influence donc de nombreuses fonctions des MAs comme la phagocytose, la dégradation des pathogènes capturés ou la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

2) Les macrophages alvéolaires

Comme leur nom l'indique, les macrophages alvéolaires sont les macrophages présents dans les alvéoles pulmonaires. Il y en a en moyenne, en conditions normales, un par alvéole et ils sont capables de se déplacer d'alvéole en alvéole si besoin face à une agression extérieure (54). Ce sont les macrophages pulmonaires pour lesquels il existe le plus d'informations dans la littérature. Ils sont facilement accessibles grâce au lavage broncho-alvéolaire (BAL, *Broncho-Alveolar Lavage*). Ces macrophages sont fortement exposés à l'environnement via l'air inhalé, ils sont donc la première barrière immunitaire face aux bactéries et particules polluantes par exemple. Les MA activent de multiples voies pro-inflammatoires, afin de lutter efficacement contre les pathogènes, tout en développant une réponse anti-inflammatoire afin de protéger les tissus contre des dommages excessifs. De nombreuses études ont montré que la capacité de phagocytose des MA était altérée dans l'asthme et notamment dans le cadre d'infections bactériennes par *Haemophilus influenzae* et *Staphylococcus aureus* (55). De la même manière, chez des enfants, la sévérité de l'asthme a été corrélée à une augmentation des marqueurs du stress oxydatif et à une réduction de la capacité de phagocytose bactérienne par les MA. En effet, les MA produisent beaucoup d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*). D'ailleurs, une supplémentation *ex vivo* de glutathion, un tripeptide antioxydant, permet de rétablir les capacités de phagocytose des MA (56). Le stress oxydatif peut donc contribuer à l'altération de la capacité phagocytaire des macrophages dans l'asthme. Dans le cadre de l'exposition aux rayonnements ionisants, les ROS générés à la suite de l'irradiation des tissus constituent l'un des principaux facteurs de développement des pneumopathies radiques. En effet, une augmentation de ROS après une exposition aux rayonnements conduit à l'activation de la voie de signalisation du TGF- β (57). Ces mécanismes seront plus détaillés dans le chapitre « Radiobiologie et radiopathologie pulmonaire ».

Comme la plupart des macrophages résidents, les MA possèdent des rôles propres à leur localisation, en dehors de leurs actions immunitaires. Les MA participent au recyclage du surfactant présent dans les alvéoles (Figure 6). En effet, ils prennent en charge 20% de la dégradation du surfactant dans les espaces alvéolaires, le recyclage des 80% restants étant assuré par les pneumocytes de type II. D'ailleurs, contrairement à la plupart des autres types de macrophages, les MA ne basent pas leur métabolisme sur le glucose mais sur les lipides, disponibles via le surfactant (58, 59). En effet, les fluides pulmonaires contiennent 3 à 20 fois moins de glucose que le plasma (60), les macrophages résidents présentent donc très peu d'activité glycolytique, même en conditions pathologiques, contrairement aux macrophages issus de la différenciation monocyttaire capables d'effectuer une reprogrammation glycolytique en réponse au LPS (58). D'autre part, lorsque que le surfactant n'est pas correctement dégradé par les MA, il est accumulé dans les voies respiratoires et empêche les échanges gazeux de se dérouler correctement. La protéinose alvéolaire pulmonaire (PAP) est un syndrome respiratoire rare caractérisé par une accumulation de surfactant, avec un tableau clinique souvent compliqué par des infections, ayant plusieurs conséquences cliniques allant de l'insuffisance respiratoire au décès (61). Les études sur cette pathologie ont permis de mettre en évidence des mécanismes impliquant les MA dans le métabolisme du surfactant. En effet, l'observation du développement de dommages pulmonaires ressemblant à la PAP chez des souris knock-out pour le GM-CSF suggère un défaut fonctionnel des MA. En l'absence de stimulation par le GM-CSF, les MA n'assurent plus la clearance du surfactant, participant ainsi au développement de la pathologie (62). D'autre part, le GM-CSF est nécessaire à l'expression de PPAR γ , un facteur de transcription clé dans l'adaptation des macrophages dans les poumons après différenciation (Figure 6) (63). De la même manière que pour le GM-CSF, les souris dont les macrophages foetaux sont déficients en PPAR γ montrent une absence de MA à la naissance et développent un syndrome sévère de PAP (63). PPAR γ possède un rôle déterminant dans le métabolisme du cholestérol par les MA. En effet, lorsque que PPAR γ est invalidé spécifiquement dans des MA, ces macrophages présentent une diminution de l'expression de gènes régulant l'homéostasie du surfactant et se chargent de lipides, c'est ce que l'on appelle les macrophages spumeux (64). Chez des patients atteints de PAP, il a été démontré que le cholestérol est le lipide principalement accumulé dans les MA. Dans cette étude, un traitement par statines, aux propriétés anti-hypercholestérolémiantes, montre une amélioration du syndrome de PAP chez les patients, mais également chez des souris déficientes pour *Csf2rb*, modèle de souris classiquement utilisé pour modéliser la PAP (65). Les macrophages spumeux ont été à l'origine décrits dans le cadre de l'athérosclérose (66). Comme nous l'avons vu, les MA sont capables de devenir des macrophages spumeux. Ils sont d'ailleurs suspectés d'être impliqués dans de nombreuses pathologies pulmonaires,

indépendamment du métabolisme du surfactant, comme la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et la fibrose idiopathique pulmonaire (FIP). Cela sera décrit en détails dans le chapitre suivant intitulé « pathologies pulmonaires et macrophages ». D'ailleurs, dans le cadre de la fibrose radio-induite, nous observons de nombreux macrophages spumeux dans les poumons des souris après irradiation stéréotaxique, suggérant que les MA pourraient être impliqués dans le développement de la pneumopathie radique.

Les macrophages alvéolaires sont donc des cellules plastiques capables de reprogrammation métabolique en fonction de la situation physiopathologique, en produisant des ROS pour une phagocytose efficace, en favorisant la respiration mitochondriale pour le recyclage du surfactant. Cette reprogrammation peut s'avérer parfois délétère et comprendre ses mécanismes pourrait ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques (67).

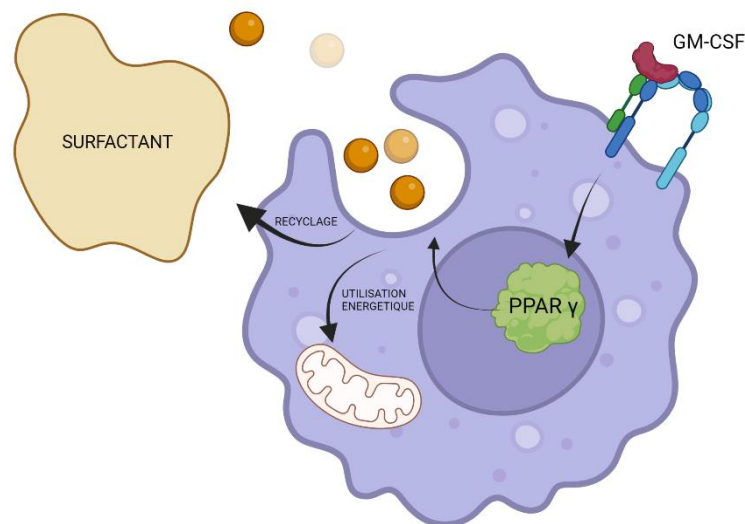


Figure 6 : Catabolisme du surfactant dans les macrophages alvéolaires

Le GM-CSF est nécessaire à la maturation des macrophages alvéolaires. Il induit l'expression de PPAR γ , un facteur de transcription impliqué dans le métabolisme du surfactant. PPAR γ est nécessaire au flux de lipides dans les macrophages. Il régule l'utilisation énergétique des lipides issus du catabolisme du surfactant ou leur relargage dans le milieu interstitiel pour qu'ils soient utilisés et recyclés en surfactant *de novo*. Son invalidation induit l'accumulation de lipides dans le cytoplasme macrophagique.

3) Les macrophages interstitiels

Les macrophages interstitiels (MI) sont localisés dans le parenchyme pulmonaire en dehors des alvéoles. Les MIs sont 8 fois moins nombreux que les MAs dans un poumon de souris contrôle (68). Ils sont plus petits (69), avec un noyau irrégulier, une surface plus lisse (70) et ont un cytoplasme plus riche en vacuoles que les MAs (71). Ils sont d'ailleurs souvent considérés comme étant un des états intermédiaires des macrophages alvéolaires (72). Les MIs possèdent de nombreux marqueurs en commun avec les MAs, qui sont les marqueurs classiques des macrophages : CD68, CD64, F4/80, Lysozyme 2 ou encore MerKT (73), mais n'expriment pas le CD11c ou le Siglec F. Jusqu'à récemment, il était difficile d'étudier spécifiquement les MIs, trop proches phénotypiquement des macrophages alvéolaires. L'arrivée de nouvelles techniques comme le séquençage sur cellule unique (*Single Cells RNAseq*) a permis de mieux qualifier ces macrophages, jusqu'alors trop peu étudiés. D'une part, Gibbings *et al.* ont observé chez la souris la présence de trois sous-types de MIs, se distinguant principalement grâce à MHC II et CD11c : MI1 (CD11c^{lo}MHCII^{lo}), MI2 (CD11c^{lo}MHCII^{hi}) et MI3 (CD11c^{hi}MHCII^{hi}) (68). Les MI1 et MI2 seraient très similaires et ne se différencieraient que sur le gène MHC II, alors que les MI3 sont plus largement différents des deux autres sous-types. Les auteurs ont également utilisé des techniques d'incorporation BrDU, de parabiose et de greffe de moelle osseuse afin de mettre en évidence que ces trois sous-populations d'MIs avaient une durée de vie longue mais se différenciaient également par leur capacité à se renouveler. En effet, les MI3 semblent se renouveler via la différenciation monocyttaire, ce qui n'est pas le cas des MI1 et MI2. D'ailleurs les MI3 semblent plus proches des monocytes que les MI1 et MI2, bien qu'ils expriment faiblement le Ly6C, alors que les MI1 et MI2 seraient des macrophages plus matures, présentant un état d'activation différent. D'autre part, deux autres populations d'MI ont été identifiées par Chakarov *et al.* (74), une population Lyve1^{lo}MHCII^{hi} observée autour des fibres nerveuses entourant les bronchioles, et une population Lyve1^{hi}MHCII^{lo} observée autour des vaisseaux. Ces populations de macrophages résidents ont également été trouvées dans d'autres tissus comme le cœur ou la peau. Allant dans la même direction plus récemment, une étude complète incluant des expériences de parabiose et une analyse multiomique (75), comparant les macrophages résidents dans plusieurs organes (poumon, rein, cœur, foie et cerveau) sur le plan génétique et protéique, a montré 3 sous-populations parmi les MIs des poumons: les macrophages TLF+ (TIMD4⁺ et/ou LYVE1⁺ et/ou FOLR2⁺) maintenus par auto-renouvellement indépendamment de la différenciation monocyttaire, les macrophages CCR2⁺ (TIMD4⁻/LYVE1⁻/FOLR2⁻) presque entièrement renouvelés par les monocytes, et les macrophages MHC-II^{hi} (TIMD4⁻/LYVE1⁻/FOLR2⁻/CCR2⁻), remplacés par différenciation monocyttaire de manière ponctuelle. Les auteurs suggèrent d'ailleurs que la population de macrophages présents autour des bulbes nerveux Lyve1^{lo}MHCII^{hi}

serait finalement divisée en deux sous-populations de macrophages résidents d'origine distinctes, les macrophages CCR2⁺ et les macrophages MHC II^{hi} (74). Dans cette étude, ils appréhendent également les macrophages en fonction de leur localisation. En effet, lorsqu'ils déplètent les MI Lyve1^{hi}MHCII^{lo}, présents autour des vaisseaux, ils observent une augmentation de la sévérité de la fibrose dans un modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris (74). Ils ont également montré que les MI présents autour des bulbes nerveux avaient une forte capacité immuno-régulatrice. Les MI Lyve1^{lo}MHCII^{hi} secrètent spontanément la cytokine Il-10 et augmentent sa sécrétion en réaction à la présence de la bactérie CpG (71). Par la présence de MHC II à leur surface, en opposition aux MAs qui en expriment peu, les MIs sont des cellules présentatrices d'antigène dans les poumons. De plus, les MI peuvent avoir un phénotype pro-fibrosant, démontré dans un modèle de fibrose radio-induite chez la souris, leur déplétion diminuant les lésions pulmonaires (76). Cet aspect sera développé dans le chapitre 5 « radiobiologie et radiopathologie pulmonaires ».

Les macrophages interstitiels ont longtemps été négligés au profit des macrophages alvéolaires dans les recherches sur les macrophages pulmonaires. Cependant, ces récentes études montrent bien que la plasticité des macrophages interstitiels, leurs différentes origines ainsi que leur capacité activatrice du système immunitaire, en font des cibles thérapeutiques intéressantes à étudier dans de nombreuses pathologies.

4) Les macrophages recrutés

Les macrophages recrutés sont directement issus de la différenciation monocyttaire, ils ont donc une origine différente des macrophages résidents. En effet, les macrophages recrutés sont appelés sur le site inflammatoire grâce à des chemoattractants comme le CCL2, CCL7, CX3CL1 et CCL5 (77). Ces chimiokines sont principalement secrétées par les cellules immunitaires déjà présentes à la lésion inflammatoire comme les macrophages résidents, les neutrophiles ou les lymphocytes. Les monocytes possèdent à leur surface différents récepteurs qui leur permettent d'être sensibles à ces chimiokines. Le plus étudié est le récepteur CCR2. Ce récepteur a plusieurs ligands potentiels : le CCL2, CCL5, CCL8 et le CCL12. Le CCL2 est le ligand principal de CCR2. Une augmentation du taux de CCL2 est observée dans le sérum et les tissus dans de nombreux contextes infectieux différents (77). CCL2 se dimérise et s'associe aux glycosaminoglycanes présents sur les cellules endothéliales des vaisseaux créant ainsi un gradient de CCL2 qui guide les monocytes vers le site de la réaction inflammatoire (78). La déplétion chez des souris des gènes codant pour CCL2 et CCL7 induit une diminution de près de 50% du recrutement des monocytes lors d'une infection par *Listeria monocytogenes* (79). Les souris déficientes en CCR2 sont

largement utilisées dans la recherche sur l'impact du recrutement monocytaire dans différents contextes pathologiques. Cependant, l'axe de recrutement via CCR2 n'est pas le seul permettant la chimioattractation des monocytes dans les tissus. Les monocytes possèdent également les récepteurs CCR3 et CCR5. De nombreux ligands sont capables d'activer ces récepteurs, notamment CCL3 et CCL5. Des études *in vivo*, utilisant des souris déficientes en CCR1 ou CCR5, ont montré les rôles non redondants de ces récepteurs dans le recrutement des cellules immunitaires (77). Cependant, contrairement au récepteur CCR2, les récepteurs CCR1 et CCR5 ne sont pas spécifiques des monocytes et sont présents à la surface de nombreux types cellulaires. L'altération du recrutement des monocytes chez les souris déficientes en CCR1 ou CCR5 peut donc être due à un défaut de recrutement d'autres populations cellulaires, impliquées dans le recrutement via CCR2 des monocytes.

Une fois dans les tissus, les macrophages recrutés se différencient afin de ressembler d'un point de vue génique et fonctionnel aux macrophages résidents du tissu dans lequel ils se sont infiltrés. Ainsi dans les poumons, les macrophages recrutés deviennent des macrophages alvéolaires ou interstitiels (80). Ils peuvent donc être activés, au même titre que les macrophages résidents, et évoluer vers une orientation phénotypique pro ou anti-inflammatoire. C'est la théorie de la polarisation macrophagique.

5) Le paradigme de la polarisation des macrophages

Les macrophages sont des cellules possédant une certaine polarité en fonction de leur rôle dans la réaction inflammatoire et de leurs relations avec les lymphocytes présents sur le lieu de l'inflammation. Globalement, durant de nombreuses années, un paradigme s'est développé selon lequel les lymphocytes contrôleraient la réponse immunitaire adaptative selon le profil cytokinique qu'ils sécrètent. Les lymphocytes Th1, sécrétant principalement de l'interféron gamma, activeraient les macrophages en macrophages de type M1 ou classiquement activés, et les lymphocytes Th2, sécrétant les cytokines Il-4, Il-5 ou Il-10, activeraient les macrophages en macrophages de type M2, ou alternativement activés (Figure 7). Le terme de macrophages classiquement activés (ou M1) est utilisé pour la première fois afin de décrire l'action bactéricide des macrophages en réponse à l'infection par les bactéries BCG et *Listéria* (81). Cette activation macrophagique a ensuite été associée à la production d'interféron par les lymphocytes, stimulant l'activité antimicrobienne (82) et l'activité antitumorale des macrophages (83). Les macrophages stimulés par les cytokines issues des lymphocytes Th2 ont longtemps été décrits comme étant inactifs, mais la découverte de l'augmentation de l'expression du récepteur au mannose à leur surface après activation chez la souris fait naître le terme de « alternativement » activés (Figure 7) (84). En effet, le récepteur au mannose induit plus de phagocytose et une diminution des sécrétions de cytokines pro-inflammatoires. Par la suite, lors d'études sur le métabolisme de l'arginine par les macrophages, Mills décrit les macrophages M1, activés par les cytokines Th1 ou par le LPS, comme étant les macrophages capables de fabriquer de l'oxyde nitrique (NO) alors que les macrophages M2 fabriquent des polyamides trophiques (85).

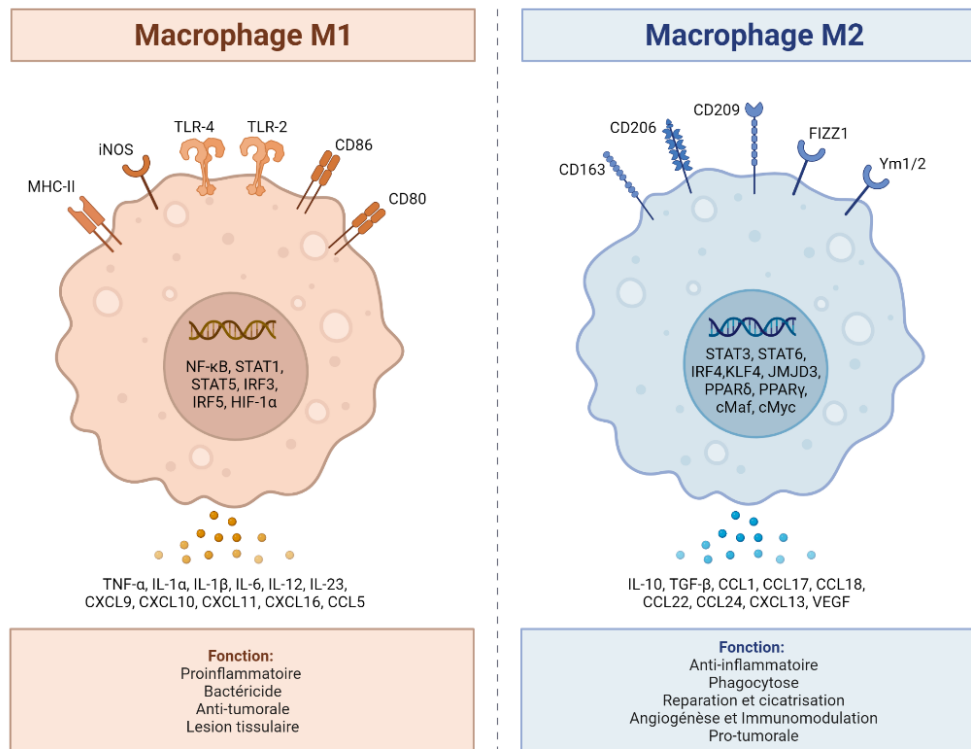


Figure 7 : Le paradigme de la polarisation des macrophages

Globalement, les macrophages M1 sont des macrophages pro-inflammatoires impliqués dans les premières étapes de la réaction inflammatoire, alors que les macrophages M2 sont plutôt des macrophages anti-inflammatoires impliqués dans les phénomènes de cicatrisation (Figure 7). Bien que cette classification ait été observée dans un premier temps *in vitro*, aujourd'hui de nombreuses études ont montré que la polarisation des macrophages s'observait également *in vivo* (86). Cependant, les réalités biologiques font qu'*in vivo*, on considère les types M1 et M2 comme des points extrêmes d'un continuum fonctionnel complexe. D'ailleurs, dans beaucoup de pathologies pulmonaires, on observe des macrophages avec des phénotypes de polarisation mixte, présentant des marqueurs de macrophages M1 et de macrophages M2 (87, 88). D'autre part, les macrophages M2 ne sont eux-mêmes pas une population homogène. On distingue les M2a, activés via Il-4/Il-13 et impliqués plus particulièrement dans les phénomènes allergiques ou de phagocytose de parasites ; les M2b, activés par les complexes immuns ou les antagonistes du récepteur IL-1R et impliqués dans l'immunorégulation ; les M2c, activés via Il-10 et impliqués dans le processus de cicatrisation (89) et les M2d, activés via le récepteur à l'adénosine et impliqués dans l'angiogenèse associée à la croissance tumorale (90).

Les macrophages M1, étant donné leur fonction bactéricide importante, possèdent un profil cytokinique assez spécifique. En effet, ils produisent des molécules inflammatoires telles que les interleukines $TNF\alpha$, $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-12$, $IL-18$ et $IL-23$; l'oxyde nitrique (NO) ; des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ; des espèces réactives azotées (RNS) ; ainsi que des chimiokines CXCL1, 2, 3, 5, 8, 9 et 10 et CCL2, 3, 4, 5, 11, 17, 22 et 24. D'autre part, ils expriment un fort taux de MHC II à leur surface ainsi que des molécules de co-stimulation comme CD40, CD80 ou CD86, impliquées dans leurs effets positifs sur l'immunité adaptative cytotoxique. Les macrophages classiquement activés se différencient des autres macrophages par leur métabolisme (Figure 8). En effet, une augmentation du flux de glucose dans la cellule induit la conversion rapide, sans passer par la mitochondrie, du pyruvate en lactate (Figure 8). En parallèle, la respiration mitochondriale est donc atténuée et génère ainsi un grand nombre de ROS. Cette orientation du métabolisme vient soutenir l'action bactéricide imputée aux macrophages M1 (Figure 8). D'autre part, l'accumulation de fer dans les macrophages les pousse vers un phénotype M1 et soutient leurs actions pro-inflammatoire via la libération de ROS(91). L'augmentation de la perméabilité vasculaire après irradiation induit une fuite d'hématies dans les tissus pulmonaires. Ce pourrait expliquer la présence de macrophages chargés en hémossidérine dans les poumons des patients et chez les souris, après irradiation pulmonaire (92, 93). Ces macrophages chargés en hémossidérine aurait donc un phénotype pro-inflammatoire M1.

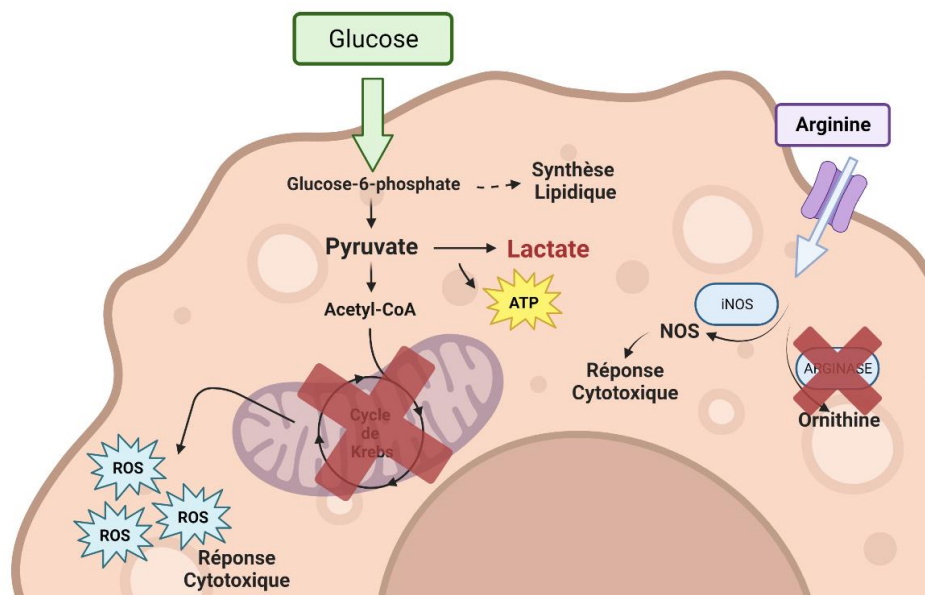


Figure 8 : Métabolisme des macrophages M1

L'influx de glucose important induit une conversion rapide du pyruvate en lactate, diminuant la présence de substrat nécessaire à la respiration mitochondriale. Le stress oxydatif généré induit donc la production de ROS par la mitochondrie. L'arginine est convertie en oxyde nitrique. Le glucose-6-phosphate est un précurseur de la voie de synthèse lipidique dans les macrophages. Ces modifications métaboliques induisent la réponse pro-inflammatoire des macrophages M1.

Les macrophages M2 sont eux aussi différenciés par leur profil cytokinique qui se caractérise par une faible production d'IL-12 et une production élevée d'IL-10 ainsi que de TGF- β . Sur le plan chimiokinique, ils secrètent CCL1, 3, 4, 8, 16 et 18. Ils présentent également à leur surface des récepteurs de chimioattractants comme le CCR2, qui vont permettre d'orchestrer le recrutement des éosinophiles, des basophiles et des lymphocytes T régulateurs. Sur le plan métabolique, les macrophages M2 utilisent de manière préférentielle le métabolisme des acides gras pour générer de l'énergie (figure 9). Les macrophages activés par l'IL-4 ont une absorption et une oxydation des acides gras augmentées, processus qui semble être absent chez les macrophages M1 (Figure 9) (94). En effet, le métabolisme lipidique est fortement impliqué dans la phagocytose, régulant notamment la fluidité de la membrane externe des cellules. Les macrophages M2 sont capables d'inhiber l'activité de iNOS tout en augmentant l'activité de l'arginase (Figure 9). Celle-ci permet d'orienter l'utilisation de l'arginine en faveur de la synthèse d'ornithine, et non de celle d'Oxyde Nitrique (NO). En effet, l'ornithine induit la production de collagènes et favorise la cicatrisation tissulaire. Globalement, tous les éléments de la réponse des macrophages M2 favorisent le nettoyage des débris cellulaires, l'angiogenèse et le processus de cicatrisation (95).

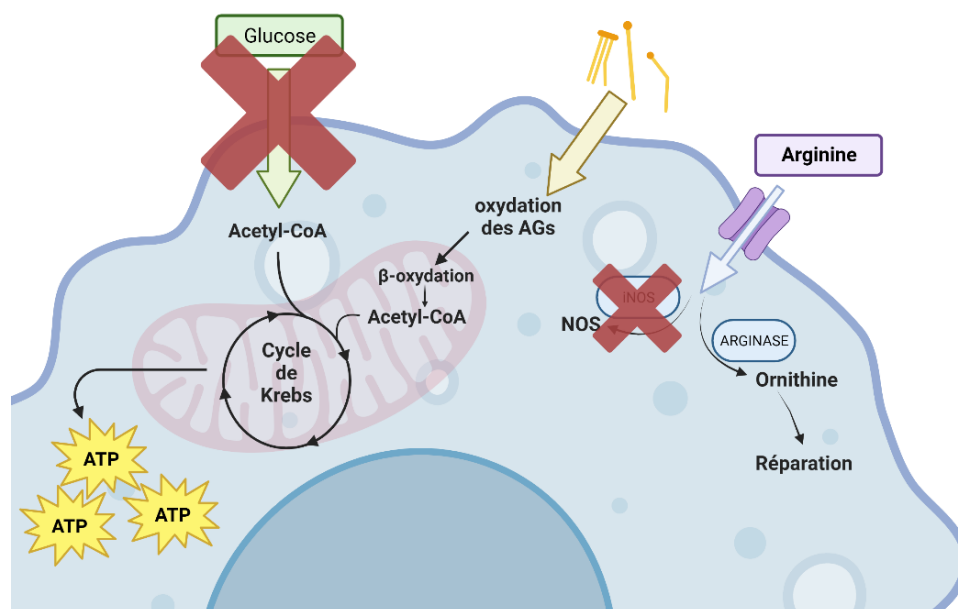


Figure 9: Métabolisme des macrophages M2

L'influx d'acides gras dans le cytoplasme permet leur β -oxydation dans la mitochondrie en Acétyl-CoA alimentant le cycle de Krebs et la respiration mitochondriale produisant beaucoup d'ATP nécessaire aux différentes fonctions des macrophages M2. L'arginine est convertie en ornithine, impliquée dans les fonctions de cicatrisation des macrophages M2.

La polarisation des macrophages a été longtemps un outil utile pour décrire les macrophages présents dans de nombreux contextes pathologiques. Dans des contextes d'infection virale ou bactérienne, les macrophages sont décrits comme étant polarisés vers un phénotype M1 (96). Dans l'asthme, il est observé une orientation de type M2 des macrophages alvéolaires des patients asthmatiques (97). Les macrophages associés aux tumeurs en progression (TAM pour *Tumor Associated Macrophages*) sont caractérisés comme étant également orientés vers une polarisation M2 (98, 99). Ces différents résultats ont permis de développer des stratégies thérapeutiques spécifiques autour de la polarisation macrophagique, comme la reprogrammation phénotypique afin de les orienter vers une voie de polarisation plus favorable à la résolution de la pathologie (100). Cependant, la présence de phénotypes mixtes, ou des preuves de polarisation contraire selon les études, mettent en évidence la trop grande simplification que représente le paradigme de la polarisation des macrophages. Par exemple, dans la BPCO, des macrophages possédant des phénotypes mixtes sont observés (87). Dans le cadre de la fibrose radio-induite, la polarisation des macrophages semble s'orienter vers un phénotype alternativement activé, impliquant les macrophages recrutés plutôt que les macrophages résidents (76). L'implication des macrophages dans ces différentes pathologies sera détaillée pour la plupart dans le chapitre suivant « Pathologies pulmonaires et macrophages ».

Chapitre 3 : Pathologies pulmonaires et macrophages

Les pathologies pulmonaires concernent toutes les atteintes du système respiratoire. Ces pathologies regroupent des maladies très différentes, autant en termes de génétique que de physiopathologie, allant de la mucoviscidose, en passant par les apnées du sommeil et les cancers (Figure 10). L'ensemble de ces pathologies sont responsables d'un mort sur 10 en Europe d'après l'*European Lung Society* (101).

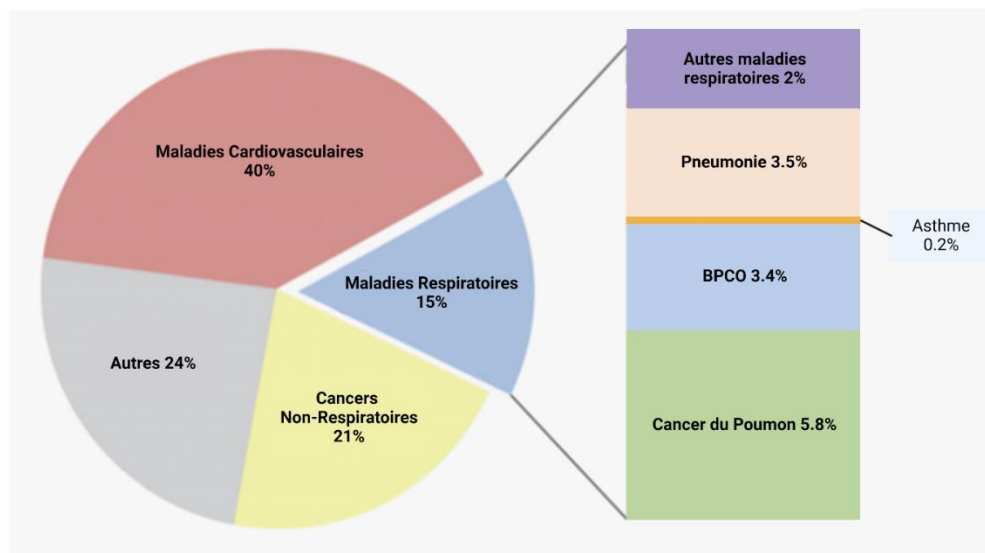


Figure 10 : Pourcentage des décès liés à une pathologie respiratoire

Données issues d'une sélection de pays européens pour lesquels toutes les données étaient accessibles. (Adapté de « The white book of the european lung society »).

L'OMS estime que, d'ici 2030, les principales pathologies pulmonaires (pneumonie, tuberculose, cancer du poumon et BPCO) seront la cause d'un décès sur 5 dans le monde. Le cancer du poumon et la BPCO occuperont une part de plus en plus importante de ces décès, avec une baisse de ceux dus aux infections pulmonaires et à la tuberculose (101). Les pathologies pulmonaires resteront une problématique importante de santé publique dans les sociétés européennes pour les prochaines années. La connaissance approfondie de ces maladies est donc nécessaire pour améliorer le traitement et améliorer la qualité de vie des patients. Dans ce chapitre, j'aborderai trois de ces pathologies pulmonaires : la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) et les cancers pulmonaires. Pour le cas de la BPCO et de la FPI, j'ai choisi de les détailler, car elles correspondent à des pathologies inflammatoires stériles. En effet, on observe un emballement du système immunitaire qui n'est pas causé par un agent infectieux comme une bactérie ou un virus. Les pneumopathies radicales montrent également une inflammation stérile avec, notamment, un influx de nombreuses cellules immunitaires comme les macrophages. Décrire ces pathologies me permettra d'aborder certains mécanismes

communs aux lésions radio-induites. Pour les cancers pulmonaires, j'ai choisi de les décrire ici afin de placer le contexte associé à l'utilisation de la radiothérapie stéréotaxique pulmonaire.

1) La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)

La BPCO est une pathologie inflammatoire chronique des bronches. Elle est grandement invalidante pour les patients, avec une limitation importante du débit d'air dans les poumons qui altère la fonction respiratoire et qui n'est pas complètement réversible. La prévalence de la BPCO s'élève à 250 millions de cas dans le monde. Le facteur de risque principal est environnemental et est le tabagisme. De manière plus générale, toute exposition à des particules toxiques, comme la pollution, peut être la cause de la BPCO. De plus, à ces facteurs de risque environnementaux, s'ajoutent des facteurs génétiques de prédisposition. Les symptômes cliniques types sont des toux persistantes, un essoufflement à l'effort, une augmentation de la fréquence respiratoire et une fatigue chronique. Bien que le GOLD (*The Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) ne conseille pas systématiquement la réalisation de scanner pulmonaire pour le diagnostic de la BPCO, celui-ci est un outil utile à la compréhension du stade de la pathologie. Sur ces scanners sont observables de l'emphysème, caractéristique de la BPCO, une dilatation permanente des alvéoles, qui peut être identifiée visuellement au scanner par des zones de faible atténuation, une distorsion et un amincissement des vaisseaux ainsi que la présence de tissu conjonctif autour des bronches, pouvant aller jusqu'à la fibrose (figure 11A). On peut observer également une dilatation des bronches (bronchiectasie) due à l'inflammation chronique (102).

D'un point de vue cellulaire, la BPCO se caractérise par une accumulation de mucus dans les bronches liée à une production excessive par les glandes bronchiques et une diminution de la capacité des cellules ciliées à empêcher cette accumulation. Une présence importante de ROS à la suite de l'exposition à des particules irritantes génère une inflammation chronique des voies aériennes supérieures. Cette inflammation cause la destruction de la structure des alvéoles qui induit une altération des échanges gazeux et une insuffisance respiratoire (103, 104). Au niveau histologique, on peut observer sur les coupes de poumon de patients atteints de BPCO la présence de mucus dans les alvéoles ainsi qu'un épaississement des septas alvéolaires (figure 11B). De plus, d'autres marqueurs de l'inflammation chronique sont observables comme une muscularisation anormale des voies aériennes distales avec une hypertrophie des cellules musculaires lisses ainsi qu'une invasion de différentes cellules immunitaires comme des macrophages ou des éosinophiles (figure 11C) (105, 106).

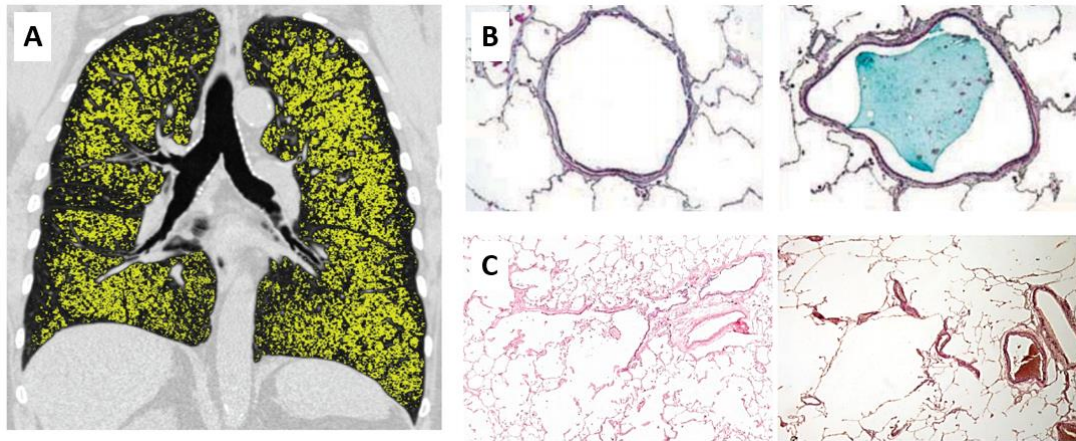


Figure 11 : Exemples d'image scanner et de figures histologiques du poumon observées chez les patients atteints de BPCO

A : Image de tomodensitométrie thoracique d'un patient BPCO montrant en jaune des zones de faible atténuation en dessous de -950 HU, signe d'emphysème (Hounsfield Units, unité de niveau de gris). B : Bouchon de mucus bronchiolique (grossissement x200). L'image de gauche correspond à une alvéole normale et l'image de droite à une alvéole remplie de mucus chez un patient BPCO. C : L'image de gauche montre une coloration hématoxyline-éosine au grossissement x 4,5 d'une bronchiole respiratoire de patient BPCO montrant la présence de macrophages. L'image de droite montre la muscularisation des artérioles, normalement peu musculaires, sur une image d'immunohistochimie d'actine (grossissement x20) dans les poumons d'un patient BPCO.

Le compartiment immunitaire joue un rôle important dans la pathogénèse de la BPCO et est très largement étudié. En effet, les cellules immunitaires inflammatoires induisent des modifications anatomiques du parenchyme pulmonaire en interagissant avec les cellules présentes, comme les cellules épithéliales ou musculaires lisses. Ce remodelage des voies respiratoires est central dans la physiopathologie de la BPCO. Le remodelage a été décrit dans les voies aériennes centrales, les voies aériennes distales et le parenchyme pulmonaire (107). Le remodelage du parenchyme conduit à l'emphysème pulmonaire, tandis que celui des petites voies aériennes entraîne, en grande partie, leur obstruction (108). L'inflammation chronique peut altérer la réponse aux antigènes du système immunitaire et ainsi favoriser les complications infectieuses chez les patients BPCO. On observe principalement une invasion de macrophages, de lymphocytes T et de neutrophiles, qui produisent en grande quantité des ROS et des cytokines pro-inflammatoires, et sont responsables de l'endommagement du parenchyme pulmonaire (107, 109). Les cytokines sécrétées par les lymphocytes sont capables d'activer les macrophages. Les macrophages sont le type de cellules immunitaires dominant dans la BPCO. On observe une augmentation du nombre de macrophages dans les alvéoles et dans le parenchyme pulmonaire (110). Les macrophages alvéolaires présents dans les lavages broncho-alvéolaires de fumeurs

atteints de BPCO présentent un phénotype M2-like. Ces observations ont été confirmées dans un modèle murin de BPCO induit par la fumée de cigarette (111). Enfin, des macrophages doublement polarisés ont été décrits chez les patients BPCO (112, 113). Comme décrit dans le chapitre précédent, la dichotomie M1/M2 apparaît encore une fois comme trop simpliste dans le cadre de la BPCO. D'ailleurs, il a été décrit une population macrophagique caractéristique de cette pathologie, se distinguant par une densité cellulaire particulière et par une insensibilité aux glucocorticoïdes (114). Dans cette étude, des macrophages isolés à partir de patients BPCO, ainsi que de personnes fumeuses et non-fumeuses, ont été séparés grâce à gradient de densité, puis leurs sécrétions analysées et leurs marqueurs de surface identifiés afin de les caractériser. L'utilisation des marqueurs de macrophages M2 n'ont pas permis aux auteurs de distinguer les populations de macrophages des patients BPCO des macrophages issus des personnes non fumeuses ou fumeuses mais n'ayant pas développé de BPCO. Les auteurs ont néanmoins mis en évidence une population macrophagique spécifique chez les patients BPCO, insensible aux glucocorticoïdes et ne répondant pas à la classification phénotypique généralement utilisée pour les macrophages. Cette insensibilité aux glucocorticoïdes pourrait expliquer leur inefficacité dans le traitement de la BPCO. Les auteurs concluent de manière intéressante que cibler cette population macrophagique bien particulière pourrait permettre d'assurer une action thérapeutique contre la BPCO tout en préservant les autres populations macrophagiques, bénéfiques pour la défense de l'organisme contre les pathogènes.

L'implication des macrophages dans la BPCO se caractérise par une augmentation de leur nombre dans les voies aériennes mais paradoxalement, leurs capacités fonctionnelles, qui regroupent la phagocytose et l'efférocytose, sont défectueuses (115). En effet, plusieurs études ont démontré une déficience des macrophages pulmonaires à phagocyter des champignons, des bactéries ou des particules associées à la pollution atmosphérique (116). De plus, les macrophages dérivés des monocytes sanguins de patients atteints de BPCO montrent également une activité phagocytaire réduite contre *H. influenzae* et *S. pneumoniae*, ce qui suggère la présence du défaut de phagocytose avant même le recrutement dans les tissus (117). L'augmentation du nombre de macrophages présents dans les poumons observée dans le cadre de la BPCO résulte du recrutement monocyttaire via CCL2. D'ailleurs, le taux de CCL2 est élevé dans les lavages broncho-alvéolaires de patients BPCO comparés à des individus non-fumeurs et à des fumeurs sans BPCO (118). Pour ce qui est de l'efférocytose, il a été montré que l'administration de galactin-3 exogène *in vitro*, une lectine de type S, connue pour réguler le phénotype des macrophages ainsi que leurs fonctions, rétablissait l'efférocytose chez des macrophages issus de patients BPCO (119). L'efférocytose défectueuse présente dans la pathogenèse de la BPCO,

permet de libérer les produits cytotoxiques des cellules mortes, et entraîne la progression de la pathologie. D'autre part, les macrophages sont capables de réaliser de l'autophagie, soit pour récupérer de l'énergie en conditions stressantes, soit dans le cadre de leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes (120). L'exposition à la fumée de cigarette de souris déficientes pour l'autophagie dans les poumons a d'ailleurs montré une amélioration de l'inflammation présente dans la BPCO (121). Une des caractéristiques importantes de la pathogénèse de la BPCO est la production importante de ROS dans les poumons en réaction à la fumée de cigarette. Cela a des impacts sur le métabolisme des macrophages. Par rapport aux témoins, les macrophages alvéolaires de patients BPCO montrent une production accrue de ROS issus des mitochondries qui induit une altération de la clairance bactérienne (122). Il a été montré une séquestration du fer augmentée par les macrophages alvéolaires de patients BPCO, qui soutiendrait donc la production de ROS, comme démontré dans certaines pathologies neuro-dégénératives ou certains cancers (123). D'autre part, l'expression des gènes liés au métabolisme du glutathion, au métabolisme du pyruvate, du cycle de Krebs et à la respiration mitochondriale est altérée chez les macrophages des fumeurs et des patients atteints de BPCO, par rapport aux témoins sains non-fumeurs (124). Globalement, les métabolismes impactés semblent être ceux impliquant la mitochondrie, qui pourrait être une bonne cible thérapeutique pour la résolution de la BPCO.

D'autres cellules du système immunitaire sont décrites comme impliquées dans la BPCO. On observe notamment la présence de neutrophiles dans les expectorations ainsi que de la neutrophilie sanguine, caractéristique de la BPCO sévère (125, 126). Les neutrophiles sécrètent des serines protéases, de l'élastase, de la myéloperoxydase ainsi que des métalloprotéinase (107). Toutes ces enzymes contribuent à la destruction alvéolaire et à la désorganisation du parenchyme pulmonaire observées dans la BPCO. Les mastocytes, souvent étudiés dans le cas de l'asthme, existent en deux sous-types, les mastocytes muqueux et les mastocytes séreux (127). Ce sont des cellules capables de libérer des médiateurs lipidiques et des agents broncho-constricteurs (128). Il a été observé une augmentation du nombre de mastocytes chez des fumeurs atteints d'emphysème centro-lobulaire. Il y a également une modification de la balance entre les mastocytes muqueux et séreux, avec une augmentation des mastocytes séreux chez ces fumeurs, qui serait corrélée à une diminution des fonctions respiratoires (129). D'autre part, l'IL-17, décrite comme étant up-régulée chez les patients BPCO, stimule la sécrétion de médiateurs pro-angiogéniques tels que VEGF par les mastocytes, qui pourraient ainsi participer au remodelage vasculaire pulmonaire (130). La source principale d'IL-17 sont les lymphocytes Th17. L'IL-17 stimule la contraction des cellules musculaires ainsi que leur prolifération. L'IL-17 pourrait jouer un rôle important dans la mise en place du remodelage du parenchyme pulmonaire. En effet, les souris

déficientes en Il-17 sont protégées de ce remodelage pulmonaire dans un modèle d'asthme (131). Dans la BPCO, il est observé également une infiltration de lymphocytes T-helper Th17, de lymphocytes B et T, au détriment des lymphocytes T-reg (132). Il y a une augmentation plus importante des lymphocytes T CD8+ en comparaison aux CD4+ (133). Cette augmentation des CD8+ a été montrée dans les voies aériennes périphériques des fumeurs atteints de BPCO. De plus, les cellules CD8+ sont capables de générer une destruction alvéolaire, mener à l'obstruction des voies aériennes, directement ou indirectement, en activant les macrophages. De ce fait, les cellules CD8+ pourraient être le lien entre le tabagisme et la BPCO (134). Les lymphocytes peuvent être différenciés en deux sous-types, TC1 et TC2, en fonction des cytokines qu'ils sécrètent. L'analyse des lavages broncho-alvéolaires de patients BPCO a montré une orientation TC2 des lymphocytes, avec des sécrétions principalement d'Il-4 et Il-5, qui favoriseraient l'emphysème pulmonaire (135).

En plus du compartiment immunitaire, d'autres types cellulaires présents dans les poumons sont impactés et ont été décrits comme pouvant jouer un rôle dans le développement de la BPCO. L'épithélium, par exemple, joue un rôle central. En effet, l'accumulation de mucus caractéristique de la BPCO est liée à la sécrétion de facteurs de croissance entraînant l'hyperplasie de nombreuses cellules de l'épithélium respiratoire, comme celles des glandes sous muqueuses, les cellules en gobelet ou les cellules basales. De ce fait, l'épithélium cuboïdal des bronchioles est remplacé par un épithélium pavimenteux, modifiant les interactions épithélium/mésenchyme et favorisant ainsi l'activation fibroblastique et le remodelage des parois alvéolaires et de l'épithélium pulmonaire, responsable de la détérioration des capacités respiratoires (136).

Le compartiment endothélial est également impacté dans la pathogénèse de la BPCO. Il a été montré une dysfonction du compartiment endothélial, par rapport à des sujets témoins, dysfonction proportionnelle au niveau d'obstruction des bronches observé chez les patients (137). En effet, il est observé notamment une apoptose des cellules endothéliales qui entraîne des fuites vasculaires, diminuant l'apport en oxygène dans les poumons et renforçant l'aspect emphysémateux des poumons BPCO (138). De plus, la fumée de cigarette exacerbe les lésions pulmonaires aiguës *in vivo* chez la souris et augmente la perméabilité endothéliale *in vitro* (139). Globalement le dysfonctionnement vasculaire (apoptose, transition endothélio-mésenchymateuse, hypoxie) favorise la muscularisation caractéristique des bronches distales dans la BPCO par hyperplasie des cellules musculaires lisses bronchiques (140). De plus, dans le tableau pathologique global de la BPCO, les muscles respiratoires sont soumis à une augmentation de la pression mécanique ventilatoire due notamment à la limitation du débit d'air, à l'augmentation de la compliance et à l'emphysème pulmonaires (141).

L'emphysème pulmonaire modifie également la géométrie des poumons en raccourcissant notamment le diaphragme. De plus, les muscles périphériques peuvent être particulièrement touchés par ces changements. En effet, la déficience des muscles périphériques est présente dans un tiers des cas de BPCO (142).

Les mécanismes cellulaires décrits dans la BPCO possèdent des similitudes avec ceux observés dans la fibrose radique. On peut donc observer après irradiation des processus similaires à ceux décrits dans l'inflammation chronique observée dans le cadre de la BPCO. Ces mécanismes seront détaillés dans le chapitre 5 « Radiobiologie et radiopathologie pulmonaires ».

2) La Fibrose idiopathique pulmonaire

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est la plus commune des pneumopathies interstitielles diffuses idiopathiques. La médiane de survie est de 2 à 5 ans avec une moyenne d'âge au diagnostic de 65 ans. La fibrose idiopathique pulmonaire reste une maladie rare avec une prévalence faible de 8,2 pour 100 000 habitants. Il n'existe pas de traitement curatif hormis la transplantation pulmonaire. Elle se caractérise par une fibrose progressive et irréversible du parenchyme pulmonaire. Les symptômes sont de la toux avec des expectorations de mucus, des douleurs thoraciques, une perte de poids et de la fatigue. D'un point de vue cellulaire, il y a une dégradation de la matrice extracellulaire qui libère des enzymes et alimente la réaction inflammatoire chronique. On observe également un infiltrat de macrophages et de lymphocytes T qui sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines stimulent notamment la prolifération et l'activation des fibroblastes qui produisent en quantité excessive du collagène, contribuant à la mise en place de la fibrose. Celle-ci conduit à une désorganisation du parenchyme pulmonaire et finit par impacter également le compartiment épithélial. Ces différents mécanismes cellulaires conduisent à l'insuffisance respiratoire des patients atteints de FPI. Afin de valider le diagnostic, des scanners de haute résolution sont réalisés systématiquement sur les patients suspectés. En effet, on peut observer des modifications typiques de la FPI grâce à l'imagerie scanner comme des structures en rayons de miel ou en verre dépoli, ainsi que des zones de fibrose très opaque (figure 12) (143).

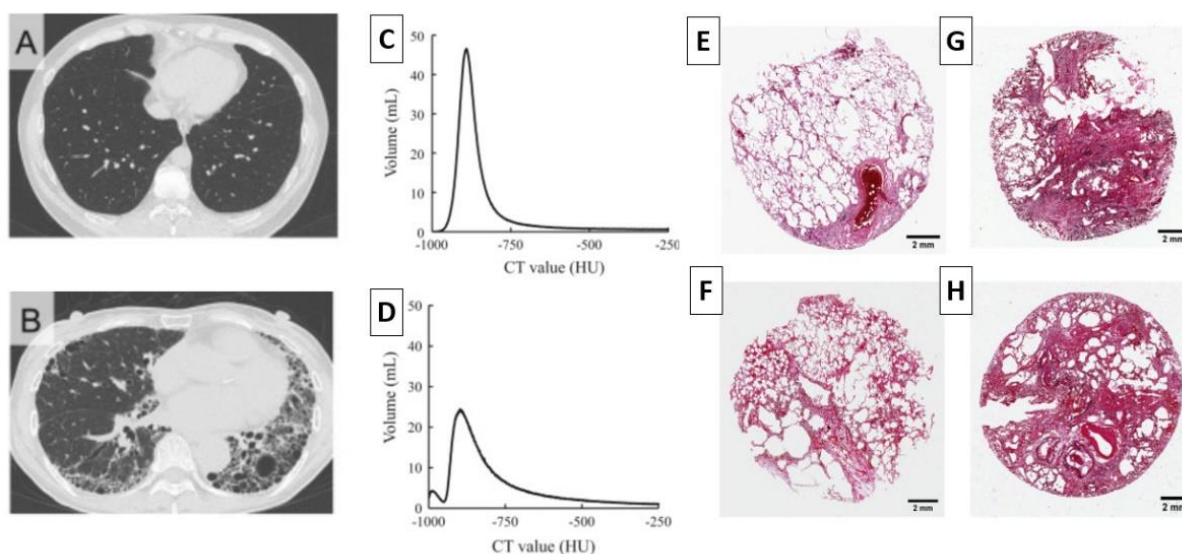


Figure 12: Image Scanner et histologie caractéristiques des poumons de patients atteints de fibrose idiopathique pulmonaire (144, 145)

A : Image scanner en coupe axiale de poumons sains. Le graphique C correspond à la répartition du volume sur l'échelle de densité en Unités Hounsfield (HU). B : Image scanner en coupe axiale d'un poumon de patient atteint de fibrose idiopathique pulmonaire, le graphique D correspondant à la répartition du volume en fonction des valeurs de HU. On observe une augmentation des valeurs HU chez le patient atteint de fibrose idiopathique pulmonaire par rapport au poumon sain. Les images E, F, G et H sont des exemples de score pathologique sur coupes de tissu après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine. E : Fibrose parcellaire modérée sans formation d'emphysème ou de rayon de miel. F : Fibrose parcellaire sévère sans formation d'emphysème ou de rayon de miel. G : Fibrose modérée avec formation d'emphysème mais sans rayon de miel. H : Fibrose parcellaire sévère et kyste en rayon de miel sans emphysème.

La FPI est une pathologie mixte associant des facteurs environnementaux et génétiques. De grandes études d'association pangénomique (GWAS) s'intéressant à des formes familiales de FPI ont mis en évidence différents polymorphismes génétiques associés à la FPI. Les gènes principalement décrits sont ceux des protéines du surfactant (protéine C du surfactant, SFTPC ; protéine A2 du surfactant, SFTPA2 ; et membre A3 de la cassette de liaison à l'ATP, ABCA3) et les gènes des télomérases (transcriptase inverse de la télomérase, TERT ; composant ARN de la télomérase, TERC ; et régulateur de l'hélicase 1 d'élongation des télomères, RTEL1) et celui de la mucine 5 (MUC5B).

Les patients atteints de FPI présentent, dans leur lavage broncho-alvéolaire, une concentration réduite de protéine A du surfactant. Des variants des deux gènes de la Sft-PA ont été décrits dans de nombreux cas de FPI. Les souris déficientes en Sft-PA montrent une diminution importante de la clairance mucociliaire, des macrophages altérés dans leur fonction phagocytaire et une augmentation de la production de

cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 ou le TNF, associée à une activation des fibroblastes. Le traitement de souris par du Sft-PA exogène montre une réduction de l'expression des cytokines Th2 telles que l'IL-4. Les cytokines Th sont connues pour être impliquées dans le développement de la fibrose. Ces observations suggèrent que l'absence de Sft-PA dans la FPI pourrait contribuer à la mise en place d'un environnement pro-inflammatoire dans l'alvéole. D'autre part, des mutations sur des gènes codant pour d'autres protéines du surfactant, SFTPC et ABCA3, ont été décrites comme impliquées dans la fibrose idiopathique pulmonaire. La mutation du gène SFTPC implique un défaut de repliement de la protéine et est retrouvée dans 25% des cas de FPI. La mutation de ABCA3 est plutôt représentée dans les formes pédiatriques de FPI (144).

L'altération de la clairance mucociliaire observée dans la FPI est liée au polymorphisme de MUC5B. En effet, la mucine 5B est sécrétée par les cellules à mucus qui participent à cette clairance mucociliaire. Elle aide à l'élimination des pathogènes et des agents irritants présents dans les bronches. Le knock-out total de MUC5B chez la souris entraîne des infections pulmonaires chroniques et des modifications importantes chez les macrophages alvéolaires résidents, comme des problèmes dans la mise en place de la phagocytose ou une augmentation de l'apoptose (145). D'autre part, la surexpression génique de MUC5B dans les voies aériennes de souris diminue la clairance mucociliaire et augmente la sévérité de la lésion fibreuse, après instillation intra-trachéale de bléomycine (146). On sait que le variant de MUC5B (rs35705950) impliqué dans la FPI, entraîne son accumulation dans les voies aériennes. Cette accumulation pourrait empêcher la clairance mucociliaire de s'effectuer correctement et générer une exposition chronique à des agents irritants comme la fumée de cigarette ou les poussières (144). Les facteurs non génétiques déclenchant le processus de la FPI chez les individus génétiquement prédisposés restent malheureusement mal compris.

En plus de la génétique, les facteurs environnementaux semblent moduler énormément l'apparition de la FPI. L'un des principaux facteurs de risque, comme pour la plupart des pathologies pulmonaires, est la fumée de cigarette. La fumée est un agent irritant qui crée une inflammation chronique locale et détruit l'organisation des alvéoles pulmonaires. On observe notamment une augmentation de la cellularité des alvéoles avec une accumulation de macrophages. De nombreuses études cliniques ont démontré le lien entre le développement de la FPI et le tabagisme. D'autres particules irritantes peuvent contribuer au développement de la FPI comme les poussières de bois, de métal ou les poussières chimiques. D'après de nombreuses études, l'impact de ces particules est lié au temps d'exposition des individus. En effet, la FPI semble se développer particulièrement dans les professions les plus exposées à des particules irritantes ou aux produits ménagers. Cependant, un nombre significatif de patients ne

font pas partie de catégories socioprofessionnelles exposées à ces particules et certaines recherches semblent contredire le lien direct entre exposition aux poussières métalliques et FPI par exemple. Un autre facteur de risque environnemental sont les infections virales pulmonaires. Plusieurs études montrent que le virus Epstein-Barr, par exemple, est présent chez 40% à 60% des patients FPI, contre 0 à 4% chez les patients contrôles. De nombreux virus sont étudiés dans le cadre de la FPI, d'ailleurs il a été montré dans des modèles précliniques, que les traitements antiviraux pourraient permettre de limiter les exacerbations de la FPI (147).

Comme pour la BPCO, les macrophages font partie des acteurs clés de la FPI et sont étudiés dans le but de déterminer s'ils peuvent représenter une cible thérapeutique intéressante. Le rôle pro-fibrosant des macrophages a été démontré aussi bien chez l'humain que chez la souris (148). La FPI est souvent décrite comme une pathologie d'origine inflammatoire, évoluant avec le temps vers un processus fibreux. Cette cinétique se reflète également sur la polarisation des macrophages présents dans la FPI. En effet, au premier stade aigu de la FPI, le phénotype M1 des macrophages est favorisé avec une expression élevée de iNOS et la production de cytokines pro-inflammatoires afin de maximiser l'effet cytotoxique. Mais, globalement, il est plutôt accepté que la FPI se caractérise par un phénotype M2 des macrophages (149). Les macrophages M2 sont des acteurs majeurs de l'activation des fibroblastes et donc de la fibrogenèse. En effet, il a été montré que les macrophages présents à proximité des foyers fibreux, observables sur des biopsies de patients FPI, sécrètent du CCL18, stimulant ainsi la production de collagènes par les fibroblastes. Les macrophages M2 se lient au collagène de type I via des β 2-intégrines et des récepteurs de phagocytose, augmentant ainsi encore leur production de CCL18, ce qui crée un cercle vicieux d'activation continue des macrophages M2 et de production excessive de collagène par les fibroblastes pulmonaires (150). Il a été montré également que la surexpression prolongée d'IL-10 chez la souris entraîne le développement d'une fibrose pulmonaire impliquant le recrutement de fibrocytes, et probablement de macrophages de type M2, par l'intermédiaire de l'axe CCL2/CCR2 (151). Cette activation va ensuite entraîner un dépôt excessif de matrice extracellulaire générant une déformation du parenchyme pulmonaire, aboutissant à la fibrose et à l'insuffisance respiratoire qui en résulte. Outre les cytokines Th2 qui peuvent induire la polarisation M2 des macrophages, des cellules immunitaires, comme les lymphocytes, peuvent avoir le même effet, ou encore d'autres cellules comme les cellules stromales mésenchymateuses (152, 153). Inversement, d'autres types cellulaires sont capables d'atténuer la polarisation M2 des macrophages. C'est le cas des cellules Natural killer (NK) qui ont montré un effet protecteur sur la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris (154). D'autre part, il a été constaté que l'accumulation extracellulaire d'adénosine et l'activation de son récepteur ADORA2B, sécrété en

réponse au stress cellulaire, polarisent les macrophages vers un phénotype fibrosant. En effet, les souris invalidées pour ADORA2B spécifiquement dans les cellules myéloïdes présentent une diminution des marqueurs de l'activation M2 des macrophages, et sont protégées contre la fibrose induite par la bléomycine (155). D'ailleurs, il a été montré que les conditions hypoxiques, connues dans le contexte de la FPI, augmentent via HIF-1 α l'expression de ADORA2B, induisant une polarisation M2 des macrophages, à la fois sur tissus de patients FPI et dans un modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris (156). Toutes ces informations vont dans le sens de la polarisation M2 des macrophages présents dans le contexte de la FPI.

Malgré un nombre important de travaux réalisés et publiés sur la polarisation M1/M2 des macrophages, il est toujours très difficile d'associer un contexte pathologique avec une polarisation macrophagique bien définie, ceci en raison des multiples phénotypes que peuvent acquérir les macrophages. Aujourd'hui, les techniques de séquençage des ARN totaux sur cellule unique permettent de mettre en évidence des sous-populations macrophagiques spécifiques, tout en se libérant du paradigme de leur polarisation. Grâce à cela, une diminution du nombre d'un type de macrophages alvéolaires, les macrophages FABP4⁺, a été observée chez les patients FPI. Cette diminution de FABP4 est corrélée à une augmentation des acides gras circulants et son expression dans les macrophages est associée à une réponse pro-inflammatoire (157). D'ailleurs, des macrophages hybrides, alvéolaires/interstitiels, issus de la circulation, ont également été décrits dans les tissus de patients FPI. Ces macrophages pourraient activer les fibroblastes, interagir avec le compartiment endothélial et constituer ainsi une niche pro-fibrosante importante (157). D'autre part, une augmentation du nombre de macrophages SPP1⁺/MertK⁺ proliférants a été observée chez les patients atteints de FPI. De plus, la déplétion de SPP1 (*Secreted Phosphoprotein 1* ou ostéopontine) diminue la fibrose pulmonaire chez des souris instillées avec de la bléomycine. Les macrophages SPP1⁺ seraient une population pro-fibrosante et auraient un métabolisme impliquant principalement les lipides (158). En effet, l'uniporteur de calcium mitochondrial (MCU) est augmenté dans les macrophages alvéolaires dans la FPI et régule leur reprogrammation métabolique vers la β -oxydation des acides gras. Ce MCU régule également l'expression du transporteur d'acides gras CPT-1, augmentée dans les macrophages alvéolaires de patients FPI et chez des souris instillées à la bléomycine. D'ailleurs, les souris dont le MCU est déplété spécifiquement dans les macrophages alvéolaires sont protégées de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (159). D'autres modifications de métabolisme sont observées chez les macrophages associés à la FPI. Dans des modèles murins de fibrose pulmonaire, il est observé une augmentation de consommation de glucose et de la glycolyse via une augmentation de l'expression de GLUT1 (160, 161). L'activation

des macrophages peut entraîner la production de métabolites endogènes possédant un pouvoir immunomodulateur important comme le succinate ou l'itaconate. Ce dernier a été identifié comme un anti-fibrosant chez l'Homme et chez la souris (162). D'une part, sont constatés des niveaux réduits d'itaconate dans les voies respiratoires des patients atteints de FPI par rapport à des poumons sains et d'autre part, chez la souris, l'itaconate exogène limite l'activité des fibroblastes (162). La reprogrammation métabolique des macrophages semble être une piste intéressante dans le traitement de la FPI.

Dans ce paragraphe, j'ai décrit la FPI comme une maladie inflammatoire dans un premier temps puis, sans résolution, évoluant vers une inflammation chronique aboutissant à une pathologie fibreuse du poumon. Cela m'a permis de placer les macrophages au centre de la pathogénèse de la FPI. D'ailleurs, le modèle de fibrose pulmonaire induite par instillation intra-trachéale de bléomycine reproduit ce schéma. Cependant, Selman *et al.* ont proposé une autre hypothèse concernant la mise en place de la FPI. En effet, ils considèrent que la FPI, contrairement aux autres pathologies interstitielles pulmonaires, serait la conséquence d'une désorganisation épithélio-fibroblastique, qui induirait une fibrose dite « primaire » sans inflammation précoce (163). En effet, en plus de ne pas répondre aux traitements anti-inflammatoires, les patients FPI présentent des microlésions de l'épithélium alvéolaire et des foyers fibroblastiques qui entraîneraient la désorganisation du parenchyme pulmonaire (164). Des explants de poumon de souris en culture, après une blessure hyperoxique induisant des dommages alvéolaires, ont montré une diminution de la prolifération des cellules épithéliales en même temps qu'une augmentation de la prolifération des fibroblastes. De concert, il est observé une augmentation du dépôt de collagène. Ces observations, sans la présence de nombreux macrophages, suggèrent que l'inflammation n'est pas nécessaire pour induire de la fibrose, et que les lésions épithéliales et la perturbation des interactions épithélio-fibroblastiques sont suffisantes (163). Ces interactions sont aujourd'hui de plus en plus étudiées dans le cadre de la FPI et mettent en avant la matrice extracellulaire comme cible thérapeutique intéressante (165). Toutefois, les macrophages sont également impliqués autant dans la production de la matrice extracellulaire que dans sa dégradation. Les interactions des fibroblastes avec d'une part le compartiment épithélial, et d'autre part le compartiment macrophagique, semblent être la clé des futures pistes thérapeutiques afin de traiter la FPI.

3) Les cancers broncho-pulmonaires

Le cancer est une pathologie qui est la conséquence de la prolifération excessive et non régulée de cellules ayant, la plupart du temps, subi une modification quantitative ou qualitative de leur génome. La somme de ces cellules forme une tumeur maligne. Dans son document intitulé « le panorama des cancers en France, édition 2022 » (166), l'Institut National du Cancer estime à 382 000 nouveaux cas de cancer en 2018 en France métropolitaine. Le nombre de décès est estimé, lui, à 157 400. Parmi les cancers, les cancers broncho-pulmonaires sont les 2^e plus fréquents chez l'homme, avec 31 231 cas en 2018, et les 3^e plus fréquents chez la femme, avec 15 132 cas en 2018. L'analyse des tendances entre 1990 et 2018 montre un taux d'incidence stable chez l'homme, alors que chez la femme on observe une forte progression du taux d'incidence sur la période. En effet, chez les femmes, l'incidence des cancers broncho-pulmonaires a été en constante progression avec +5.3% par an en moyenne entre 1990 et 2018. Lors du 26^e congrès de pneumologie de langue française tenu en janvier 2023, le rapport KBP-2020 regroupe l'étude de 8999 patients atteints d'un cancer broncho-pulmonaire diagnostiqué et pris en charge dans un centre hospitalier. Ce rapport montre que pour le cancer du poumon, il y a maintenant jusqu'à 41% des patients qui sont des femmes de moins de 50 ans, en opposition à 16% en 2000. Les cancers broncho-pulmonaires font partie des cancers les plus meurtriers. En effet, ils sont la première cause de mort par cancer chez les hommes, avec 22 761 décès en 2018, et la deuxième chez les femmes, avec 10 356 décès en 2018. L'âge médian au diagnostic est de 65 ans chez les hommes et de 67 ans chez les femmes. La survie nette à 5 ans est de 17%, entre 2005 et 2010. Les symptômes des cancers broncho-pulmonaires sont des toux persistantes, des douleurs thoraciques, une perte de poids rapide et importante, ainsi que de la fatigue chronique et, parfois, des saignements bronchiques. Cette pathologie a de nombreux facteurs de risque environnementaux, dont le principal est le tabagisme. La pollution de l'air, l'exposition à des substances chimiques irritantes ou au radon sont aussi des éléments déclencheurs. Certaines expositions professionnelles sont également à risque comme l'exposition à la silice, au nickel, à l'arsenic, au béryllium et aux benzopyrènes. La validation du diagnostic est faite par l'imagerie thoracique et un examen anatomopathologique en coloration standard (Hématoxyline-Eosine-Safran) de la tumeur et/ou des sites métastatiques. La stratégie thérapeutique dépendra du type histologique de la tumeur et du stade d'avancement de la maladie.

Les cancers broncho-pulmonaires se séparent en deux catégories : les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBNPC), 85% des cas, et les cancers broncho-pulmonaires à petites cellules (CBPC), 15% des cas. Le CBPC est un carcinome neuroendocrinien, rare et agressif, il est de mauvais pronostic. Il se caractérise par des cellules de petite taille, qui prolifèrent rapidement et qui métastasent facilement. Leur aspect caractéristique est aisément reconnaissable au microscope. Les CBNPC se subdivisent en trois sous-catégories principales qui se différencient sur le plan histologique : l'adénocarcinome, le carcinome malpighien ou épidermoïde et le carcinome à grandes cellules. L'adénocarcinome se développe à partir des glandes de la muqueuse des petites bronches et bronchioles. Il correspond à 50% des CBNPC et est plus fréquent chez les non-fumeurs. Le carcinome épidermoïde se développe habituellement dans les grosses bronches situées dans les parties centrales des poumons et représente 30% des CBNPC. À l'origine histologique de ce sous-type de CBNPC, il y a une métaplasie malpighienne, c'est-à-dire une transition de l'épithélium bronchique pulmonaire vers un épithélium pavimenteux stratifié, kératinisé ou non. Les cellules des carcinomes malpighiens sont positives au P63 et aux cytokératines 5-6, ce qui permet leur identification histologique. D'ailleurs, les CBNPC positifs pour les mucines mais négatifs pour ces marqueurs sont classés dans les adénocarcinomes. Les carcinomes à grandes cellules sont établis en absence totale de différenciation épidermoïde ou glandulaire et se caractérisent par la présence d'îlots de cellules non différenciées. Ils représentent 15% des CBNPC et se développent potentiellement dans toutes les zones du poumon. Le pronostic associé à ce type de CBNPC est mauvais, car sa croissance est très rapide. En plus de ces trois principaux types de CBNPC, il en existe d'autres, plus rares : les tumeurs carcinoïdes, les carcinomes adénosquameux ou les carcinomes sarcomatoïdes. Le traitement du CBNPC est choisi par les médecins en fonction du stade de la tumeur et de l'état clinique du patient. Pour les stades I et II le traitement classiquement utilisé est la chirurgie avec lobectomie totale ou partielle. Pour les stades plus avancés, les traitements sont généralement des associations de radiothérapie et chimiothérapie. Pour les cancers métastatiques de stade IV, la chimiothérapie est le traitement de référence. Cependant, pour 40% des patients inopérables atteints de CBNPC de stade I, la radiothérapie en conditions stéréotaxiques est recommandée. Le détail de la prise en charge par radiothérapie stéréotaxique sera décrit dans le chapitre suivant « Prise en charge des tumeurs non à petites cellules par irradiation en conditions stéréotaxiques ».

D'un point de vue cellulaire dans les CBNPC, on trouve des anomalies de la croissance cellulaire et de l'apoptose, ainsi que des modifications importantes au niveau du système immunitaire. En effet, les cellules immunitaires sont des armes utiles contre les cellules cancéreuses. Cependant, des altérations du compartiment immunitaire peuvent entretenir la croissance tumorale au lieu de la freiner. C'est le cas des macrophages spécifiques des tumeurs, les *tumor associated macrophages* (TAM). Ils ont été décrits dans différents types de tumeurs et sont modifiés par

l'environnement tumoral. Dans les CBNPC, les TAM sont la composante cellulaire dominante. Leur présence abondante avantage l'environnement tumoral, en permettant la stratégie d'échappement immunitaire des cellules tumorales. En effet, les TAM vont être capables d'inhiber la fonction cytotoxique des lymphocytes T permettant ainsi aux cellules tumorales d'échapper aux cellules immunitaires. Cet échappement immunitaire laisse l'opportunité aux cellules tumorales d'acquérir plus de mutations, leur conférant un avantage de survie (167). Ainsi, les TAM favorisent la survie et la croissance tumorales (168).

Les TAM ont longtemps été considérés comme étant exclusivement issus de la circulation et de la différenciation monocyttaire (169). D'ailleurs, les cellules tumorales de CBNPC sécrètent du CCL2 afin d'induire leur recrutement (Figure 13). L'utilisation d'un antagoniste de CCR2 a permis de diminuer la progression de la tumeur dans un modèle de CBNPC par injection sous-cutanée de cellules LLC2 chez la souris (170). Afin d'étudier le développement des tumeurs ainsi que l'origine des TAM, des chercheurs ont utilisé des souris modifiées génétiquement qui développent des adénocarcinomes pulmonaires à partir des cellules pulmonaires grâce à l'activation de Kras et l'inactivation de p53. Ils ont prouvé que les TAM étaient en partie alimentés par les monocytes de la rate. Lorsqu'ils inhibent CCR2 dans les monocytes spléniques, la croissance tumorale est diminuée ainsi que l'infiltration des TAM (171). En parallèle, des preuves du maintien par prolifération *in situ* dans des modèles murins de tumeurs cérébrales et du pancréas ont permis de proposer une origine des TAM mixte, provenant à la fois de la différenciation monocyttaire et de la prolifération des macrophages résidants dans les tissus (172, 173). En effet, à l'aide de modèles transgéniques de souris, d'expériences de parabiose, et d'injection de cellules de carcinome pulmonaire TC-1 *in vivo*, Loyher *et al.* ont prouvé qu'une partie des TAM présents dans l'environnement tumoral provenait de la prolifération de M1 présents dans les poumons avant le développement de la tumeur, et qu'une autre serait issue du recrutement CCR2-dépendant des monocytes, qui finiraient par devenir la population de TAM dominante (174). Quelles que soient leurs origines, les TAM n'échappent pas au phénomène de polarisation. Ils produisent peu de ROS et de cytokines pro-inflammatoires, telles que Il-1 β , TNF α , Il-6 ou Il-12, et présentent de forts niveaux d'expression d'arginase-I et de CD206, marqueurs caractéristiques des macrophages M2 (175). De plus, les TAM sont capables de sécréter des facteurs angiogéniques comme VEGF, EGF et TGF- β , soutenant l'hypothèse de l'orientation majoritairement M2 des TAM (176). Le TGF- β est capable de supprimer la polarisation M1 des TAM, plus favorable pour éliminer la tumeur, et stimule le phénotype M2-TAM (175, 177). Enfin, on note une présence prédominante des M2-TAM dans l'infiltrat macrophagique présent chez les patients CBNPC (Figure 13). D'ailleurs, plus la densité de M2-TAM est importante dans le cancer du poumon, plus le pronostic est mauvais.

C'est le contraire pour les macrophages M1-TAM qui eux sont positivement corrélés au pronostic (Figure 13) (178, 179).

Cependant, et comme cela a été évoqué de nombreuses fois dans mon introduction, la théorie de la polarisation semble trop simpliste. En effet, par exemple, 5% des AM présents dans le cancer du poumon présentent des marqueurs mixtes, spécifiquement autant M1 que M2 (180). De plus, les TAM, pourtant considérés généralement comme ayant un phénotype M2, ont montré un métabolisme orienté vers la glycolyse *in vitro*, caractéristique des M1-TAM, ce qui leur confère des propriétés pro-métastatiques (181). Les cellules cancéreuses sont capables d'adapter leur métabolisme à la nature de l'environnement dont elles disposent. La présence du surfactant dans les poumons pousse les cellules tumorales du CBNPC à orienter leur métabolisme énergétique vers l'utilisation des acides gras. Par ailleurs, les TAM ont montré une capacité accrue à libérer le cholestérol, le mettant à disposition des cellules tumorales. Ainsi, il a été observé que le taux de cholestérol de ces cellules tumorales était augmenté. Des stratégies de réduction du cholestérol afin de contrôler la croissance tumorale dans le CBNPC ont été essayées sans succès, mais cibler le métabolisme des TAM serait une approche thérapeutique intéressante (182).

D'autres cellules du système immunitaire sont connues pour être impliquées dans le développement du CBNPC, comme les lymphocytes ou les neutrophiles. Les TAN (*tumor associated neutrophils*) présentent un phénotype activé exprimant un profil chimiokinique et cytokinique différent des neutrophiles sanguins. Ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme CCL2, IL-8, MIP-1 α et IL-6, ce qui leur permet de stimuler la prolifération des lymphocytes T (183). Il y a d'ailleurs un enrichissement important en lymphocytes T dans les tumeurs des patients atteints de CBNPC, par rapport au parenchyme pulmonaire environnant (184). La présence en nombre de lymphocytes T Régulateurs est associée à un mauvais pronostic, alors qu'une augmentation du nombre de lymphocytes T CD8⁺ est associée à un pronostic plus favorable (185, 186).

L'importance du compartiment immunitaire a vu émerger des thérapies ciblées, exploitant les protéines de contrôle immunitaire. Par exemple, PD-1 (Programmed cell Death protein 1) exprimée à la surface des lymphocytes T, B, des NK et de certaines cellules myéloïdes, se lie à PD-L1 et PD-L2 exprimées à la surface des cellules tumorales. L'interaction PD1/PD-L1 inhibe l'activation et les fonctions cytotoxiques des lymphocytes, un moyen pour la tumeur d'échapper au système immunitaire. Dans le CBNPC, la présence de PD-1 à la surface des M2- TAM, leur confère une activité pro-tumorale et favorise l'échappement immunitaire des cellules tumorales (Figure 13) (187). L'inhibition de la polarisation vers le phénotype M2 des TAM associée au traitement par anticorps anti-PDL1 a permis de contrôler la croissance tumorale chez

des souris injectées avec des cellules de carcinome pulmonaire (188). L'association d'actions ciblées contre les TAM et des thérapies anti-PD1/anti-PDL1 semblent être une piste d'amélioration de la prise en charge des CBNPC.

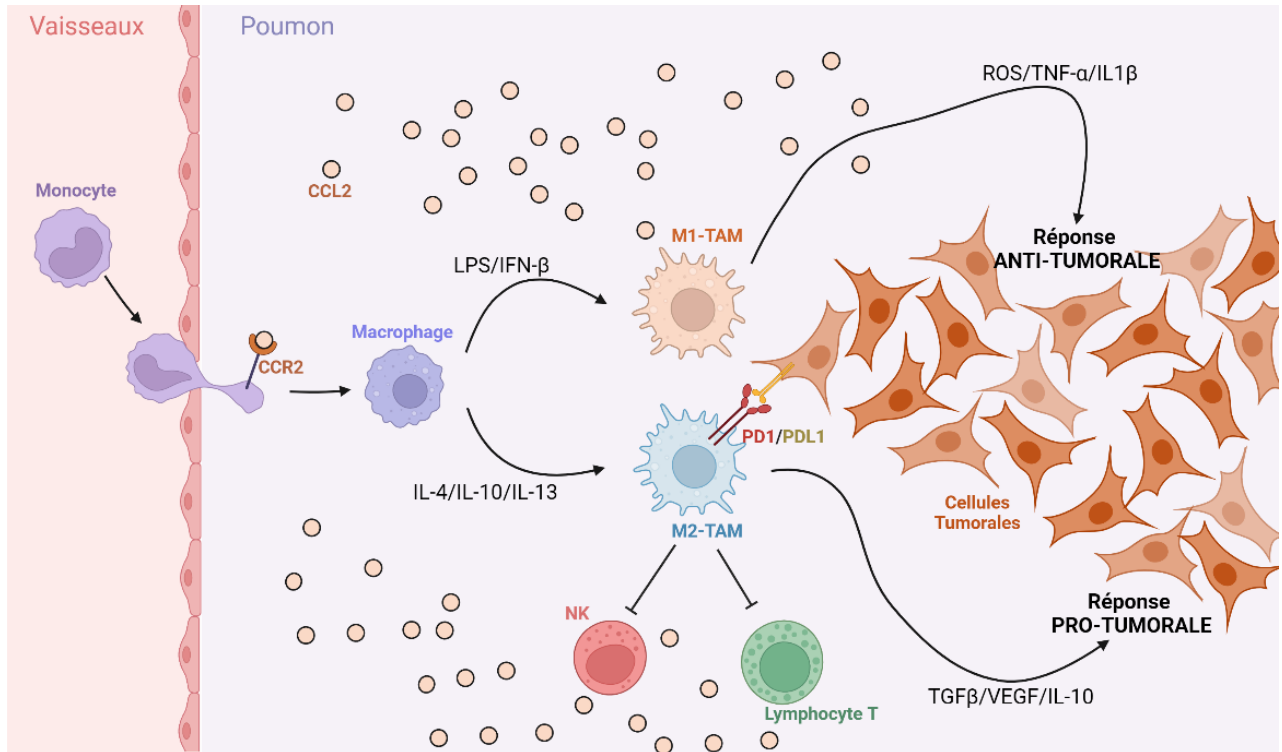


Figure 13 : Effet de la polarisation macrophagique sur les cellules tumorales (177)

CCL2 est sécrété par les cellules tumorales et les cellules immunitaires présentes sur le site tumoral. CCL2 recrute via le récepteur CCR2 présent à leur surface les monocytes circulants qui, sous l'action des cytokines présentes vont se différencier en macrophages M1-TAM ou M2-TAM. Les macrophages M1-TAM génèrent une réponse antitumorale via le recrutement de cellules immunitaires effectrices. En revanche, les macrophages M2-TAM génèrent une réponse pro-tumorale grâce à l'inhibition des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules NK, ainsi qu'à la sécrétion de facteurs stimulant la prolifération cellulaire et d'angiogenèse comme le TGF- β , le VEGF et l'IL-10.

Ce chapitre a permis d'apporter des éléments de connaissance sur la fibrose pulmonaire qui sera détaillée par la suite dans le contexte de l'exposition aux rayonnements ionisants. Il a également permis d'aborder l'implication des macrophages dans ces pathologies pulmonaires et d'ouvrir des pistes sur leur impact dans les lésions radio-induites.

Chapitre 4 : Prise en charge du CBNPC par SBRT

La radiothérapie joue un rôle central dans le traitement des cancers de par son pouvoir curatif important. Ainsi, en 2020, 227 352 personnes ont été traitées par radiothérapie, tous secteurs et types de cancers confondus. La radiothérapie en conditions stéréotaxiques (SBRT, *Stereotactic Body Radiation Therapy*), ou radiothérapie stéréotaxique, est une technique de pointe qui permet d'irradier de très petits volumes grâce à la convergence de mini-faisceaux, avec une précision submillimétrique, guidée par l'imagerie scanner. La réduction du volume rend possible l'utilisation de doses par fraction dites ablatives, allant de 6 à 20 Gy, au lieu des 2 Gy par fraction utilisés en radiothérapie conventionnelle. La SBRT présente également l'avantage d'avoir une décroissance de dose rapide en dehors du volume cible, ce qui permet d'épargner au maximum les tissus sains. À l'origine, la stéréotaxie est une méthode de localisation des structures cérébrales via un cadre de référence externe en trois dimensions lors de procédures chirurgicales mini-invasives (189). À la fin des années 1940, John Lawrence et Cornelius Tobias conceptualisent l'utilisation de faisceaux de particules chargées afin de modifier ou d'altérer des structures cérébrales. L'associant au cadre de stéréotaxie, Lars Leksell réalise la première radiochirurgie en 1955 (189). À la suite de cela, lui et son équipe conçoivent le Gamma Knife I, en 1967, composé de 167 sources de Cobalt 60, suivi par le Gamma Knife II, en 1975. Les premiers patients sont traités en dose unique pour des malformations artérioveineuses intracrâniennes ou des tumeurs cérébrales (Figure 14A). À l'origine utilisé en dose unique pour la radiochirurgie cérébrale, l'utilisation du Gamma Knife II pour la délivrance de doses fractionnées a ouvert la voie à la radiothérapie stéréotaxique extra-crânienne (SBRT) (Figure 14B) (189). Dans ce chapitre, je vais détailler l'utilisation de la radiothérapie stéréotaxique extra crânienne dans le cadre de la prise en charge thérapeutique des cancers bronchiques non à petites cellules. La Cour des comptes estimait en 2020 que 59% des centres de radiothérapie étaient équipés pour la SBRT et que 8.7% des patients de radiothérapie avaient eu accès à la SBRT dans le réseau public et 14% dans le secteur privé, tous types de tumeurs confondus. En France, l'irradiation en conditions stéréotaxiques concerne principalement les tumeurs cérébrales et les tumeurs pulmonaires.

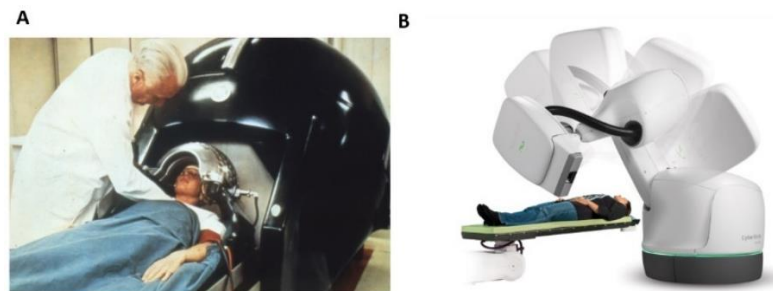


Figure 14 : Appareil de radiothérapie stéréotaxique

A : Lars Leksell avec un patient, en utilisant le premier Gamma Knife. (Source : elekta.com).

B : Appareil de SBRT, actuel Gamma Knife. (Source : gammaknife.com)

1) Un bon candidat pour la SBRT : le poumon

L'un des paramètres importants dans le choix de la dose et du type de radiothérapie est la réponse des tumeurs et des tissus sains aux rayonnements ionisants. Cette réponse est très dépendante de la nature et de l'organisation macroscopique des organes à risque présents dans le champ d'irradiation (190).

Les organes peuvent être qualifiés de « hiérarchisés » ou de « non-hiérarchisés ». Les organes hiérarchisés sont souvent ceux qui possèdent un renouvellement rapide, avec des compartiments souche et de prolifération distincts du compartiment fonctionnel comprenant les cellules différenciées. La peau ou l'intestin, par exemple, possèdent des organisations dites hiérarchisées. En cas d'irradiation, la mort cellulaire dans les compartiments souche et de prolifération compromet le renouvellement tissulaire. Les lésions apparaissent rapidement, dès que les cellules différenciées arrivent en fin de vie et ne sont plus remplacées. À l'inverse, les organes ayant une organisation non-hiérarchisée n'ont pas de compartiment séparé dédié à la prolifération cellulaire et au renouvellement tissulaire. Dans ces organes, le renouvellement cellulaire n'est pas constant et n'intervient qu'en cas de nécessité, les cellules fonctionnelles étant capables de retrouver des capacités de prolifération pour compenser des pertes cellulaires. Dans ces tissus, les lésions radio-induites apparaîtront plus tardivement. Le poumon est un bon exemple d'organe non hiérarchisé : l'épithélium pulmonaire et les alvéoles possèdent des cellules différenciées capables de proliférer en cas de besoin comme les pneumocytes de type II ou les cellules Club, qui sont capables de générer différents types cellulaires lors de la cicatrisation pulmonaire (Figure 15) (191, 192).

D'autre part, il existe deux types d'organisation des sous-unités fonctionnelles des organes : en série ou en parallèle. Les organes en série possèdent des sous-unités fonctionnelles dépendantes les unes des autres. C'est-à-dire que lorsqu'une unité fonctionnelle est lésée, l'intégralité de la fonction de l'organe peut être impactée. La dose maximale reçue (D_{max}) est un paramètre important à prendre en compte lorsque ces organes sont irradiés, car elle est déterminante dans l'apparition des effets secondaires (193). La moelle épinière, la trachée ainsi que les bronches souches et segmentaires sont des organes en série à prendre en considération lors de la planification du traitement en radiothérapie thoracique. Les poumons, eux, ont une architecture macroscopique dite en parallèle : les lobules pulmonaires, sous-unités fonctionnelles du poumon composées d'une bronchiole respiratoire et des alvéoles associées, sont indépendantes les unes des autres (Figure 15). Si un petit nombre de sous-unités fonctionnelles est lésé, la fonction respiratoire des poumons n'est pas ou peu impactée (Figure 15). Une notion importante pour ces organes est celle de la

capacité de réserve fonctionnelle. Pour les organes ayant une architecture en parallèle, l'un des paramètres limitants est le volume recevant une certaine dose (ex pour le poumon : $V_{20} < 10\%$ indique que le volume recevant 20 Gy ne doit pas dépasser 10% du volume pulmonaire total) (193). C'est ce volume qui sera déterminant dans l'apparition des effets secondaires.

Le poumon est donc un organe non hiérarchisé avec une architecture en parallèle. C'est pour cela qu'il est un bon candidat pour la SBRT (Figure 15). Ses caractéristiques organisationnelles lui permettent de mieux tolérer des doses d'irradiation plus fortes sur des petits volumes, qualifiés de « points chauds », sans impacter de manière trop importante sa fonction principale de respiration.

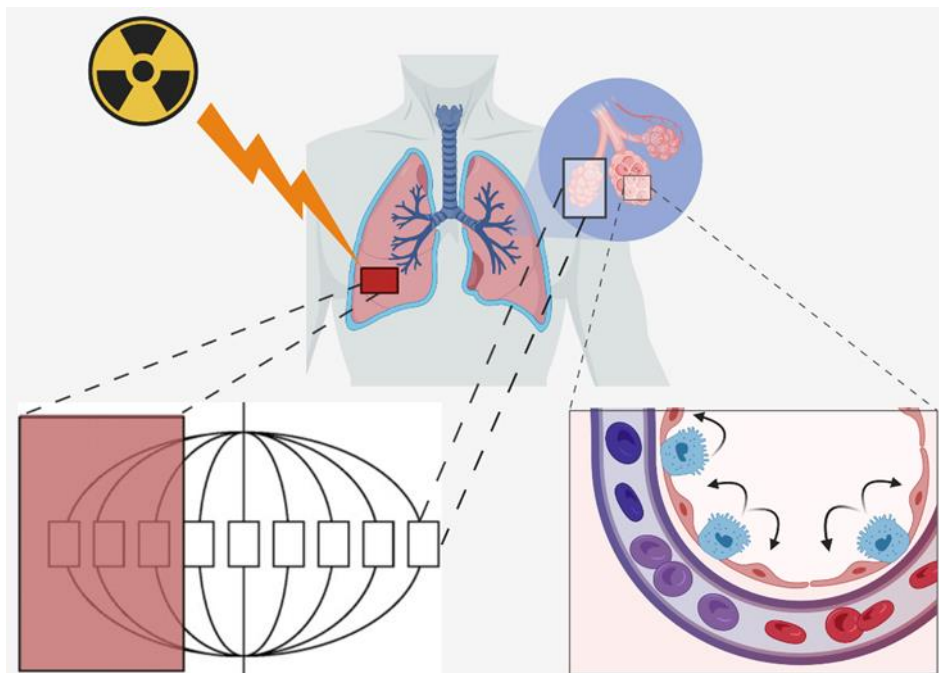


Figure 15 : Le poumon, un bon candidat pour la SBRT

Les sous-unités fonctionnelles du poumon sont les lobules pulmonaires composés d'une bronchiole respiratoire et des alvéoles associées. Le poumon n'a pas de compartiment souche indépendant du compartiment fonctionnel. Les pneumocytes de type II, capables de se différencier en cellules effectrices alvéolaires (les pneumocytes de type I), sont présents dans l'alvéole et capables de régénérer la structure alvéolaire si nécessaire. Si un petit volume de lobules pulmonaires est irradié, l'organisation macroscopique du poumon permet que la fonction globale de l'organe ne soit pas atteinte.

2) La prise en compte du risque dans le traitement par SBRT du CBNPC

a) Les modèles prédictifs mathématiques

Les protocoles de SBRT dans le cadre de la prise en charge du CBNPC sont principalement en hypofractionnement sévère. Ce terme décrit un traitement dont la dose par fraction est dite ablative (à partir de 6 à 8 Gy par fraction) c'est-à-dire très supérieure aux 2 Gy classiquement administrés en radiothérapie conventionnelle. Le but du fractionnement de la dose en radiothérapie est d'éradiquer la tumeur tout en épargnant au maximum les tissus sains en leur laissant le temps de réparer les dommages radio-induits entre chaque fraction. La dose totale administrée est dépendante de la radiosensibilité de la tumeur, de la présence des organes à risque et de la toxicité possible due à l'irradiation de ces organes à risque. Pour la mise en place des protocoles en hypofractionnement sévère, il est nécessaire de prédire les effets et les risques afin d'ajuster la dose totale administrée et de prédire les effets sur la tumeur et les tissus sains d'un changement de la dose par fraction. Pour cela, il existe des modèles mathématiques qui se basent sur l'effet des rayonnements ionisants sur les cellules *in vivo* et *in vitro*. Chadwick et Leenhouts adaptent le modèle linéaire quadratique (MLQ), proposé par Kellerer et Rossi un an avant, pour appliquer les effets des rayonnements ionisants à la survie cellulaire (194, 195) :

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

S est la survie, D est la dose totale, α correspond aux cassures double brin non réparables de l'ADN et β aux cassures simple brin réparables de l'ADN. Finalement, α est la composante linéaire du MLQ, représentant les dommages directement létaux. La composante quadratique du MLQ correspond à β , représentant l'accumulation des dommages sublétaux. Aujourd'hui, le MLQ s'est imposé dans le domaine clinique par sa simplicité et sa description la plus proche de la vérité des mécanismes radiobiologiques sous-jacents en réponse à l'exposition aux rayonnements ionisants.

Il existe un modèle adapté lorsque la dose est fractionnée, intégrant le nombre de fraction (n) et la dose par fraction (d) (Figure 16) :

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

Le MLQ permet d'avoir accès à différents paramètres radiobiologiques, dont le ratio α/β , la *Biological effective Dose* (BED) et la Dose Equivalente à 2 Gy (EQD2).

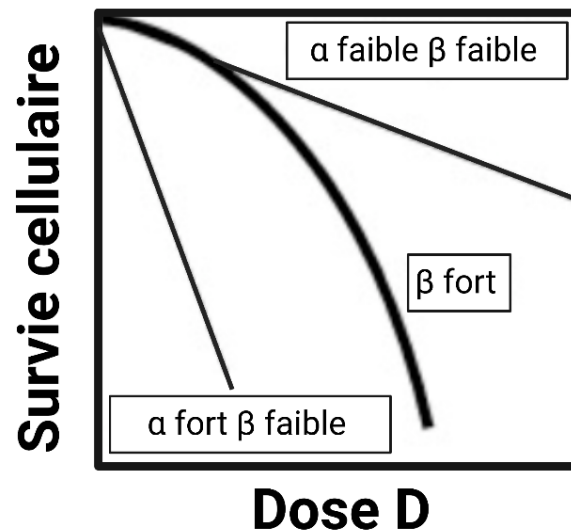


Figure 16 : Représentation graphique du modèle linéaire quadratique avec les implications des paramètres α et β

Le ratio α/β , s'exprimant en Gy, est la dose à laquelle les composantes linéaires et quadratiques sont identiques. Il renseigne sur la sensibilité du tissu à la dose par fraction (196). Plus concrètement, les tissus avec un ratio α/β élevé (entre 10 et 20 Gy) ont une courbe de survie cellulaire plus linéaire, et donc sont moins sensibles à une augmentation de la dose par fraction. Les tissus à ratio α/β bas (entre 0,5 et 10 Gy), eux, présentent une courbe de survie avec une forte composante quadratique (la courbe de survie chute plus rapidement), et seront donc plus impactés par une augmentation de la dose par fraction. Les tissus ayant une réponse tardive à l'irradiation possèdent un ratio α/β bas, alors que les tissus à réponse rapide, ou la plupart des tumeurs, ont un ratio α/β élevé (197). Il existe des exceptions comme le cancer de la prostate qui possède un α/β très faible, de 1.5 Gy, et pour qui l'hypofractionnement se montre donc intéressant (198). Le ratio α/β des poumons sains est de 3 Gy, ce qui est relativement faible par rapport à d'autres types de tissus sains. Globalement, pour les tumeurs CBNPC il a été considéré un ratio α/β d'environ 10 Gy. Cependant, il a été montré dans différentes études une variabilité importante de la valeur du ratio α/β , sûrement liée à l'hétérogénéité histologique des différents CBNPC (199). Une étude récente a montré que les CBNPC de stade précoce, traités par SBRT, avaient un ratio α/β compris entre 12 et 16 Gy (200).

La BED est une dose conceptuelle permettant la comparaison de l'effet biologique de différents protocoles de fractionnement. C'est la dose totale nécessaire avec les fractions les plus petites possibles pour obtenir le même effet biologique que celui obtenu par le schéma de fractionnement de référence. Dans la formule de la BED, le paramètre β tend donc vers 0 et permet la simplification de l'équation comme suit :

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

E correspond à la mort cellulaire, D à la dose totale, n au nombre de fractions et d à la dose par fraction.

Lorsque l'on décide de comparer un nouveau protocole à un protocole normo fractionné avec une dose par fraction de 2 Gy l'équation devient :

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

Donc comme décrit plus haut, les CBNPC ont un ratio α/β élevé, qui ne devrait pas les rendre éligibles à l'hypofractionnement de la dose. Mais la radiothérapie conventionnelle normo-fractionnée ne permet pas de les contrôler de manière satisfaisante. Afin de palier à cela, il faut donc augmenter la BED pour gagner en efficacité anti-tumorale. Augmenter la dose totale en radiothérapie conventionnelle n'étant pas possible vu les risques de séquelles associées, une autre option est d'augmenter la dose par fraction. L'utilisation de l'hypofractionnement sévère a donc été envisagée pour contrôler ces tumeurs, le poumon pouvant supporter des « points chauds » grâce à son organisation en parallèle.

Le MLQ ne serait valable que pour des doses par fraction de 1 à 8/10 Gy. En effet, le MLQ sous-estime très largement l'effet biologique induit par les doses de moins de 1 Gy (201). Pour le cas des doses ablatives, utilisées pour la SBRT, donc supérieures à 8 Gy, le MLQ est grandement remis en question (202-204). En effet, la courbe de survie calculée par le MLQ s'éloigne de la réalité des données *in vivo* et *in vitro*, car elle surestime la mort cellulaire directe (202). Les dommages vasculaires, les réactions des tissus de soutien et les réactions des cellules clonogènes tumorales, induites au-dessus de 10 Gy, ne sont pas pris en compte dans le MLQ. Aux fortes doses par fraction, les dommages à l'ADN ne sont plus les seuls responsables de la mort cellulaire et donc le MLQ sous-estime l'efficacité des protocoles. En clinique il est ainsi observé que les protocoles utilisant des doses par fraction ablatives sont plus efficaces que les doses équivalentes calculées par le MLQ (205).

Les nombreuses limites du MLQ ont mené l'implémentation de modèles dits alternatifs. En 2004, Guerrero et Li introduisent un nouveau paramètre qui prend en considération la survie cellulaire *in vitro* et *in vivo* (206). En 2008, Park *et al.* propose un modèle plus spécifique à la radiothérapie stéréotaxique. Ils créent l'*Universal Survival Curve* (USC), un modèle hybride se basant sur le MLQ tout en se rapprochant mieux des données expérimentales pour les doses ablatives en termes de survie cellulaire (207). Ce modèle permet d'introduire la dose équivalente à une seule fraction (SFED) comme étant la dose unique délivrée qui aurait le même effet biologique que le fractionnement de référence. De plus, la BED reste valable dans ce modèle. L'USC modélise de manière plus fidèle les courbes de survie pour toute la gamme de doses sur des lignées de cellule H460, issues de CBNPC. En parallèle, Asrtrahan propose le modèle linéaire-quadratique-linéaire (MLQL), qui détermine une dose de transition (D_T) à laquelle le MLQ redevient linéaire, afin de représenter l'impact des fortes doses sur la survie cellulaire (208). En 2010, Wang *et al.* modifie le MLQ pour l'adapter encore une fois aux fortes doses par fraction et propose le MLQ généralisé (MLQg) (204). L'idée derrière ce nouveau modèle est de mieux prendre en compte l'implication des dommages sublétaux (représentée par le paramètre β dans le MLQ) qui s'ajoute aux dommages létaux directs (le paramètre α). En effet, aux fortes doses par fraction, l'intensification des rayonnements ionisants induit la conversion des dommages sublétaux en dommages directement létaux, ce qui réduit de fait le paramètre β . L'absence de prise en considération de l'impact de cette conversion des dommages sublétaux dans le MLQ induit une surestimation de la mort cellulaire aux fortes doses par fraction. C'est pour cela que dans le MLQg, la composante β est décomposée en β_1 et β_2 : β_1 correspondant aux dommages sublétaux et β_2 à la conversion des dommages sublétaux accumulés en dommages létaux. Le paramètre β_2 et la réparation de l'ADN dans les dommages sublétaux sont deux processus en compétition, qui aux très fortes doses par fraction se confondent.

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

Bien que ces modèles alternatifs permettent de palier aux limites évidentes du MLQ, ils complexifient beaucoup la modélisation de l'effet des rayonnements, sans pour autant décrire avec exactitude la réponse aux fortes doses par fraction. De plus, quel que soit le modèle prédictif utilisé, ils ne prennent pas en compte les processus biologiques liés à la réponse tumorale, comme l'immunité antitumorale et la réponse vasculaire. Les phénomènes de réoxygénation, de repopulation ou de redistribution dans le cycle cellulaire ont également de forts impacts dans la réponse des tissus aux rayonnements. Ils font d'ailleurs partie des 6R de la radiobiologie, qui seront détaillés dans le chapitre suivant. Toutefois, ces modèles de prédiction de réponse à l'irradiation,

associés aux données cliniques, facilitent la mise au point des protocoles optimaux de radiothérapie stéréotaxique.

b) Organes à risque en SBRT pulmonaire et toxicité associée

Les organes à risque en radiothérapie sont les organes sains présents dans le champ d'irradiation. Ce sont eux qui limitent la dose d'irradiation choisie et délivrée aux tumeurs, car c'est l'irradiation des organes à risque qui est responsable du développement des effets secondaires. La SBRT permet de limiter l'exposition des organes à risque grâce à l'exposition de volumes réduits et à la décroissance de dose rapide en dehors du volume cible. Néanmoins, la SBRT pulmonaire est tout de même responsable du développement d'effets secondaires aigus et tardifs.

Le premier organe à risque dans la SBRT du CBNPC est le poumon sain ipsilatéral (celui qui porte la tumeur). Les principales toxicités associées sont les pneumopathies radiques et la fibrose pulmonaire radio-induite. Les études cliniques ne prennent pas toujours en compte les mêmes types de protocoles ou les mêmes cancers histologiques, ce qui rend compliqué la détermination de chiffres globaux concernant la toxicité associée aux traitements du CBNPC. Cependant, il est considéré que la pneumopathie précoce concerne jusqu'à 28% des patients et que la fibrose radique pulmonaire tardive concerne 12% des patients (209). La radiothérapie est d'ailleurs généralement déconseillée pour les patients atteints de pathologies interstitielles du parenchyme pulmonaire comme la fibrose pulmonaire idiopathique (210).

Le cœur est un organe avec une organisation mixte, il est organisé en série pour les structures vasculaires, mais en parallèle pour les structures cardiaques. La radiothérapie stéréotaxique pulmonaire, comme toutes les radiothérapies thoraciques, est un facteur de risque de pathologies cardiaques (211). Dans la planification de traitement, le but est donc d'éviter au maximum le cœur.

Le plexus brachial et la moelle épinière sont tous deux des organes à risque à prendre en considération (212). La plexopathie brachiale radio-induite ou la myélopathie radique peuvent se développer et générer des pertes de motricité et de sensibilité dans les extrémités.

La paroi thoracique et la peau sont également des organes à risque à considérer, car l'irradiation peut induire des fractures costales ou des brûlures radiologiques (212). Les patients atteints de diabète ou d'obésité sont plus susceptibles de développer des complications cutanées.

La trachée est un organe organisé en série souvent dans le champ d'irradiation en SBRT pulmonaire. Les toxicités associées peuvent être létales comme la sténose, l'occlusion ou la nécrose trachéale (212). C'est également le cas pour les bronches

souches et segmentaires ainsi que pour l'œsophage. Le système vasculaire, comprenant l'aorte, les veines cave inférieure et supérieure, ainsi que les veines et artères pulmonaires, est considéré comme un seul organe à risque (212). Également organisé en série, la toxicité associée peut entraîner des ruptures d'anévrisme et des hémorragies. Lorsque les structures importantes du système vasculaire sont dans le champ d'irradiation, il est recommandé d'utiliser un produit de contraste afin de mieux les segmenter.

Ces organes à risque sont principalement présents dans la zone centrale de la cage thoracique et engendrent une toxicité exacerbée dans le traitement des tumeurs centrales et ultra-centrales. En effet, une tumeur centrale est définie comme étant localisée 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 laryngés (213). Cette super toxicité est observée par Timmerman en 2006, lors d'un essai clinique de phase II, testant un protocole en SBRT pulmonaire avec une dose totale de 60 à 66 Gy administrée en 3 fractions, qui voit 6 patients décéder suite au développement de séquelles de grade 5 (214). Quatre de ces décès ont été associés à une pneumonie bactérienne, un à un épanchement péricardique et le dernier à une hémoptysie tardive massive. La localisation de la tumeur est devenue un facteur prédictif de toxicité avec onze fois plus de risque de toxicité sévère pour les tumeurs centrales (214). C'est à partir de ces observations que la « No Fly Zone » a été définie, et considérée comme une zone à haut risque de toxicité et à éviter lors de la planification des traitements en SBRT thoracique (Figure 17). Actuellement, pour les tumeurs centrales et ultra-centrales, l'ESTRO recommande respectivement des protocoles de 8 fractions de 8,5 Gy et de 12 fractions de 5 Gy (215).

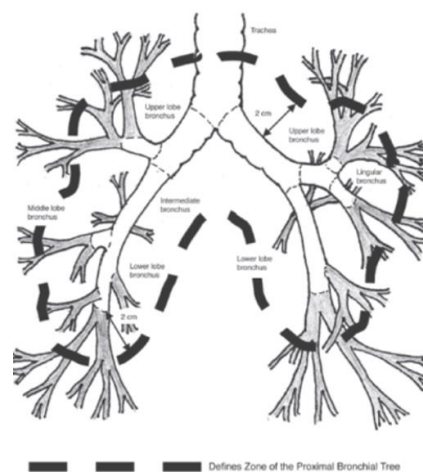


Figure 17 : La « No Fly Zone » en SBRT pulmonaire (216)

3) La SBRT pulmonaire : en pratique

Aujourd'hui, la SBRT est indiquée dans les cas de CBNPC de stade précoce, sans invasion ganglionnaire, sans métastase, avec une tumeur de moins de 7 cm dans sa plus grande dimension. La SBRT est une alternative pour les patients inopérables ou refusant la chirurgie. Elle présente un meilleur contrôle tumoral que la radiothérapie conventionnelle en 3D-CRT (*3 Dimensions Conformal Radiation Therapy*) ou IMRT (*Intensity Modulated Radiation Therapy*), mais ne présente pas de plus-value par rapport à la chirurgie (216). C'est pour cela que l'exérèse reste le traitement de référence pour ce type de tumeur. Le taux de contrôle tumoral pour la SBRT est de 86 à 98% à 3 ans (209), et le taux de survie spécifique est de 73 à 82%, alors que le taux de survie globale est de 43 à 57% (217).

En ce qui concerne les protocoles de fractionnement utilisés, l'ESTRO (European Society for Radiotherapy and Oncology) recommande 3 fractions de 15 Gy pour les tumeurs périphériques et 4 fractions de 12 Gy pour les tumeurs en contact avec la paroi thoracique (215). Ces protocoles sont conseillés pour les patients inopérables, mais pour les patients opérables refusant la chirurgie, il est recommandé, quelle que soit la localisation de la tumeur, un protocole de 3 fractions de 18 Gy (215). Bien que la nécessité d'avoir une BED₁₀ de plus de 100 Gy pour assurer un contrôle local satisfaisant semble faire consensus, les protocoles utilisés en SBRT restent très hétérogènes entre les différents centres de radiothérapie. C'est également le cas pour la détermination des différents volumes cibles et marges. Pourtant la SBRT nécessite la définition fine des différents volumes concernés, à cause des fortes doses par fraction utilisées. Ces différents volumes sont délimités sur des scanographies quadridimensionnelles lorsque le patient est en position de traitement. L'*International Commission on Radiation Units* (ICRU) définit dans son rapport 91 les volumes à prendre en considération dans les traitements par SBRT (218) : le *Gross Target Volume* (GTV), le *Clinical Target Volume* (CTV), l'*Internal Target Volume* (ITV), le *Planning Target Volume* (PTV), et le *Planning Organ at Risk Volume* (PRV). Ces volumes se distinguent en deux catégories : le GTV, le CTV et les OAR qui correspondent à des volumes purement anatomiques ; et l'ITV, le PTV et le PRV qui sont des volumes conceptuels établis lors de la planification du traitement afin que la dose finale délivrée soit cliniquement acceptable, en termes de contrôle local et de protection des OAR (Figure 18).

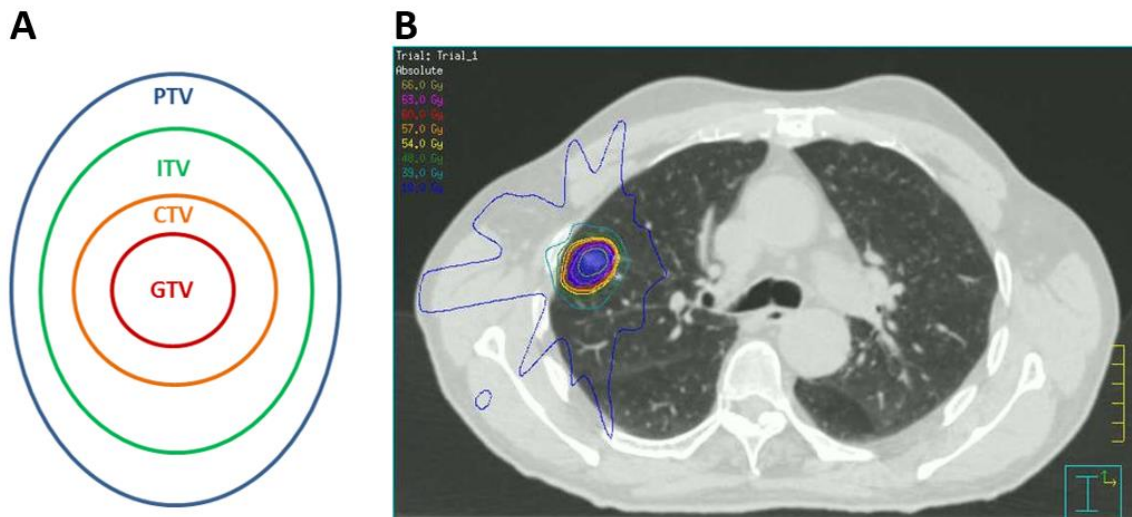


Figure 18 : Les volumes définis dans la planification de traitement en radiothérapie externe

A : Les différents volumes utilisés lors de la planification de traitement en radiothérapie externe. B : Dosimétrie sur un plan axial, PTV (volume en bleu) et courbes isodoses de 66 Gy (en jaune) à 18 Gy (en bleu foncé) (source : radiothérapie-tenon.aphp.fr).

Le *Gross Target Volume* correspond au volume de la tumeur visible sur les images scanner. Toute zone susceptible d'être tumorale est intégrée dans le GTV.

Le *Clinical Target Volume* est le volume contenant le GTV et le tissu cible subclinique jugé pertinent pour le traitement, c'est-à-dire les marges appliquées au GTV. Cette marge est ajustée manuellement en fonction de la croissance tumorale observée. Un bon contrôle tumoral est obtenu en clinique avec des marges de 0 à 5 mm. Cependant en SBRT, ces marges sont peu utilisées et en pratique le CTV est égal au GTV. La présence de marges serait susceptible d'augmenter de façon considérable le volume recevant de fortes doses.

Le *Planning Target Volume* est un outil conceptuel permettant de garantir que la dose prescrite sera bien administrée à tout le CTV malgré les incertitudes. La marge entre le CTV et le PTV dépend des incertitudes liées à la planification du traitement. Ces incertitudes peuvent être d'ordre multiple : dosimétrique, mécanique, algorithmique, liées au logiciel de planification de traitement, liées à la forme de la tumeur, au repositionnement du patient et aux mouvements respiratoires et cardiaques. Le PTV est donc propre à chaque patient et doit être déterminé sur les images scanner. La dose délivrée au PTV n'est pas homogène, elle doit cependant être au minimum de 95% de la dose prescrite (219, 220). Afin de tenir compte des mouvements de la tumeur pour améliorer le ciblage et également pour qu'il n'y ait pas

trop de tissu sain qui reçoive une dose importante inutilement, des stratégies de prise en compte des mouvements respiratoires sont utilisées, comme le gating ou le tracking respiratoire (210). L'*Internal Target Volume* est celui qui prend en compte ces mouvements internes et physiologiques des organes cibles. Il faut cependant faire attention, car l'ajout d'une marge importante, qui prendrait en compte tous les mouvements possibles des volumes cibles, n'est pas une solution à cause de l'augmentation du risque d'effets secondaires.

Dans le même esprit, le *Planning Organ at Risk Volume* permet de réaliser une marge autour des organes à risque. C'est le PRV qui limite principalement la dose délivrée afin d'éviter au mieux les effets secondaires associés à la SBRT.

4) Effets secondaires associés à la SBRT

a) Les éléments diagnostiques

Bien que, comme vu plus haut, les organes à risque soient nombreux, l'objectif ici est de détailler les effets secondaires associés à la toxicité induite sur le poumon sain environnant. Les manifestations cliniques de ces effets secondaires sont des toux sèches, de la fièvre, une dyspnée, une asthénie et une diminution de la capacité respiratoire. Dans un nombre non négligeable de cas, les patients sont asymptomatiques. Ces effets secondaires sont classés en deux pathologies, une précoce, la pneumopathie radique (PR), et une tardive, la fibrose pulmonaire radio-induite (FPR). La PR survient dans les six mois après le traitement. Elle peut survenir potentiellement chez tous les patients ayant reçu une dose d'irradiation au niveau du parenchyme pulmonaire sain. La sévérité de la PR est comprise entre l'absence de symptôme, mais avec des signes radiologiques, jusqu'à un pronostic vital engagé (Tableau 1).

Afin de réaliser une échelle de gradation des séquelles associées à la radiothérapie, le National Cancer Institute a mis au point le *Common Toxicity Criteria for Adverse Events* en 2003. Cette échelle est régulièrement mise à jour afin d'être le mieux compris possible par les praticiens du monde entier et de prendre en compte de plus en plus de critères. Sa dernière version date de 2017 (CTCAE v5) et la version 6 est en cours de préparation (Tableau 1).

	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5
Pneumopathie Radique	Asymptomatique, observations cliniques ou radiologiques, intervention non indiquée	Symptomatique, intervention médicale indiquée, limitation des activités instrumentales de la vie quotidienne	Symptômes sévères, limitation des activités élémentaires de la vie quotidienne, oxygénothérapie	Atteinte respiratoire menaçant le pronostic vital, intervention urgente indiquée (trachéotomie, intubation)	Décès
Fibrose Pulmonaire Radio-induite	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% du volume pulmonaire	Atteinte menaçant le pronostic vital, intubation avec support ventilatoire, fibrose radiologique > 75%, avec figures en rayon de miel sévères	Décès

Tableau 1 : Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 5 pour la pneumopathie radique et la fibrose pulmonaire radio-induite

La PR de grade 1 a une incidence comprise entre 8 et 89% (217). Les PR de grade 2 ont une incidence de 2 à 28%. L'essai clinique RTOG 0236 indique que les PR de grade 3 concernent 12,7% des patients et celles de grade 4 concernent 3,6% des patients. Cette étude ne rapporte pas de cas de PR de grade 5 (221). En 2010, il est observé un taux de PR de grade supérieur ou égal à 2 de 16% par Guckenberger *et al.* (222). En 2012, Barriger *et al.* montre un taux total de PR de 17% avec 8% concernant des PR de grade 1, 7% de grade 2, 2% de grade 3 et 0,4% de grade 4 (223). En 2016, après analyse de 88 études sur la SBRT thoracique, Zhao *et al.* observe un taux de PR de grade 2 de 9,5% et de grade 3 de 2,2% (224). Les grandes différences observées entre ces analyses rétrospectives sont liées à la grande hétérogénéité des données initiales tant dans la dose administrée que dans le protocole de fractionnement ou les critères d'évaluation. Lorsqu'ont été comparées, par Borst *et al.*, les incidences de PR après 3D-CRT et après SBRT thoracique, le résultat montre que les PR ont une incidence plus élevée après 3D-CRT. En effet, dans une étude comparant 142 patients traités avec des doses par fraction allant de 2 à 2,25 Gy en 3D-CRT à 128 patients traités avec des doses par fraction allant de 6 à 12 Gy en SBRT, il est observé qu'après 3D-CRT, 17,6% des patients ont développé une PR, contre 10,9% après SBRT (225). Cette différence peut s'expliquer par deux principales raisons. D'une part, la réduction des marges en SBRT ainsi que la précision balistique permise par le guidage par l'imagerie permet d'irradier moins de tissus sains. D'autre part, les PR apparaissent plus tard après SBRT (3 mois environ) qu'après 3D-CRT (1 semaine).

La PR peut potentiellement se résorber de manière progressive et laisser peu de séquelles. Si elle ne se résorbe pas, elle peut soit s'aggraver avec une détresse respiratoire sévère, soit dériver en fibrose pulmonaire radio-induite. La fibrose pulmonaire radio-induite est une complication tardive de l'exposition pulmonaire aux rayonnements ionisants. L'effet conséquentiel entre la PR et FPR exprime le lien entre la sévérité des lésions précoces et le développement des lésions tardives. Cet effet conséquentiel porte à controverse, des cas de fibrose radio-induite ayant été observés sans pneumopathie radique préalable (226). Toujours est-il que les FRP sont une complication tardive. Elles apparaissent en effet entre 6 mois et 2 ans après le traitement. Elles concernent entre 3% et 35% des patients, suivant l'étude considérée (227, 228).

Les symptômes cliniques de la PR et de la FRP n'étant pas spécifiques, leur diagnostic peut être délicat. Un des outils diagnostique de référence est l'imagerie scanner. La tomodensitométrie de haute résolution est plus sensible que la radiographie et permet de détecter des modifications du parenchyme pulmonaire plus facilement. Il existe de nombreuses différences entre la radiothérapie 3D-CRT et la SBRT, comme la taille du champ d'irradiation, la dose totale délivrée, la dose par fraction, la distribution de la dose au sein des tissus, les effets biologiques en réponse au schéma de fractionnement et le temps de traitement. C'est pour cela que les modifications tissulaires après SBRT ne peuvent pas être extrapolées à partir des observations réalisées sur les images après radiothérapie 3D-CRT. Linda *et al.* a donc décrit les changements tissulaires pulmonaires, qu'ils soient précoces ou tardifs, après SBRT (Figure 19) (229). Cette étude décrit les modifications précoces comme étant associées à 5 motifs observables sur les images scanner et corrélés aux grades de la PR, allant d'une absence d'altération tissulaire à l'apparition de zones de forte densité tissulaire (Figure 19). Les premières modifications observables sont les opacités en verre dépoli, correspondant à des zones irrégulières de densification, sans effacement des contours des vaisseaux pulmonaires et des parois bronchiques. Dans les premiers grades de la pathologie, celles-ci sont observables de manière éparse et ne correspondent pas à l'intégralité du volume cible. Plus ces opacités en verre dépoli se condensent et se concentrent dans la zone d'irradiation, plus la pathologie progresse, aboutissant à une opacification diffuse importante du poumon.

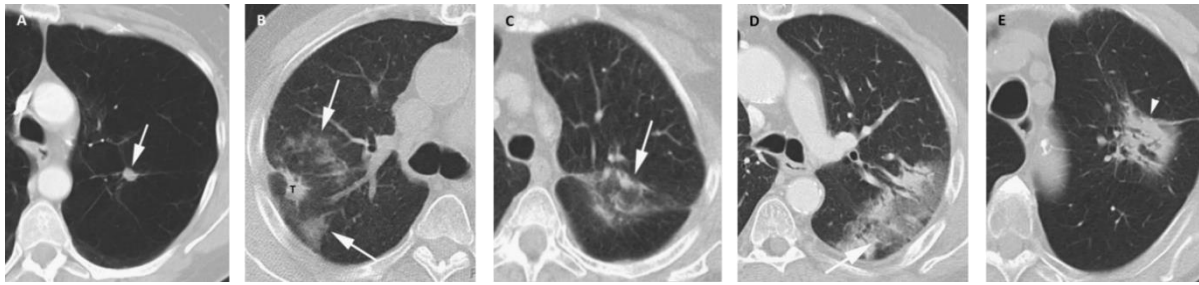


Figure 19 : Motifs de modifications précoces du parenchyme pulmonaire après SBRT (231)

A : CT obtenu 4 mois après traitement ne montrant aucun changement ; B : CT obtenu 4 mois après radiothérapie stéréotaxique montrant des zones éparses en verre dépoli dans le parenchyme pulmonaire normal ; C : CT obtenu 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 : CT obtenu 5 mois après traitement montrant une opacité en verre dépoli diffuse : densification accrue du parenchyme pulmonaire au niveau du site tumoral ; E : CT 5 mois après traitement par radiothérapie stéréotaxique présentant une augmentation forte de la densité limitée à la zone du volume cible.

Les motifs types de la fibrose pulmonaire radio-induite ont également été décrits par Linda *et al.* allant de l'absence de changement tissulaire à la réduction du volume respiratoire pulmonaire (Figure 20) (229). Le motif cicatriciel est le plus précoce avec des opacités linéaires dans la région d'irradiation, souvent associé à une perte de volume pulmonaire. Il est suivi du motif de masse qui correspond à une condensation focale souvent associée à une bronchectasie au niveau du volume cible. Le motif conventionnel modifié associe les deux motifs précédents, c'est-à-dire condensation et perte de masse ainsi que des bronchectasies, et ressemble aux fibroses radio-induites observables après 3D-CRT, mais restreintes à la zone d'irradiation (Figure 20).

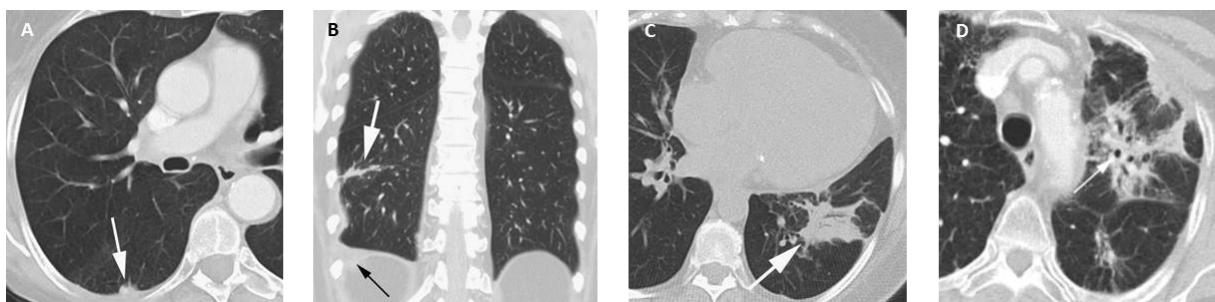


Figure 20 : Motifs de modifications tardives du parenchyme pulmonaire après SBRT (231)

A : CT obtenu 22 mois après traitement sans signe d'augmentation de la densité dans la région de la tumeur ; B : CT obtenu 10 mois après traitement présentant une fibrose cicatricielle : une bande linéaire de fibrose ressemblant à une cicatrice ; C : CT obtenu 11 mois après traitement montrant une fibrose en masse : densification en masse avec bronchectasie au niveau du volume cible ; D : CT obtenu 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.

Après SBRT, les lésions fibreuses pulmonaires sont plus sphériques que celles observées après radiothérapie conventionnelle et épousent la forme de la tumeur d'origine. De ce fait, ces lésions peuvent parfois être confondues avec une récurrence tumorale. Outre la récurrence tumorale, d'autres diagnostics différentiels peuvent être associés aux symptômes des lésions radio-induites pulmonaires, comme la BPCO ou la fibrose idiopathique pulmonaire. Une bronchoscopie et une tomographie par émission de positons, avec injection de Fluorodésoxyglucose (PET-scan FDG), peuvent être réalisées pour écarter ces hypothèses. Des tests fonctionnels sont également une possibilité, car la fibrose pulmonaire radio-induite entraîne une diminution du volume et de l'élasticité pulmonaires, de la capacité vitale forcée (le volume d'air pouvant être expiré de force après une inspiration complète) et de la capacité de diffusion (absorption du CO₂ en une seule inspiration en 10 secondes). Le temps d'apparition après le traitement est un élément important à prendre en considération dans le cadre des lésions radio-induites, car ce laps de temps peut aiguiller le diagnostic. Par exemple, l'apparition d'opacités sur les images scanner avant la fin de la délivrance du traitement suggère plutôt l'implication d'une infection pulmonaire que des lésions radio-induites (230). Les pathologies radiques, précoces ou tardives, sont des pathologies progressives et lentes. Si des symptômes apparaissent sans signe avant-coureur, une infection doit être suspectée. La présence de cavitations dans la zone de fibrose peut également indiquer une infection, une nécrose pulmonaire ou une récurrence tumorale (230). Le diagnostic des radiopathologies pulmonaires n'est pas si simple vu la non-spécificité des symptômes. Doivent être pris en compte : l'historique du traitement (les volumes d'irradiation, etc.), le laps de temps d'apparition des symptômes, les images scanner et les examens complémentaires permettant d'exclure une à une les autres causes possibles de ces lésions pulmonaires.

Les mécanismes cellulaires de la PR et de FRP seront développés dans le chapitre suivant « Radiobiologie et radiopathologie pulmonaires ». Dans le présent chapitre ne seront abordées que les protéines utiles à la prédiction du risque de développer une pathologie radique pulmonaire.

b) Les facteurs de risque

Les facteurs de risque liés aux tumeurs sont les volumes cibles, la taille de la tumeur et sa localisation. Plus la taille de la tumeur est importante, plus les volumes cibles, comme le GTV et le PTV, seront importants (224, 231). Cela augmente la probabilité qu'un volume significatif de tissu sain reçoive une forte dose d'irradiation et donc la probabilité de développer une PR. La localisation dans les lobes inférieurs ou moyens augmente la probabilité de développer une PR après traitement, car ils sont connus pour être plus radiosensibles que les lobes supérieurs (231). Chez la souris, cette radiosensibilité diminuée des lobes pulmonaires supérieurs pourrait être attribuée à un nombre plus important de cellules assimilées à des cellules souches que dans les lobes inférieurs (232). Dans l'objectif d'éviter le développement d'une PR chez les patients, les paramètres dosimétriques recommandés pour la SBRT sont une dose moyenne aux poumons inférieure à 6 Gy et un volume recevant 20 Gy ne dépassant pas 10% du volume pulmonaire total (193).

Pour les facteurs de risque liés au patient, l'âge est un paramètre corrélé positivement à l'apparition de la PR, avec un seuil à 65 ans (233). Le sexe semble également influencer le développement de la PR, les femmes développeraient plus de PR que les hommes, après une SBRT thoracique (231). Cependant, ces facteurs sont très controversés, et les résultats ne sont pas toujours retrouvés d'une étude à une autre. Les facteurs environnementaux comme le tabagisme rentrent également en considération. À l'origine, le tabagisme est considéré comme étant un facteur de risque pour la PR, mais certaines études ont montré un effet protecteur du tabagisme actif. En effet, les fumeurs auraient un volume fonctionnel pulmonaire diminué qui limiterait donc le risque de développer une PR (193, 223). La présence de pathologies pulmonaires comme une fibrose pulmonaire interstitielle ou la BCPO est évidemment une contre-indication importante pour la SBRT, car cela est un facteur de risque dans l'apparition de la PR (198, 223, 234). Les facteurs génétiques reflétant la sensibilité individuelle du patient sont également à prendre en compte. Le gène *ataxia telengectasie mutated* (ATM) a été identifié comme étant associé à une hyper-radiosensibilité. En effet, les patients porteurs d'une mutation sur ce gène ont une capacité de réparation de l'ADN très diminuée et sont plus susceptibles de développer une PR (235). D'autres polymorphismes nucléotidiques sont associés à un risque de PR élevé comme PRKCE, DDX58, *heat shock protein b1* ou TNFSF7(193). En dehors de ces patients syndromiques, il existe des différences de radiosensibilité individuelle dans la population générale. Selon la Commission International de Protection Radiologique, 5 à 15% de la population serait particulièrement radiosensible. Pour des mêmes protocoles de radiothérapie, sans erreur dans la dose délivrée, le développement des effets secondaires peut être très différent d'un patient à un autre (236). En France, des

tests de radiosensibilité individuelle sont développés. L'un a permis, grâce à seulement un prélèvement sanguin, de prédire la fibrose radio-induite après radiothérapie des cancers du sein en se basant sur l'apoptose radio-induite des lymphocytes. L'autre test envisagé s'appuie sur la quantité de protéine ATM autophosphorylée détectée très précocement après irradiation *ex vivo* de micro-biopsies de peau. Bien que certaines pistes de tests de radiosensibilité individuelle soient testées en essais cliniques, pour le moment aucun paramètre biologique ne permet d'estimer objectivement un facteur de risque individuel en clinique (237).

Dans le cadre de la prédiction du risque de séquelles après SBRT, des chercheurs se sont intéressés aux taux sériques de *Krebs von den Lungen-6* (KL-6) et de *surfactant protein D* (Sft-PD) (238). Le KL-6 est une glycoprotéine recouvrant la surface des pneumocytes de type II et des cellules bronchiolaires. Le Sft-PD, lui, est sécrété par les pneumocytes de type II. Il est observé que lorsque les taux sériques de KL-6 et Sft-PD sont élevés, le risque de développer une PR aiguë sévère est plus élevé (238). D'ailleurs, lorsque les auteurs se sont servis de ces données afin de mieux sélectionner les patients avant SBRT dans leur centre, le pourcentage de PR de grade 4 et 5 a diminué de 18,8% à 3,5% (238). Il semblerait que KL-6 soit plus spécifique et sensible comme marqueur sérique que ne l'est le Sft-PD.

D'autres protéines ont été identifiées comme des marqueurs sériques prédictifs dans le cadre de la radiothérapie conventionnelle, mais pas encore pour la SBRT. Le taux plasmatique de TGF- β semblent être un bon candidat. En effet, les patients présentant un taux plasmatique de TGF- β élevé avant traitement par radiothérapie, et dont le taux ne revient pas à un niveau normal pendant le traitement, présentent un risque élevé de développer une PR (239). De plus, il a été également montré chez des patients présentant des CBNPC de stades I-III que l'augmentation du taux plasmatique de TGF- β 1 en réponse au traitement (40-50 Gy, traitement conventionnel), était associée à une probabilité augmentée de développer une PR (240). Chez la souris, le ratio CCSP/Sft-PD plasmatique est corrélé au développement de la fibrose pulmonaire, après irradiation du thorax entier, et semble spécifique des lésions radio-induites (241). La CCSP est sécrétée par les cellules club dans les bronchioles terminales. Le ratio CCSP/Sft-PD plasmatique et le taux sérique de TGF- β pourraient être de bons candidats comme marqueurs prédictifs des lésions radiques pulmonaires après irradiation.

L'association de la radiothérapie avec d'autres traitements comme la chimiothérapie ou l'immunothérapie est également un facteur de risque pour la PR. De plus en plus de stratégies thérapeutiques consistent à combiner plusieurs types de traitements. À la suite de ces combinaisons thérapeutiques ont été observés des cas de « *Recall pneumonitis* », c'est-à-dire une inflammation aiguë de la zone précédemment irradiée à la suite de l'administration d'un agent déclenchant (242). Des

cas ont été rapportés après administration de molécules de chimiothérapie comme la gemcitabine (243) ainsi qu'après l'utilisation d'inhibiteurs de points de contrôle immunitaire comme le Nivolumad, un anti-PD1 (244). La « *Recall pneumonitis* » semble avoir une pathogénèse différente de la PR classique et impliquerait la réactivation des lymphocytes cytotoxiques. L'utilisation de corticostéroïdes permet de gérer les symptômes (242).

c) Prise en charge thérapeutique des séquelles pulmonaires de la SBRT

Il n'existe pas de traitement spécifique des complications pulmonaires liées à la SBRT, c'est pour cela qu'à l'heure actuelle, leur prise en charge est discutée au cas par cas (245). Les pistes thérapeutiques s'articulent autour des traitements de prévention de la PR avant radiothérapie d'une part, et des traitements curatifs de la PR après la radiothérapie d'autre part. Dans le cas de la radiothérapie conventionnelle du CBNPC, pour protéger des lésions radio-induites pulmonaires, l'amifostine, un thiophosphate permettant la captation des espèces réactives de l'oxygène, fait partie des options thérapeutiques préventives (246).

Une fois que la PR s'est déclarée, il existe une stratégie thérapeutique de référence, ce qui n'est pas le cas pour la fibrose radio-induite. La prise en charge thérapeutique de la PR consiste en une corticothérapie : le prednisone, un glucocorticoïde, est administré à 1mg/kg/j pendant 2 à 4 semaines (247). Ce traitement peut être couplé à des immunosuppresseurs, l'azathioprine et la cyclosporine, en cas d'allergie aux glucocorticoïdes (245). Cette thérapie est inefficace pour la fibrose radio-induite, mais l'administration de bronchodilatateurs, de la kinésithérapie et de l'oxygénothérapie peuvent être prescrites pour soulager les symptômes d'insuffisance respiratoire. Les toxicités pulmonaires aiguës et tardives après radiothérapie ont été diminuées dans deux essais cliniques grâce à l'administration prophylactique de pentoxifylline, un anti-aggrégant plaquettaire et stimulateur du flux sanguin microvasculaire (248, 249). Des essais cliniques ont testé d'autres molécules comme les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, dont fait partie le captopril. Après 3D-CRT, le captopril a permis de diminuer l'incidence de la PR (250). Avant cela, il avait été montré chez le rat que le captopril permettait de rétablir la fonction endothéliale, altérée après irradiation, et de diminuer le dépôt de collagènes (251).

De nombreuses études précliniques travaillent à développer de nouvelles pistes thérapeutiques basées sur les mécanismes cellulaires et moléculaires observés dans les poumons après irradiation. Les cibles thérapeutiques les plus prometteuses dans le cadre de la prise en charge des lésions radio-induites s'articulent autour des espèces réactives de l'oxygène, des cellules inflammatoires, du système vasculaire, des collagènes et des différentes cytokines impliquées. Ce sont les acteurs principaux démontrés dans la pathogenèse de ces lésions. Parmi les cellules immunitaires, les macrophages ont été identifiés comme étant une piste thérapeutique intéressante. On observe un infiltrat macrophagique important après irradiation, macrophages issus principalement du recrutement monocyttaire (252). Les sous-populations de macrophages pulmonaires semblent avoir des rôles spécifiques dans le développement des lésions radio-induites. En effet, les macrophages interstitiels, et non alvéolaires, seraient responsables des lésions radio-induites pulmonaires observées chez la souris après irradiation de l'ensemble du thorax (76). Cependant, ces études pré-cliniques sont menées sur des modèles d'exposition du thorax entier. Dans le chapitre « Radiobiologie des fortes doses par fraction et radiopathologie pulmonaire », je détaillerai d'ailleurs des connaissances issues de ces modèles. En effet, peu d'études sont réalisées avec des modèles de SBRT, alors même que ce modèle se rapproche plus des volumes irradiés chez les patients en clinique. L'implémentation et l'étude des mécanismes spécifiques à l'irradiation de petits volumes pulmonaires permettra sûrement de faire émerger de nouvelles pistes thérapeutiques. Dans le chapitre « Radiobiologie des fortes doses par fraction et radiopathologie pulmonaire », je détaillerai les arguments qui suggèrent les macrophages comme une piste thérapeutique prometteuse.

*Chapitre 5 : Radiobiologie des fortes doses par fraction
et radiopathologie pulmonaire*

Dans le chapitre précédent, j'ai détaillé les aspects cliniques des radiopathologies pulmonaires induites par la SBRT. Dans ce chapitre, je vais décrire les mécanismes cellulaires et moléculaires connus pour être impliqués dans les lésions pulmonaires radio-induites. En effet, la connaissance de ces processus radiobiologiques permet de mettre en évidence des pistes thérapeutiques intéressantes, souvent complémentaires, qui aboutiront à une meilleure prise en charge clinique.

La PR est une inflammation, locale ou diffuse, du parenchyme pulmonaire résultant des dommages à l'ADN cellulaire, du stress oxydatif, de la mort et de l'activation cellulaires, caractéristiques des effets des rayonnements ionisants. La mort et les activations cellulaires peuvent impliquer plusieurs types de cellules différents comme les pneumocytes de type I et II ainsi que les cellules endothéliales, les cellules du mésenchyme comme les fibroblastes ou les cellules musculaires lisses mais également différentes cellules immunitaires comme les neutrophiles, les lymphocytes ou les macrophages. Les mécanismes associés à la PR correspondent à une réponse pulmonaire aiguë aux rayonnements ionisants de type inflammatoire. La FPR quant à elle correspond à une réponse tardive aux rayonnements ionisants. Elle est la résultante de la destruction de l'épithélium pulmonaire, de l'activation du système vasculaire, d'une perpétuation de la réponse inflammatoire et de l'activation des cellules du mésenchyme comme les fibroblastes en réponse au relargage de multiples cytokines au niveau de la lésion. Avant de s'intéresser à la réponse spécifique du tissu pulmonaire, j'aborderai les grands principes de la radiobiologie.

1) Les 6Rs de la radiobiologie associée à l'hypofractionnement sévère

Le fractionnement de la dose permet d'utiliser une dose totale qui induira un contrôle tumoral satisfaisant, tout en la divisant en fractions supportables pour les tissus sains environnants afin de limiter les effets secondaires. En effet, le principe du fractionnement de la dose en radiothérapie se base sur la réponse différentielle des tissus sains et des tumeurs. L'atteinte du contrôle tumoral local après radiothérapie conventionnelle normo-fractionnée se base sur quatre phénomènes décrits par Withers en 1975, les 4Rs de la radiobiologie (253) : **R**éparation des dommages sublétaux ; **R**éoxygénation de la tumeur ; **R**edistribution dans le cycle cellulaire et **R**epopulation cellulaire. En 1989, un 5^{ème} R est ajouté par Steel *et al.* afin de représenter la **R**adiosensibilité intrinsèque (Figure 21) (254). Lors de l'utilisation de doses par fraction ablatives, il a été observé l'implication importante du compartiment immunitaire après irradiation (255). Ces observations ont permis l'émergence d'un 6^{ème} R, la **R**éactivation de l'immunité anti-tumorale (Figure 21) (256).

a) **Réparation des dommages sublétaux**

Les rayonnements ionisants génèrent des cassures simple- ou double-brin à l'ADN, et à la suite de cela les cellules mettent en place des mécanismes moléculaires pour réparer ces dommages. Les cassures double-brin sont celles qui sont principalement responsables de la mortalité cellulaire. Si les réparations ne permettent pas de passer les points de contrôles du cycle cellulaire, les cellules entrent en apoptose. Les cellules tumorales ont une capacité de réparation des dommages à l'ADN réduite par rapport aux tissus sains. Le fractionnement de la dose totale permet aux tissus sains de réparer les dommages de leur ADN entre chaque fraction, et de diminuer ainsi les atteintes tissulaires. Pour les protocoles de traitement par SBRT, une majorité des dommages sont directement létaux. Cependant, concernant les dommages sublétaux, la dose par fraction étant élevée, le temps d'irradiation pendant une séance est plus long. La réparation des dommages à l'ADN commence à se mettre en place pendant la délivrance du traitement, ce qui peut conduire à une perte d'effet biologique (257). D'ailleurs, lorsque le temps de délivrance d'une fraction d'irradiation dépasse 30 minutes, l'effet antitumoral pourrait diminuer de près de 10% (258).

b) **Redistribution dans le cycle cellulaire**

Toutes les phases du cycle cellulaire n'ont pas la même sensibilité aux rayonnements ionisants. Le cycle cellulaire comporte 4 phases : la phase G1, correspondant à la croissance cellulaire ; la phase S, correspondant à la réplication de l'ADN ; la phase G2, correspondant à la réplication des centrosomes ; et la phase M, correspondant à la mitose et à la séparation des cellules filles. Les phases les plus radiosensibles sont les phases M et G2 alors que la phase de réplication est plus radorésistante. Les dommages génétiques sont plus facilement accessibles à la machinerie de réparation pendant la phase S que pendant les autres phases du cycle car l'ADN est décondensé pour être répliqué. Etant données ces variations de radiosensibilité en fonction des phases du cycle, schématiquement les premières cellules qui vont mourir sont celles étant dans une phase sensible au moment de la première fraction. Les cellules survivantes sont celles qui étaient dans des phases de cycle moins sensibles. C'est le principe de la redistribution des cellules dans le cycle cellulaire (259). Les cellules tumorales restent peu de temps dans cette phase de synchronisation partielle après irradiation. C'est pourquoi la part de cellules tumorales ayant survécu à la première fraction d'irradiation va donc continuer sa progression dans le cycle cellulaire et être potentiellement dans une phase plus radiosensible du cycle lors de la fraction suivante. Cependant, cette pseudo synchronisation des cellules tumorales n'est pas observée avec l'utilisation de protocoles en hypofractionnement sévère. En effet, les fortes doses par fraction utilisées induisent la mort des cellules dans

la phase du cycle cellulaire dans laquelle elles se trouvent au moment de l'irradiation (260). Il n'y a donc pas de synchronisation partielle des cellules et donc pas de radiosensibilité induite pour la prochaine fraction. En ce qui concerne les tissus sains, ce mécanisme concerne principalement les tissus à réponse rapide et a peu d'influence sur les tissus à réponse tardive (261).

c) **Réoxygénation**

Les dommages à l'ADN induits par les rayonnements ionisants sont liés à la radiolyse de l'eau et la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La présence d'oxygène dans les tissus a une importance particulière dans les dommages radio-induits. Les tumeurs possèdent souvent un cœur hypoxique, qui est donc plus radio-résistant que les cellules périphériques bien oxygénées. Les cellules tumorales normoxiques meurent lors des premières fractions d'irradiation, laissant seulement les cellules du cœur hypoxique (259). Ce cœur tumoral hypoxique, jusque-là inaccessible à l'oxygène, est disponible à la néovascularisation. La couche extérieure devient alors normoxique et radiosensible au moment de la fraction d'irradiation suivante. Ce principe de réoxygénation permet d'augmenter l'efficacité thérapeutique et soutient l'utilisation d'un traitement fractionné par rapport à un traitement en dose unique. Cependant, après hypofractionnement sévère, il est plutôt observé l'entrée en sénescence et l'apoptose des cellules irradiées (257). De plus, à des doses par fraction supérieures à 10 Gy, l'apoptose des cellules endothéliales via la voie des céramides entraîne des dommages vasculaires tumoraux importants, compromettant la néovascularisation nécessaire à l'exploitation de la réoxygénation tumorale (262). La réoxygénation tumorale prend du temps et les temps de traitement raccourcis en SBRT vont à l'encontre du processus mais la mort cellulaire rapide induite par les fortes doses par fraction permet de diminuer de manière importante la taille de la tumeur et ainsi permettre une diffusion passive de l'oxygène dans les cellules tumorales restantes (257).

d) **Repopulation**

Après irradiation, les cellules tumorales clonogènes survivantes aux dommages à l'ADN augmentent leur taux de prolifération, c'est ce qu'on appelle la repopulation des cellules tumorales. Cette repopulation cellulaire existe également dans les tissus sains à partir des cellules progénitrices survivantes. Plus le temps de traitement est long, plus la tumeur a l'opportunité de réaliser cette repopulation cellulaire et donc d'être plus résistante au traitement. Il faudra une dose totale plus importante pour atteindre le contrôle tumoral souhaité. A l'inverse, pour les tissus sains, plus le temps de traitement est long et étalé dans le temps, plus le tissu pourra réaliser sa repopulation cellulaire et donc être moins impacté par les rayonnements ionisants.

C'est pour cela que la repopulation cellulaire n'est pas décrite pour le moment en SBRT, les temps de traitement étant plus courts qu'en radiothérapie conventionnelle. Lors des radiothérapies normo-fractionnées, la repopulation cellulaire n'est observée qu'à partir de deux ou trois semaines après le début du traitement (260). La repopulation cellulaire après irradiation augmente donc la radiorésistance tumorale.

e) **Radiosensibilité intrinsèque**

La radiosensibilité cellulaire est la probabilité de perte de la capacité de prolifération (ou mort clonogénique) par unité de dose d'une cellule soumise à un rayonnement. Cette radiosensibilité cellulaire est calculée en fonction des courbes de survie *in vitro* (263). La radiosensibilité cellulaire est influencée par le type de rayonnement, le taux de prolifération des cellules, ou le type tumoral. Elle peut également être tissulaire, observée *in vivo*, dépendante de nombreux facteurs comme l'organisation macroscopique des organes et des compartiments fonctionnels. La radiosensibilité influence l'efficacité du fractionnement et donc du traitement, cependant la radiosensibilité intrinsèque des tumeurs n'a pas été décrite pour les fortes doses par fraction.

f) **Réactivation immunitaire**

Le microenvironnement tumoral est composé entre autres de cellules immunitaires. En radiothérapie conventionnelle, ce microenvironnement est connu pour être principalement immunosuppresseur avec notamment la mort des lymphocytes et la présence de cellules immunosuppressives comme les TAM (*Tumor Associated Macrophages*) (264-266). La lymphopénie observée après irradiation empêche la mobilisation des lymphocytes contre la tumeur. Au contraire, l'utilisation de fortes doses par fraction entraîne une réaction immunitaire antitumorale. En effet, l'irradiation à forte dose génère de la mort cellulaire tumorale très significative qui induit le relargage de cytokines, chimiokines et d'antigènes spécifiques. L'ensemble représente le *Damage-Associated Molecular Pattern* (DAMP). Le DAMP va induire la maturation des cellules dendritiques, via la voie STING, qui vont pouvoir activer les lymphocytes T cytotoxiques présents dans les ganglions lymphatiques proches de la tumeur, afin qu'ils réagissent aux antigènes tumoraux (Figure 22) (267-269). Un fois activés, les lymphocytes T cytotoxiques vont pouvoir s'infiltrer sur les sites tumoraux et exercer leur activité antitumorale. Cet effet anti-tumoral est d'ailleurs observé sur le champ d'irradiation mais également sur les sites métastatiques à distance (Figure 22) (270-272). C'est l'effet abscopal, rare mais observé en clinique et reproduit en préclinique (273). D'ailleurs, l'effet abscopal radio-induit observé dans un modèle de mélanome injecté chez la souris sauvage disparaît en l'absence de lymphocytes T chez la souris nude, soit après irradiation seule ou en combinaison avec de l'immunothérapie

(272). L'effet disparaît également lorsque la dose est fractionnée. Aujourd'hui, l'utilisation de fortes doses par fraction a permis d'augmenter la BED et ainsi d'augmenter le contrôle tumoral. D'ailleurs, une méta-analyse d'études précliniques a montré que la probabilité d'observer l'effet abscopal était de 50% lorsque le protocole d'irradiation dépassait une BED de 60 Gy (274). Pourtant, chez des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées bilatérales, Vanpouille-box *et al.* observe que l'irradiation à de fortes doses (avec des BED₁₀ supérieures à 60 Gy) combinée à l'utilisation d'anticorps anti-CTLA4, n'induisait pas l'effet abscopal, contrairement à un protocole de fractionnement avec une BED₁₀ inférieure à 60 Gy (3 x 8 Gy) (275). Ils ont montré que l'observation de l'effet abscopal était corrélée négativement à l'accumulation d'une exonucléase *Three-Prime Repair Exonuclease 1* (Trex1). En effet, Trex1 dégrade l'ADN fragmentaire accumulé dans le cytoplasme des cellules irradiées, et empêche son relargage. Trex1 prive donc l'environnement tumoral d'antigènes spécifiques qui auraient pu être utiles à l'activation des lymphocytes cytotoxiques et génère une forme de radiorésistance (275). L'expression de Trex 1 augmente progressivement en fonction de la dose d'irradiation. L'objectif selon cette étude serait d'utiliser des doses répétées n'induisant pas Trex1 pour favoriser la mise en place de l'immunité anti-tumorale. Un protocole d'hypofractionnement doit être optimal pour la mise en place d'une réponse antitumorale efficace. Une étude préclinique sur un modèle de cellules tumorales coliques injectées en sous-cutané chez la souris a d'ailleurs comparé trois protocoles de fractionnement avec la même BED₁₀ : 1 x 16,4 Gy, 3 x 8 Gy et 18 x 2 Gy (276). En l'absence d'inhibiteur de point de contrôle immunitaire, 3 x 8 Gy et 1 x 16,4 Gy ont induit une forte réponse lymphoïde (cellules T régulatrices et cellules T CD8+), une semaine après le début de la radiothérapie alors que le fractionnement de 18 x 2 Gy a induit une augmentation persistante des cellules myéloïdes, 2 semaines après le début de la radiothérapie. En association avec un inhibiteur de point de contrôle immunitaire, le protocole 3 x 8 Gy est le plus efficace (276).

Afin de d'induire une réponse immunitaire antitumorale qui pourrait potentialiser l'effet de l'hypofractionnement, l'association à des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire semble être une bonne piste thérapeutique. Par exemple, PD-1 (*Programmed Cell Death 1*) est présent à la surface des lymphocytes T. L'interaction de PD-1 avec PD-L1 présent sur les cellules tumorales empêche l'activation des LT et participe à l'échappement immunitaire de la tumeur. Ainsi, inhiber ces points de contrôle immunitaire (liaison PD-1/PD-L1) permettrait d'augmenter l'activation des lymphocytes T cytotoxiques et de favoriser une immunité anti-tumorale. Le blocage de l'axe PD-1/PD-L1 par exemple (des recherches sont axées sur d'autres points de contrôle immunitaire), associé à la radiothérapie fait donc l'objet de nombreux essais cliniques et précliniques afin de déterminer la combinaison optimale permettant de

généraliser la réactivation immunitaire (Figure 22) (256). D'autres stratégies thérapeutiques associées à la radiothérapie pourraient être envisagées comme l'utilisation d'agonistes de STING tels que cGAMP. Deng *et al.* a montré que la voie DNA-cGAS-STING contrôle l'immunité antitumorale et que l'administration de cGAMP en combinaison avec l'irradiation réduit la radio-résistance tumorale et potentialise la réponse immunitaire antitumorale de l'hôte. (269). Des antagonistes de Trex pourraient également être une piste thérapeutique intéressante associée à la radiothérapie.

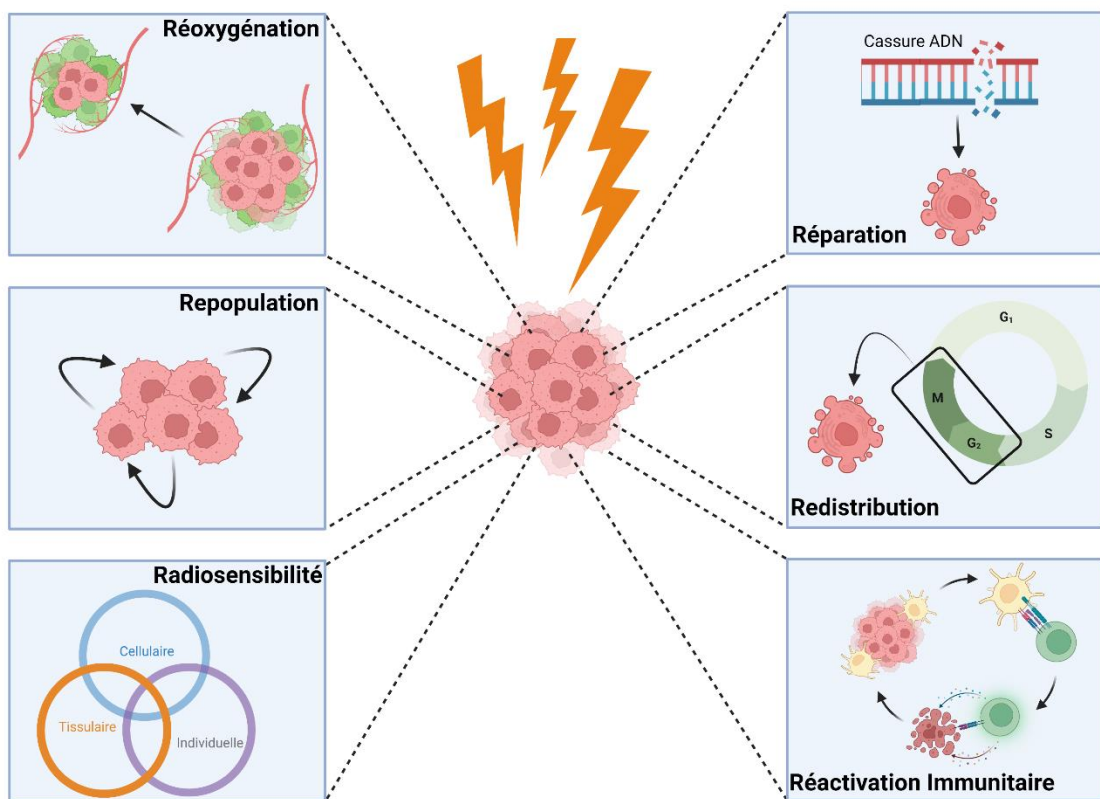


Figure 21: Les 6 R de la radiobiologie

g) Effets vasculaires de l'hypofractionnement sévère

Bien que l'ajout de ce 6^{ème} R permette de prendre en compte certaines spécificités de la radiobiologie des fortes doses par fraction, l'impact de l'hypofractionnement sévère sur le compartiment vasculaire n'est pas décrit. Après avoir mis en culture des cellules tumorales issues de fibrosarcome implantées chez des souris C3H irradiées de 15 à 30 Gy en dose unique, Song *et al.* ont vu la survie cellulaire tumorale décroître progressivement jusqu'à 5 jours après irradiation. Pour eux, cet effet de l'irradiation serait lié à la diminution de la perfusion sanguine et à l'augmentation de l'hypoxie en réponse aux fortes doses d'irradiation (Figure 22) (277). La toxicité indirecte endothéliale de la radiothérapie stéréotaxique pourrait expliquer que le contrôle tumoral à ces doses soit meilleur que celui attendu via le modèle linéaire quadratique (278). D'autre part, la micro-vascularisation tumorale est fragile à différents niveaux ce qui la rend plus vulnérable au stress oxydatif présent après irradiation. En effet, la membrane basale sur laquelle reposent les cellules endothéliales tumorales est fragmentée et instable. De plus, les cellules endothéliales tumorales possèdent une radiosensibilité plus importante que les cellules endothéliales des tissus sains (279). Les cellules endothéliales possèdent une grande quantité de sphingomyélinase acide (aSMase), utile à la production de céramide, un lipide pro-apoptotique (262). L'irradiation génère un stress cellulaire activant l'aSMase qui va permettre l'augmentation rapide de la production de céramides. D'ailleurs, les cellules endothéliales des souris aSMase^{-/-} sont très radiorésistantes. L'irradiation à 15 Gy d'un fibrosarcome implanté dans ces souris ne permet pas la réduction du volume tumoral, alors que c'est le cas lorsqu'on utilise des souris aSMase^{+/+} (262). L'implication de la voie des céramides a également été observée dans l'apoptose cellules endothéliales du tissu sain, notamment dans l'intestin après irradiation corps entier de souris à 15 Gy (280). L'apoptose des cellules endothéliales intestinales après irradiation à 15 Gy semble d'ailleurs être l'élément déclencheur du syndrome gastro-intestinal, celle-ci intervenant en amont de l'apoptose des cellules épithéliales. La radiosensibilité des cellules endothéliales serait donc à l'origine des dommages vasculaires tumoraux après irradiation, mais également de ceux des tissus sains environnants. Cependant, il est important de noter que la radiosensibilité des cellules endothéliales ne semble avoir d'impact que dans la réponse tumorale qu'à des doses d'irradiation induisant des lésions vasculaires significatives. Par conséquent, il est probable que cette toxicité endothéliale soit relativement insignifiante dans la radiothérapie fractionnée conventionnelle utilisant des doses par fraction allant de 1,5 à 2 Gy (281).

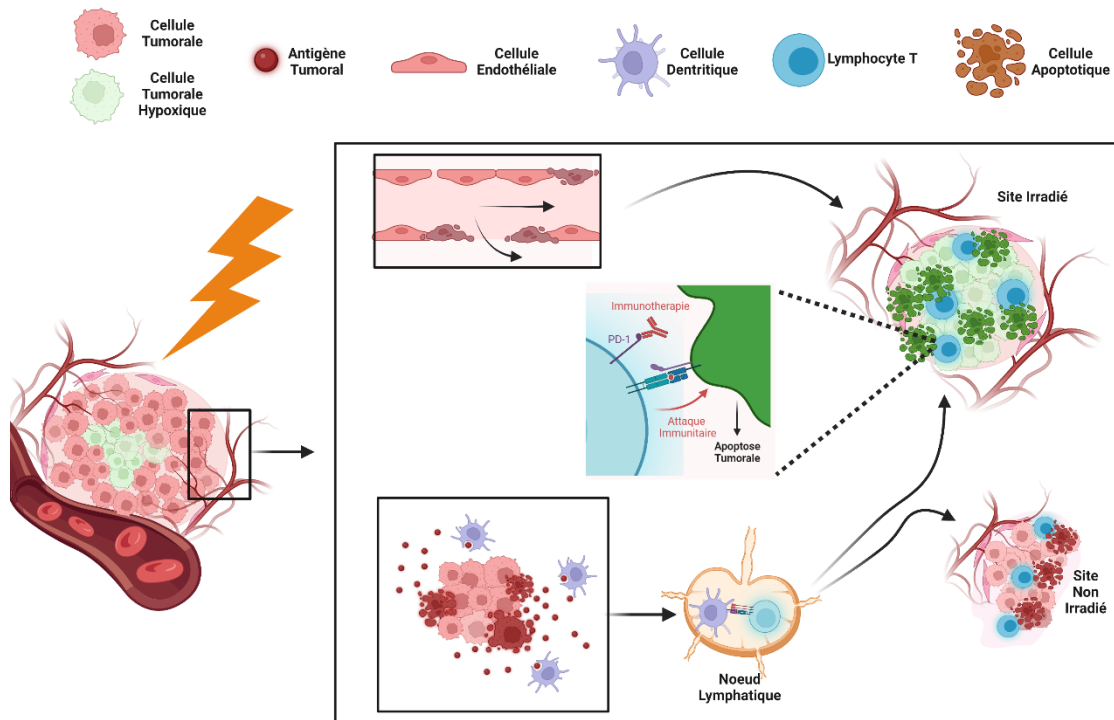


Figure 22 : Effets radiobiologiques des fortes doses par fraction sur les tumeurs

L'irradiation à forte dose par fraction induit la perméabilité vasculaire, l'hypoxie tumorale et la mort indirecte des cellules tumorales. Cette irradiation induit également de la mort cellulaire immunogène, via la production d'antigènes tumoraux liée à la mort directe des cellules tumorales. Ces antigènes tumoraux sont reconnus par les cellules dendritiques, et autres cellules présentatrices d'antigène, et vont activer les lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques à proximité. Ce phénomène induit un effet antitumoral sur les sites irradiés et non-irradiés.

Bien que permettant d'aborder les bases des effets des rayonnements, les 6 R de la radiobiologie sont à l'origine basés sur l'effet de la radiothérapie sur les tumeurs et s'appliquent mal aux tissus sains. Les radiopathologies pulmonaires sont caractérisées par des effets spécifiques des rayonnements sur les poumons qui sont détaillés dans les paragraphes suivants.

2) Réponse pulmonaire aux rayonnements ionisants

Comme détaillé dans le chapitre 4, les effets secondaires de la radiothérapie stéréotaxique sont la pneumopathie radique et la fibrose pulmonaire radio-induite. La PR se découpe en plusieurs phases (282) :

- Une phase précoce, qui apparaît dans les premiers mois après irradiation, et qui se caractérise par une accumulation de sécrétions dans les voies aériennes et un œdème interstitiel.
- Une phase exsudative, apparaissant entre 3 semaines et 6 mois après irradiation, caractérisée par un exsudat alvéolaire riche en fibrine, un œdème interstitiel et une accumulation de macrophages alvéolaires
- La phase tardive ou fibrotique, n'apparaissant qu'à partir de 6 mois après irradiation, se caractérisant par une perte capillaire, une désorganisation du parenchyme pulmonaire et un dépôt important de collagènes.

La réponse pulmonaire aux rayonnements ionisants s'articule autour de la réponse du compartiment endothélial, de celle du compartiment épithélial, de l'activation du mésenchyme et de la réponse inflammatoire associée.

a) Dommages induits à l'endothélium

Après irradiation, le stress oxydatif radio-induit entraîne la mort ou l'activation de nombreux types cellulaires. L'apoptose des cellules endothéliales du tissu sain est observée chez la souris après irradiation en thorax entier ou dans des modèles de SBRT pulmonaire (283). Cette perte des cellules endothéliales après irradiation entraîne un collapsus des alvéoles ainsi qu'une thrombose des capillaires associée à une augmentation de leur perméabilité (284, 285) .

Un autre phénomène observé après irradiation est la sénescence cellulaire. La sénescence cellulaire est un état de différenciation avancée, dans lequel les cellules sont bloquées de manière irréversible dans une phase du cycle cellulaire, majoritairement en phase G1. Les cellules sénescents ont un phénotype sécrétoire typique appelé le *senescent associated secretory phenotype* (SASP). Il existe différents types de sénescence mais dans le cadre de la réponse des tissus aux rayonnements ionisants, c'est la sénescence due au stress qui est observée. En effet, la sénescence des différentes cellules pulmonaires est directement liée à la production de ROS générés par l'irradiation. Le SASP contient de nombreuses cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, protéases et composants de la matrice extra cellulaire, appelé le SMS (Senescence-Messaging Secretome). Le SASP permet notamment le recrutement et l'activation des cellules du système immunitaire qui doit conduire à l'élimination des cellules sénescents. Cependant, le SASP contribue par ses différents composants à la mise en place de l'inflammation chronique, du stress oxydatif chronique et de la

dérégulation de l'équilibre synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire, impliqués dans la pathogénèse de la fibrose radio-induite. Tous les compartiments cellulaires des poumons semblent impactés par la sénescence. Au laboratoire, l'irradiation focale d'un petit volume pulmonaire chez la souris à 90 Gy en dose unique a permis d'observer l'entrée en sénescence de cellules endothéliales mais également de pneumocytes de type II et de macrophages de 4 à 16 mois post-irradiation (286). L'irradiation des cellules endothéliales d'artère pulmonaire avec des doses comprises entre 2 et 50 Gy entraîne une sénescence accélérée mais des niveaux limités d'apoptose et de nécrose (287). Les rayonnements ionisants peuvent également augmenter les niveaux de TNF α , pouvant induire des maladies inflammatoires en modulant la sénescence endothéliale (288).

Outre l'apoptose et la sénescence, l'irradiation peut également entraîner une activation endothéliale. Ce phénomène implique l'apparition d'un phénotype pro-inflammatoire caractérisé par l'expression de chimiokines, de cytokines et de molécules d'adhésion qui facilitent le recrutement et l'attachement des leucocytes circulants sur la paroi vasculaire (289). La principale cause d'inflammation après irradiation est l'activation de la voie NF κ B par le stress oxydatif, les cassures double-brin ou la production de DAMPs. Il y a libération de cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , TNF α , TGF- β , IL-1, IL-6, IL-8 et CCL2) et augmentation de l'expression de molécules d'adhésion cellulaire, telles que PECAM-1, ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine et P-sélectine, par les cellules endothéliales irradiées (290). L'effet de l'irradiation sur les cellules endothéliales induit également la diminution du tonus vasculaire et une altération de la régulation de la coagulation avec une diminution de la thrombomoduline, une augmentation de la thrombine, et du facteur de Von Willebrand circulant (290).

De plus, la transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT, *Endothelial-to-Mesenchymal Transition*) des cellules endothéliales pulmonaires après irradiation a été observée. Ce phénomène décrit le changement phénotypique des cellules endothéliales vers un phénotype mésenchymateux, leur permettant ainsi de participer au processus fibreux en acquérant des caractéristiques fibroblastiques. L'EndoMT a été observée au laboratoire après irradiation du thorax entier à une dose unique de 17 Gy chez la souris(291). Après irradiation stéréotaxique à 20, 50 et 90 Gy en dose unique, des études ont démontré que l'EndoMT était la conséquence de l'hypoxie et dépendrait plus spécifiquement de l'expression du facteur de transcription Hypoxia Induced Factor 1 α (HIF-1 α) via la signalisation TGF- β R1/Smad (292). Cependant, dans le laboratoire, la déplétion de HIF-1 α spécifiquement dans les cellules endothéliales du poumon n'a pas permis l'amélioration du phénotype fibreux des souris après irradiation stéréotaxique (93).

b) Dommages épithéliaux

Le premier dommage épithélial après irradiation pulmonaire est l'apoptose des cellules épithéliales à tous les niveaux de l'arbre bronchique. En effet, bien qu'il y ait peu d'information sur la réponse de l'épithélium bronchiolique après irradiation, Bertho *et al.* ont observé une diminution significative du nombre de cellules club pour des doses allant de 40 à 120 Gy à 1 et 6 mois après irradiation stéréotaxique, sans démontrer que ces pertes cellulaires passent par un processus apoptotique (293). L'apoptose épithéliale a été observée au niveau de l'épithélium alvéolaire. Chez la souris, Almeida *et al.* ont observé l'apoptose des pneumocytes de type I s'accompagnant d'une prolifération réactionnelle des pneumocytes de type II jusqu'à 5 mois après une irradiation thorax entier de 24 Gy par fractions de 6 Gy (294). Cette prolifération réactionnelle a également été observée au laboratoire après irradiation stéréotaxique chez la souris (293). Les pneumocytes de type II amorcent leur prolifération lorsqu'une lésion atteint le parenchyme pulmonaire.

Au laboratoire, un modèle d'irradiation stéréotaxique pulmonaire à 90 Gy en dose unique chez la souris a permis d'observer l'entrée en sénescence des pneumocytes de type II, 4 à 16 mois après irradiation (286). C'est également le cas après irradiation en thorax entier à 17,5 Gy (295). La diminution de la population des pneumocytes de type II au même moment suggère que la sénescence contribuerait à la perte observée des pneumocytes de type II dans ce modèle. D'ailleurs, lorsqu'on bloque l'entrée en sénescence des pneumocytes de type II avec le diphenyleneiodonium, un inhibiteur de la voie de signalisation de p21 (acteur majeur de la sénescence), la fibrose pulmonaire radio-induite est diminuée chez des souris 16 semaines après irradiation (295). L'utilisation par une autre équipe de la molécule ABT-263, capable d'éliminer spécifiquement les pneumocytes de type II sénescents, grâce à deux injections réalisées 16 semaines après irradiation, a permis de reverser complètement le phénotype fibreux (296). L'ABT-263 présente une toxicité importante et ne peut donc pas pour le moment être utilisé comme traitement chez l'homme mais de telles stratégies thérapeutiques à base de molécules sénolytiques semblent prometteuses.

D'autre part, les cellules épithéliales sont capables d'entrer en transition épithélio-mésenchymateuse (EMT, *Epithelial-to-Mesenchymal Transition*), phénomène par lequel les cellules épithéliales basculent vers un phénotype mésenchymateux et participent au processus fibreux. En effet, il a été observé une diminution progressive, jusqu'à 5 mois après irradiation, des marqueurs de cellules épithéliales comme la E-cadhérine, en faveur de marqueurs de cellules mésenchymateuse activées, comme la vimentine. De plus, la colocalisation de α smooth muscle actin (α -SMA) et du surfactant protein C dans l'alvéole confirme la présence de l'EMT après irradiation pulmonaire de

souris au césium 137 (294). D'ailleurs, l'atténuation de l'EMT après irradiation de rats à 20 Gy en thorax entier, via l'utilisation d'un hydrogel dérivé de matrice extra-cellulaire, a permis de diminuer la fibrose pulmonaire radio-induite (297). Au laboratoire, l'EMT a également été observée chez la souris après irradiation du thorax entier à une dose unique de 17 Gy(291).

c) Activation du mésenchyme

Le SASP sécrété par les cellules en sénescence, et les diverses cytokines, chimiokines et agents solubles relargués par l'apoptose des cellules peuvent activer les fibroblastes pulmonaires. L'activation des fibroblastes en myofibroblastes est un axe majeur impliqué dans des radiopathologies pulmonaires. Le TGF- β joue un rôle central dans cette activation fibroblastique et est sécrété par de nombreux acteurs de la pathogenèse de la fibrose pulmonaire, y compris les macrophages. Les fibroblastes activés en myofibroblastes sous l'effet du TGF- β , vont synthétiser de manière excessive des composants de la matrice extra cellulaire : du collagène, de la fibronectine et des protéoglycanes, augmentant ainsi la rigidité et l'épaisseur du tissu (298). Les myofibroblastes sécrètent également le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), qui favorise la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse (299). Néanmoins, l'excès de collagène réduit la densité vasculaire au fil du temps, ce qui augmente la susceptibilité à l'ischémie des zones fibreuses. Le TGF- β est capable d'activer en myofibroblastes d'autres types cellulaires que les fibroblastes présents comme les cellules endothéliales ou épithéliales. En effet, il est impliqué dans les phénomènes d'EMT et d'EndoMT (300).

d) Réponse inflammatoire

L'irradiation pulmonaire, et ses conséquences sur la sénescence, l'apoptose et l'activation des types cellulaires résidents, déclenche le recrutement des cellules immunitaires dans les poumons. Les premières cellules immunitaires présentes sur le site de l'irradiation sont les neutrophiles (76). Les lymphocytes sont également impactés par l'irradiation pulmonaire. Dans les phases aiguë et inflammatoire de la pneumopathie radique, les lymphocytes possèdent un phénotype pro-inflammatoire, alors que dans les phases chronique et fibreuse, ils possèdent un phénotype anti-inflammatoire (301). La déplétion des lymphocytes T activés chez des souris induit une radiosensibilité augmentée après irradiation en hémithorax à 15 Gy (302). Les interactions des lymphocytes avec les macrophages pulmonaires présents à la lésion vont guider les phénotypes des macrophages. D'ailleurs, de plus en plus d'études mettent en lumière l'importance des macrophages dans les lésions pulmonaires radio-induites. Les macrophages sont l'un des types cellulaires les plus radio-résistants du corps humain grâce à leur production importante de manganèse superoxyde dismutase (MnSOD), un antioxydant puissant (303). Les macrophages se dessinent donc

comme une option thérapeutique prometteuse pour la prise en charge des radiopathologies pulmonaires. Dans la suite de ce chapitre, je détaillerai seulement le rôle des macrophages dans la réponse pulmonaire aux rayonnements ionisants.

3) Rôle des macrophages dans la réponse pulmonaire aux rayonnements ionisants

L'effet des rayonnements ionisants sur les macrophages serait une conséquence secondaire du relargage de chimioattractants dans le tissu, lié à l'apoptose et à la senescence des cellules irradiées (304). Pourtant, entre 2 et 3 semaines après irradiation en thorax entier chez la souris, il a tout de même été montré une déplétion des macrophages alvéolaires, et non des interstitiels (76, 305). Cela sous-entend tout de même un effet direct de l'irradiation sur les macrophages.

a) Effet des rayonnements ionisants sur les macrophages

L'effet direct de l'irradiation observé sur les macrophages semble se concentrer sur leur polarisation (76, 306, 307). En effet, après irradiation thorax entier chez la souris, les macrophages alvéolaires afficheraient un phénotype M2-like anti-inflammatoire et pro-fibrosant (Figure 24). De plus, CD73, une protéine présente à la surface de plusieurs types cellulaires pulmonaires dont les macrophages, est augmentée après irradiation en thorax entier. La perte de cette enzyme empêche l'accumulation de macrophages M2 et donc la formation d'amas de macrophages alvéolaires qui favorisent le développement de la fibrose (308). Les M1 expriment l'arginase 1 de manière importante, un marqueur classique de la polarisation M2-like (76). Lors de la phase aiguë, 24 heures après irradiation en thorax entier à 12 Gy, a contrario les macrophages pulmonaires voient augmenter l'expression du marqueur iNOS, marqueur classique de la polarisation M1-like (309). Des études montrent que les fortes doses d'irradiation engendrent une polarisation M2-like des TAM alors que les faibles doses induisent une polarisation M1-like (310, 311). C'est également le cas dans les tissus sains pulmonaires après irradiation. En termes de possibilités thérapeutiques associées aux macrophages M2 pro-fibrosants, des déplétions spécifiques ont été testées dans le cadre de la fibrose idiopathique pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris. L'utilisation d'une immunotoxine, le récepteur du folate- β afin de déléter spécifiquement les macrophages pro-fibrosants, a permis de réduire la sévérité de la fibrose pulmonaire (312). De plus, le chlorure de diphénylèneiodonium a permis d'inhiber la polarisation M2 des macrophages et de diminuer la fibrose pulmonaire induite par bléomycine chez la souris (313). La présence de macrophages M2 après irradiation suggère que cette stratégie thérapeutique pourrait être une piste intéressante contre les lésions radio-induites pulmonaires. Une autre stratégie est d'induire un basculement du phénotype

M2 (pro-fibrosant) vers un phénotype M1 des macrophages présents aux lésions pulmonaires (314). Par exemple, le peptide RP-832c cible spécifiquement les macrophages M2 via le CD206 et a permis d'orienter leur polarisation vers un phénotype M1, plus avantageux contre la fibrose. Cette repolarisation a permis d'atténuer la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris, à des niveaux comparables à ceux observés avec la Pirfenidone, un des seuls traitements disponibles actuellement contre la fibrose pulmonaire (315). Une fois de plus, cette stratégie mériterait d'être explorée dans le cadre du traitement de la fibrose radio-induite pulmonaire. D'ailleurs, cette stratégie est déjà envisagée dans le cadre des TAM afin d'augmenter de la radiosensibilité des tumeurs (303).

Les macrophages alvéolaires irradiés sont capables de sécréter du *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α), une cytokine pro-inflammatoire, en plus du TGF- β , qui induit la prolifération des fibroblastes (316, 317). Ces deux cytokines sont des acteurs clés de la fibrose radio-induite. Le TNF α est sécrété par les macrophages activés ainsi que par d'autres cellules immunitaires, et connu comme étant impliqué dans de nombreuses pathologies pulmonaires (318). D'une part, les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique présentent des niveaux sériques élevés de TNF α (319). D'autre part, les souris surexprimant cette cytokine au niveau des poumons développent une fibrose pulmonaire progressive (320). L'inhibition du récepteur pulmonaire au TNF α semble protéger les poumons des effets de l'irradiation fractionnée en thorax entier (2 Gy deux fois par jour, pour une dose totale de 40 Gy) (321). Ces résultats suggèrent que cette cytokine joue un rôle dans la réponse inflammatoire du poumon après irradiation. Cependant, le TNF α inhibe la production de collagène par les myofibroblastes (322). Ainsi, bloquer l'effet du TNF α pourrait, empêcher l'inhibition de la production de collagène, et aggraver le phénotype fibreux. C'est d'ailleurs ce qui a été observé lorsque cette stratégie a été essayée chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (323).

Le TGF- β est un puissant facteur de croissance pro-fibrosant impliqué dans l'inflammation et le remodelage des tissus. Ses cibles sont impliquées dans des processus cellulaires tels que la cicatrisation, la prolifération cellulaire, le contrôle du cycle cellulaire, l'EMT, l'EndoMT, l'apoptose, la différenciation cellulaire, le remodelage de la matrice, la modulation immunitaire et l'inflammation (324). En effet, une étude a montré que les macrophages M2 activés qui ont été recrutés dans les poumons des souris après une irradiation thoracique de 14 Gy sécrétaient des niveaux élevés de TGF- β . La neutralisation du TGF- β dans le milieu produit par des macrophages M2 *in vitro* atténue l'EMT des cellules épithéliales pulmonaires cultivées avec ce milieu. Cela

suggère que les macrophages M2 sécrétant du TGF- β jouent un rôle clé dans la régulation de l'EMT après irradiation (325).

Outre leur polarisation, il a été montré au laboratoire, mais également dans d'autres études, que les macrophages pouvaient adopter un phénotype sénescence après irradiation avec des modèles de SBRT ou d'irradiation hémi thoracique chez la souris (286, 326). En effet, l'impact de l'irradiation sur les macrophages est principalement étudié sous l'angle de la polarisation. Cependant, de nombreuses études sous-entendent l'importance d'autres paramètres dans l'implication des macrophages dans la pathogénèse de la fibrose pulmonaire radio-induite comme le métabolisme ou l'origine des macrophages.

b) Métabolisme des macrophages après irradiation

Comme déjà évoqué, l'irradiation induit un phénotype M2 pro-fibrosant des macrophages pulmonaires. Les macrophages M2 métabolisent la L-arginine en L-ornithine et L-proline grâce à l'arginase. Ce métabolisme a été montré comme favorisant la prolifération des fibroblastes et la formation de collagène, et soutient l'action pro-fibrosante des macrophages M2-like, dans un modèle murin de fibrose pulmonaire progressive utilisant des souris déficientes en IFN- γ R infectées avec le *γ -herpes virus* murin (327). Dans la réaction inflammatoire, les macrophages M2-like ont toujours été caractérisés comme étant présents afin d'éliminer les déchets cellulaires des cellules apoptotiques et nécrotiques (328). L'absorption de grandes quantités de lipoprotéines induit un dérèglement de l'équilibre du flux de lipoprotéines de faible densité (LDL) au sein des macrophages, qui deviennent des spumeux (Figure 23) (329). Les macrophages spumeux sont très décrits dans le cadre de l'athérosclérose. En effet, ils participent à la déstabilisation des plaques d'athérome en induisant une augmentation de la mort cellulaire (66). Les macrophages présentent à leur surface des récepteurs comme CD36 qui leur permettent de phagocyter les LDL (Figure 23). Comme les LDL contiennent du cholestérol, des triacylglycérides et des phospholipides, la plupart des phospholipides et des triacylglycérides sont métabolisés en cholestérol et seul le cholestérol est retenu dans le cytoplasme des macrophages sous une forme estérifiée (330). L'accumulation excessive de gouttelettes lipidiques/cholestérol libre dans les macrophages peut entraîner l'apoptose et la nécrose de ces macrophages. En effet, l'accumulation de lipides dans d'autres types cellulaires que les adipocytes nuit au métabolisme normal des cellules et compromet la viabilité cellulaire. La mort des macrophages spumeux libère des substances toxiques et favorise l'expression de gènes inflammatoires, la production de ROS et le recrutement de cellules inflammatoires (Figure 23) (331). Les macrophages spumeux alimenteraient la réaction inflammatoire de manière chronique à la fois par leur présence et à la suite de leur mort.

Les macrophages spumeux sont caractéristiques de la réponse pulmonaire à l'irradiation. Chez la souris, après une irradiation du thorax entier à 12 et 20 Gy, de grands macrophages spumeux et des cellules multinucléées sont observés dans les lavages broncho-alvéolaires trois semaines après irradiation, disparaissent à quatre mois et réapparaissent six mois après irradiation (332). De plus, au laboratoire, des macrophages spumeux sont observés après irradiation stéréotaxique à 90 Gy (Figure 24). Ces macrophages spumeux sont organisés en clusters autour de la lésion fibreuse (93). De nombreuses études sur l'athérosclérose montrent que la lipotoxicité de ces macrophages spumeux est liée à l'altération du métabolisme des lipides et à un environnement inflammatoire important (333). La présence des macrophages spumeux dans les poumons après irradiation serait liée à la perturbation du métabolisme des lipides. Cependant, les mécanismes par lesquels l'irradiation modifierait le métabolisme lipidique ne sont pas clairs. Une piste serait l'augmentation du catabolisme du glucose après irradiation qui fournirait des niveaux importants de glycérophosphate, un précurseur lipidique (334). D'autres pistes seraient des altérations dans l'équilibre entre l'absorption du cholestérol et son relargage par les macrophages (330). Ces données supposent que la présence de macrophages spumeux après irradiation pourrait être une piste thérapeutique intéressante (335). En effet, dans d'autres modèles de fibrose induite chez la souris (bléomycine, moutarde azotée), des stratégies contre les macrophages spumeux ont permis de réduire la sévérité de la fibrose pulmonaire (336-338).

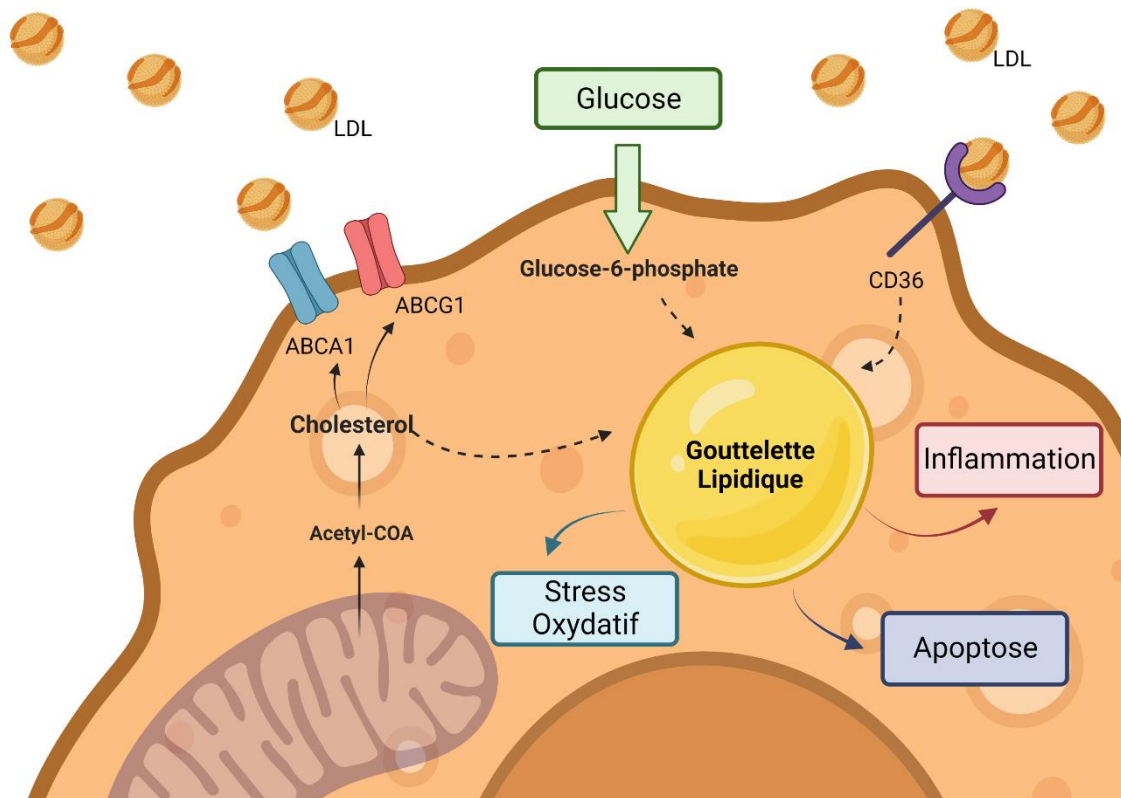


Figure 23 :Macrophage spumeux et précurseurs de la gouttelette lipidique

La gouttelette lipidique observée dans les macrophages spumeux est issue de plusieurs précurseurs. Les récepteurs CD36 présents à la surface des macrophages induisent l'intégration de LDL participant à l'accumulation lipidique dans le cytoplasme. Le glucose-6-phosphate via la voie de biosynthèse du cholestérol participe également à l'accumulation lipidique dans le cytoplasme. Le cholestérol estérifié dans le cytoplasme est relargué via les canaux ABCA1 et ABCG1. Dans les macrophages spumeux, cette voie de relargage du cholestérol semble altérée et le cholestérol estérifié présent dans le cytoplasme participe à l'accumulation lipidique. Cette gouttelette lipidique induit un environnement inflammatoire favorisant l'apoptose et le stress oxydatif.

c) Origine des macrophages présents après irradiation pulmonaire

L'origine des macrophages pourrait être aussi importante que leur polarisation. En effet, les macrophages pulmonaires, qu'ils soient recrutés ou résidents présentent généralement un phénotype M2-like après irradiation mais il semblerait que seule la déplétion spécifique des macrophages interstitiels, via un anticorps anti-CSFR1, permette d'améliorer la fibrose radio-induite chez la souris après irradiation du thorax entier (76). De plus, Groves *et al.* ont montré l'importance de l'axe CCR2/CCL2, et donc des macrophages recrutés, dans les lésions pulmonaires induites par irradiation en thorax entier chez la souris (Figure 24) (252). Dans le cadre du traitement de la fibrose idiopathique pulmonaire, il a été testé par un essai clinique de phase II, randomisé, en double aveugle, contrôlé par placebo, le Carlumab : un anticorps bloquant CCL2 et le recrutement monocyttaire associé (339). Cependant sa toxicité a suspendu l'essai. En effet, il faut garder en tête que la déplétion non spécifique des macrophages recrutés pourrait entraîner des conséquences sur l'ensemble du processus inflammatoire et donc pourrait être délétère. Le GM-CSF, une cytokine impliquée dans la différenciation des monocytes en macrophages et la prolifération des macrophages localement, pourrait, quant à lui, atténuer la fibrose radio-induite chez des souris irradiées en thorax entier à 16 Gy. Il aurait un impact sur l'EMT en diminuant les taux de TGF- β et de TNF α (340). Finalement, pour le moment le consensus serait qu'après irradiation les macrophages recrutés seraient les acteurs majeurs de la réponse pulmonaire aux rayonnements, et non les macrophages résidents.

Cependant, la plupart des études sont réalisées avec des modèles d'irradiation en thorax entier, plus éloignés des volumes cliniques que les modèles d'irradiation stéréotaxique que nous utilisons au laboratoire. L'irradiation focale permettant d'épargner de nombreuses cellules saines, les mécanismes impliqués dans la réponse des macrophages aux rayonnements pourrait être différents de ceux observés après irradiation en thorax entier. La caractérisation de ces macrophages après irradiation stéréotaxique est l'objet de cette thèse.

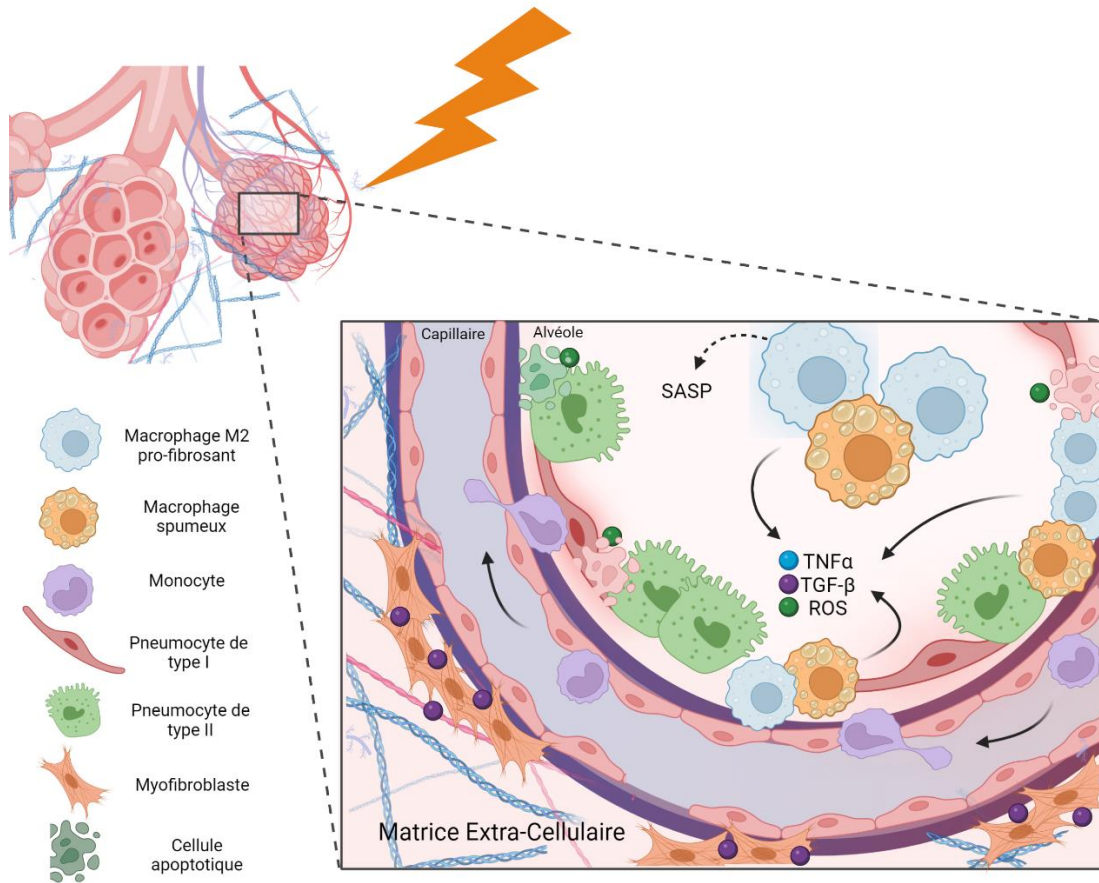


Figure 24 : Implication des macrophages dans la fibrose radio-induite pulmonaire

Les macrophages issus de la circulation via la différenciation monocytaire, qu'ils soient alvéolaires ou interstitiels, présentent un phénotype M2-like pro-fibrosant. Ils sont capables de sécréter du TNF α et du TGF- β . Le TGF- β est impliqué dans l'activation des cellules du mésenchyme (fibroblastes), stimulant la sécrétion de matrice extra-cellulaire. La présence de macrophages spumeux est également observée. Les ROS produits par les macrophages spumeux sont responsables de l'apoptose de différents types cellulaires comme les pneumocytes de type I. En réponse à cette perte des pneumocytes de type I, on observe une prolifération réactionnelle des pneumocytes de type II afin de régénérer l'épithélium alvéolaire.

Problématique et Objectifs

La radiothérapie stéréotaxique est une alternative thérapeutique pour les patients inopérables atteints de cancer bronchique non à petites cellules de stade précoce. En effet, la chirurgie reste l'option privilégiée, mais il a été largement prouvé que la radiothérapie stéréotaxique était plus efficace que la radiothérapie conventionnelle pour ce type de cancer pulmonaire. La précision balistique de la radiothérapie stéréotaxique et l'organisation macroscopique du poumon permettent l'utilisation de très fortes doses par fraction induisant un meilleur contrôle tumoral. Pour autant, les poumons sains environnant la tumeur reçoivent également une dose non négligeable qui induit des pneumopathies radiques précoces et des fibroses pulmonaires radio-induites. L'effet des rayonnements ionisants sur les tissus sains pulmonaires, largement étudié en pré-clinique, se caractérise par l'apoptose, la sénescence ou l'activation des pneumocytes de type I/II et des cellules endothéliales. Ces modifications cellulaires entraînent le recrutement de nombreuses cellules immunitaires sur le site irradié, dont les neutrophiles, les lymphocytes et les macrophages. L'inflammation chronique induit un déséquilibre de l'homéostasie tissulaire favorisant l'activation des fibroblastes en myofibroblastes, le dépôt de matrice extracellulaire et la fibrose irréversible des tissus.

Les macrophages représentent la première ligne de défense pulmonaire et il a été démontré qu'ils participent à la pathogenèse de nombreuses pathologies pulmonaires chroniques. Les macrophages pulmonaires sont une population hétérogène dont les caractéristiques et les rôles dépendent de leur localisation dans le tissu pulmonaire (alvéolaire ou interstitiel) et de leur état d'activation pro- ou anti-inflammatoire, dépendant de l'environnement tissulaire dans lequel ils se trouvent.

Il a été observé un nombre élevé de macrophages dans les lésions pulmonaires radio-induites, à la fois dans des échantillons humains après radiothérapie et dans des modèles murins d'irradiation en thorax entier, ce qui suggère leur implication dans la réponse des poumons aux rayonnements ionisants. Après irradiation en thorax entier chez la souris, il a été démontré que l'infiltrat macrophagique observé était issu de la différenciation à partir des monocytes circulants, recrutés via le récepteur CCR2 présent à leur surface.

Les modèles précliniques d'irradiation de l'ensemble du thorax ont permis de décrypter de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement des lésions radiques pulmonaires, et d'appréhender en particulier le rôle des différentes sous-populations macrophagiques dans ces processus physiopathologiques radio-induits. Néanmoins, le volume pulmonaire irradié a une grande importance dans la réponse des tissus pulmonaires aux rayonnements ionisants. L'implémentation des modèles précliniques en parallèle avec les modifications des pratiques en radiothérapie est essentielle pour le futur de la

radiobiologie. La disponibilité du SARRP au laboratoire nous permet d'irradier des petits volumes chez la souris, et ainsi de nous rapprocher des volumes relatifs irradiés cliniquement. Au laboratoire, des clusters de macrophages ont été observés autour de la lésion induite par irradiation d'un petit volume pulmonaire chez la souris. Les mécanismes impliqués dans la réponse pulmonaire aux rayonnements ionisants suite à l'exposition de petits volumes pourraient différer de ceux démontrés avec l'utilisation de modèles précliniques d'irradiation en thorax entier ou en hémithorax.

L'objectif de ces travaux de thèse a donc été de caractériser les sous-populations macrophagiques présentes à la lésion pulmonaire induite par irradiation stéréotaxique chez la souris, de 3 jours à 12 mois post-irradiation. Nous avons utilisé un modèle d'exposition de 4% du volume pulmonaire total à une dose unique générant une fibrose progressive (60 Gy) et à une dose unique générant une fibrose rapide (80 Gy). Pour cela, la caractérisation des phénotypes macrophagiques au cours du développement lésionnel a été effectuée par cytométrie en flux spectrale ainsi que par analyse transcriptomique sur cellule unique. Afin de comprendre l'implication du recrutement monocytaire via CCR2 dans le développement des lésions pulmonaires, nous avons également utilisé des souris déficientes en CCR2. Pour décrire la lésion chez les souris sauvages et les souris déficientes en CCR2, nous avons réalisé des analyses histologiques et des analyses d'images scanner du thorax. Enfin, pour interroger l'origine des macrophages présents à la lésion pulmonaire induite par irradiation stéréotaxique, nous avons réalisé d'une part des expériences de parabiose, afin de questionner le recrutement monocytaire, et d'autre part des expériences d'injection de BrdU, afin de questionner la prolifération des macrophages *in situ*.

Résultats

Evidence of alveolar macrophage metabolic shift following SBRT-induced lung fibrosis in mice.

Sarah Braga-Cohen¹, Jérémy Lavigne¹, Morgane Dos Santos², Georges Tarlet¹, Valérie Buard¹, Jan Baijer⁴, Olivier Guipaud¹, Vincent Paget¹, Eric Deutsch^{5,6}, Mohamed Amine Benadjaoud³, Michele Mondini⁵, Fabien Milliat¹ and Agnès François^{1*}.

¹Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-SANTE/SERAMED/LRMed, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France.

²Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-SANTE/SERAMED/LRacc, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France.

³Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-SANTE/SERAMED, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France.

⁴Plateforme de cytométrie, UMR « Stabilité Génétique, Cellules souches et Radiations », CEA-INSERM-Universités de Paris et Paris-Sud, CEA-DRF/JACOB/iRCM/UMRE008-U1274, BP6 92265 Fontenay-aux-Roses Cedex, France.

⁵INSERM U1030, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, 94 800 Villejuif, France.

⁶Département d'Oncologie-Radiothérapie, Gustave Roussy, 94 800 Villejuif, France.

Cet article est soumis dans Nature Communications.

ABSTRACT

Radiation-induced pneumopathy and lung fibrosis are the main dose-limiting factors in cases of chest radiation therapy. Macrophage infiltration is frequently observed in irradiated lung tissues and may participate in lung damage development. We used an accurate SBRT preclinical model irradiating around 4% of the mouse lung to single doses of 60 Gy or 80 Gy, generating progressive and rapid fibrosis, respectively. Macrophage sub-populations were followed by immuno-histology and spectral flow cytometry from 3 days to 12 months post-exposure. Single cell RNA-seq analyses were performed 1 and 6 months post-exposure. We identified recruited alveolar and interstitial macrophages invading the irradiated area. Recruitment abrogation using CCR2 KO mice had no impact on lung damage progression and severity, as revealed by microCT imaging and histological and spectral flow cytometry studies, suggesting a CCR2-independent recruitment pathway. We finally identified a population of *in situ* proliferating alveolar macrophages, possibly experiencing a shift from fatty acid toward cholesterol biosynthesis metabolism, representing a potentially interesting trail in the deciphering of radiation-induced lung damage processes. Our study brings new possible clues to the understanding of macrophage implication in radiation-induced lung damage following exposure of small volumes of healthy lung, which may differ from what has been already demonstrated in large field models. Metabolic shift of macrophages represents an interesting area for exploration in future studies and may offer new therapeutic windows to limit radiation-induced damage to the lung.

Keywords: Lung, radiation, stereotactic body radiation therapy, macrophage, fibrosis, mouse

INTRODUCTION

Ionizing radiation was used against cancer only a few months after its discovery. Nowadays, more than half of all cancer patients undergo radiation therapy (RT) during their disease. Increases in RT device accuracy and progress in tumor imaging and targeting allowed a sharp reduction in the doses received by surrounding normal tissues. However, RT-associated acute and chronic side effects are still of concern, especially given the increasing number of cancer survivors who, although free of disease, must face up to some quality-of-life threatening sequelae.

Lung toxicity is of concern for all thoracic malignancy RTs. Radiation-induced lung damage is characterized by acute radiation pneumonitis (RP) and chronic radiation-induced lung fibrosis (RILF) (Giuranno *et al*, 2019; Rahi *et al*, 2021). Radiation exposure and the generation of reactive oxygen/nitrogen species cause cell DNA damage and subsequent cell death, senescence or activation in different lineages such as type I/II pneumocytes, endothelial cells and macrophages (Almeida *et al*, 2013; Choi *et al*, 2015; Su *et al*, 2021). Acute cell disruption generates damage-associated molecular patterns, favoring the recruitment of immune cells such as neutrophils, macrophages and lymphocytes, the secretion of various cytokines and chemokines, vascular permeabilization, sustained epithelial trauma and the development of inflammation (Giuranno *et al*, 2019). Sustained inflammation and imbalance in tissue homeostasis disrupt cell-cell communications, promoting fibroblast activation into myofibroblasts, extracellular matrix deposition and irreversible tissue fibrosis (Yan *et al*, 2022).

Macrophages are an important component of lung immunity and represent the first line of defense against various traumatic situations, and have been shown to be involved in numerous chronic lung disease processes (Aegerter *et al*, 2022). Lung macrophages are a heterogeneous population with characteristics and roles driven by their location within the lung tissue (alveolar or interstitial), and have the possibility to acquire either classical or alternative activation, depending on the physiological or pathological changes in the tissue microenvironment (Arora *et al*, 2018). High numbers of macrophages have been observed in radiation-induced lung damage, in both human samples after RT and preclinical models of whole thoracic irradiation, suggesting that they may play a role in lung response to radiation exposure (Lavigne *et al*, 2017; Meziani *et al*, 2018b). Moreover, depletion of interstitial macrophages (IM) by CSF1R inhibition has been shown to prevent RILF following 16 Gy whole thorax irradiation in mice (Meziani *et al*, 2018b). In preclinical models of whole thorax exposure in mice, alveolar macrophages (AM) were depleted during the RP phase (Groves *et al*, 2015), then repopulated during the RILF phase, forming organized

clusters implicated in fibrosis development (de Leve *et al*, 2017). Replenishment of resident macrophage populations has been shown to be caused by CCR2⁺ monocyte recruitment, demonstrating that CCR2⁺ infiltrating-derived macrophages participate in radiation-induced lung fibrosis (Groves *et al*, 2018).

So far, whole thorax irradiation preclinical models helped the understanding of the potential roles played by various macrophage subpopulations in RP and RILF. It is known, however, that the exposed volume is of paramount importance in the response of lung tissue to RT. Through the availability of dedicated small animal irradiators, exposure of very small volumes using millimetric beam collimation is now achievable, improving the clinical relevance of these new models of RT effects in mice (Butterworth, 2019). We recently demonstrated that radiation-induced damage to 4% of mouse lung volume was associated with macrophage clusters developing around the injured area (Lavigne *et al*, 2019; Soysouvanh *et al*, 2020). Once these macrophage clusters were noticed near radiation lesions, we investigated their phenotype and their origin. We postulated that the mechanisms involved in the response of limited lung volumes to radiation exposure may differ from conventional preclinical models using whole- or hemi-thorax irradiation. Better knowledge of the physiopathological mechanisms associated with the irradiation of limited lung volumes using accurate preclinical models will provide novel therapeutic opportunities to combat the side-effects of thoracic RT.

In this study, we followed lung macrophage subpopulations in the mouse lung from 3 days to 12 months following a high-dose exposure of limited volume. We chose two different doses inducing progressive (60 Gy) and rapid (80 Gy) lung fibrosis (Bertho *et al*, 2020). In pathological contexts, it may be difficult to discriminate macrophage subpopulations whose phenotype may strongly vary depending on tissue context. To overcome this difficulty, we used spectral flow cytometry and single cell RNA-sequencing, giving us the opportunity to highlight interesting macrophage populations in the context of RP and RILF development in mice. Then, we used CCR2 knock-out mice, to determine if monocyte recruitment abrogation may influence radiation-induced damage severity. Our study provides new insights into the possible role of macrophages in the development of RP and RILF following exposure of limited mouse lung volumes, suggesting that macrophage invasion results from both AM and IM recruitment from the bloodstream but also from *in situ* AM proliferation, with a switch toward a pro-fibrosing metabolic state.

MATERIALS AND METHODS

Animals and irradiation procedure

The male C57BL/6JRj (WT) mice were from Charles River (Wilmington, USA) and the CCR2 knockout mice (CCR2 KO, B6.129S4-Ccr2tm1lfc/J) were from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) and bred in the IRSN animal facility. The IRSN animal facility is accredited by the French Ministry of Agriculture for performing experiments on rodents. Animal experiments were performed in compliance with French and European regulations on the 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 (approval number E92-032-01) and authorized by the French Ministry of Research under the reference APAFiS#13021-2018011217442982 v1. This study was conducted according to ARRIVE guidelines for animal handling and experimentation (<https://arriveguidelines.org/arrive-guidelines> accessed on 22 December 2022). The SARRP (Small Animal Radiation Research Platform, XSTRAHL Ltd., UK) was used to perform left lung focal exposure by arc therapy, using 3 x 3 mm beam collimation as already described (Bertho *et al.*, 2020), explained in the supplemental materials and methods and illustrated in supplemental Figure 1.

Experimental procedures

Three different experimental procedures were used : 1) WT and CCR2 KO mice lung irradiation to 60 or 80 Gy for histological studies (245 mice, 120 WT and 125 CCR2 KO, between 5 and 8 mice per timepoint); 2) WT and CCR2 KO mice lung irradiation to 60 or 80 Gy for flow cytometry studies (267 mice, 142 WT and 125 CCR2 KO, between 5 and 8 mice per timepoint); 3) WT and CCR2 KO mice lung irradiation to 60 or 80 Gy for single cell RNA-seq studies (30 mice, between 4 and 6 mice per timepoint). For histology and flow cytometry, tissues were harvested 3 days, 1 week, and 1, 3, 6 and 12 months post-exposure. For single cell RNA-seq experiments, tissues were harvested 1 and 6 months post-exposure.

Micro-computed tomography

Mouse lung imaging was performed using micro-CT Quantum GX2 (PerkinElmer, France) with respiratory gating as already described (Bertho *et al.*, 2020). The procedure is described in the supplemental materials and methods.

Histology and immunohistology

Tissue sections and immunostainings were performed as described in the supplemental materials and methods.

Tissue digestion and flow cytometry analyses

Tissue digestion and the flow cytometry gating strategy are drawn from the bibliography (Misharin *et al*, 2013; Zaynagetdinov *et al*, 2013) and explained in the supplemental materials and methods and in supplemental Figure 2.

Single cell RNA-seq

Data preprocessing and most of the downstream analyses were performed using the Seurat Package of R software (Butler *et al*, 2018). In total, 30 samples were included in the study: unirradiated (6 WT and 4 CCR2 KO), 60 Gy 1 month (4 WT and 4 CCR2 KO), 60 Gy 6 months (4 WT and 4 CCR2 KO) and 80 Gy 1 month (4 WT). For WT samples, we obtained 61,630 cells for Seurat quality control processes. After down sampling, we finally worked with 57,256 CD45⁺ cells, i.e. 14,314 cells per group. After sub clustering, we worked on 9607 myeloid cells, of which 1953 were macrophages including 1498 alveolar macrophages. For CCR2 KO samples, we obtained 40,802 cells for Seurat quality control processes. After down sampling, we finally worked with 35,595 CD45⁺ cells, i.e. 11865 cells per group. After sub clustering, we worked on 3199 myeloid cells, of which 836 were macrophages, including 722 alveolar macrophages. Technical details are given in the supplemental material and methods.

Statistical analyses

Data are given as means \pm standard error of the mean. Statistical analyses were performed by one way analysis of variance (Tukey multiple comparison posthoc test) or Student's t test, with a level of significance of $P < 0.05$.

RESULTS

Focal irradiation of the left lung is associated with macrophage invasion and impacts macrophage sub-populations

Both progressive (60 Gy) and rapid (80 Gy) fibrosis were associated with macrophage invasion, mainly around the injured area as shown in Figure 1A with anti-CD68 antibody immunostaining. We then decided to characterize invading macrophages in the damaged lung area using flow cytometry. The gating strategy (supplemental Figure 2) allowed AM (CD45⁺/CD11b⁺/CD68^{+/-}/Ly6C⁻/CD11c⁺/SiglecF⁺), IM (CD45⁺/CD11b⁺/CD68⁺/Ly6C⁻/CD11c⁻/SiglecF⁻), M1 (classically activated CD80⁺/MHC II⁺) and M2 (alternatively activated CD206⁺) distinction. A tendency to increased AM percentages is observed after 60 and 80 Gy exposures; however, these did not reflect histological observations (Figure 1B). The percentage of IM seems to be increased only after 80 Gy exposure. AM show a tendency to M1-like orientation, whereas IM show a tendency to M2-like orientation (Figure 1C).

We chose to continue using the single cell RNA-seq approach, in order to access more precise information on macrophage sub-populations associated with focal radiation-induced lung damage. Then, 61,630 viable CD45⁺ leucocytes were analyzed from lungs of WT control (0 Gy) mice (14,314 cells), 60 Gy-irradiated 1-month (14,397 cells) and 6-months post-exposure (17,961 cells) and 80 Gy-irradiated mice 1-month post-exposure (14,958 cells, Supplemental Figure 3A). We identified several known CD45⁺ cells in the lung tissues, with the discrimination of 6 different cell types (Figure 2A, left panel), with the canonical markers indicated in the heatmap in Figure 2A, right panel. We next focused on myeloid cells, discriminating 6 sub-clusters using the Louvain method (Figure 2B). Thanks to published data (Aegerter *et al.*, 2022), these clusters were identified as AM, IM, dendritic cells (DC Cells), classical and non-classical monocytes (C-mono and NC-mono), and one hybrid cluster consisting of cells presenting both lymphocytic and myeloid cell markers. Both AM and IM are increased post-irradiation (Figure 2C). We next focused on macrophages (AM and IM) from Figure 2B, and obtained a new UMAP with 7 clusters shown in Figure 2D. We then applied scores constructed using Harmonizome (Rouillard *et al.*, 2016) to identify AM and IM (in blue, Figure 2D, left and middle panels, respectively, score details in supplemental Figure 3B). Clusters 0, 1, 3, 5 and 6 correspond to AM, and clusters 2 and 4 correspond to IM. The recruited macrophage score (Figure 2D, right panel, supplemental Figure 3) identified numerous cells, shared in both IM and AM clusters. The ridge plot (Figure 2E, left panel) shows that clusters 2 and 4 (IM), and 3 and 5 (AM) are "recruited" clusters. Discrimination between irradiated and non-irradiated groups

by the violin plot (Figure 2E, right panel) shows irradiation-induced recruitment of macrophages identified in clusters 3 and 4 (AM and IM) for acute reaction and cluster 5 (AM) for late reaction.

The kinetics of radiation-induced focal lung damage in CCR2 KO mice is similar to their wild type littermates as observed by CBCT imaging.

Tissue consolidation was visible in both WT and CCR2 KO mice 12 months post-60 Gy and as soon as 1-month post-80 Gy (Figure 3A). Radiation-induced changes in tissue density were visible on 3D reconstructions (dark blue area). The presence of the injury patch was tracked by the HU curve construction represented in Figure 3B and confirmed tissue densification 12 months post-60 Gy and 1 to 12 months post-80 Gy with no difference between strains. No significant difference in patch volume was observed between strains 12 months post-60 Gy exposure (Figure 3C, upper panel). Following 80 Gy irradiation, the patch was significantly larger in CCR2 KO mice than in their time-matched wild type littermates for 1-, 3- and 12-months' time points (Figure 3C, bottom panel).

CCR2 KO mice experience acute lung oedema and premature increase in poorly aerated lung volumes compared to WT mice

HU thresholds were applied to the whole left lung to discriminate between normo-aerated ([-900, -435] HU) and poorly aerated ([-435, +500] HU) volumes. Finally, among the poorly aerated ones, we also highlighted non-aerated volumes (> -121 HU). Data are presented in Figures 3D and E. For more clarity, graphs were generated using pooled « young » controls (1 and 3 months) serving as reference control for tissues from 3 days to 3 months and pooled « old » controls (6 and 12 months) serving as reference control for 6- and 12-months' time points (detailed control data are given in supplemental Figure 4A).

Focal lung exposure to 60 Gy generated significant acute aeration volume modifications (Figure 3D, upper panels), with a slight decrease in poorly aerated volumes at 1 month in WT mice but a lasting decrease in CCR2 KO mice. Late changes were characterized by increased poorly aerated volumes only at 12 months in WT mice, and from 6 months post-exposure in CCR2 KO mice. After 80 Gy exposure (Figure 3D, lower panels), poorly aerated volumes were increased at 6 and 12 months in WT mice. CCR2 KO mice demonstrated a very acute (3 days and 1 week) decrease followed by a

significant increase in poorly aerated volumes from 1 to 12 months post-exposure. Focus on the appearance of radiation-induced non-aerated volumes (Figure 3E) showed no convincing changes following 60 Gy exposure (upper panel). Conversely, after 80 Gy (lower panel), the percentage of non-aerated volumes increased from 1 to 12 months in both mouse strains, with significantly more volume concerned in CCR2 KO mice during the sub-acute phase at 1 and 3 months.

Anatomopathological observations demonstrate similar acute and late radiation-induced lung damage in both CCR2 KO and WT mice

Unirradiated CCR2 KO mice demonstrated similar lung tissue organization compared to WT unirradiated mice (supplemental Figure 4B). Similar observations were done post-irradiation in both mouse strains (supplemental Figures 4C and D). Exposure to 60 Gy generated progressive lung fibrosis, with dense injury patch and tissue stricture appearing at 12 months. Lung fibrosis with lung stricture was visible as early as 1 month post-80 Gy. Measurement of the thickness of alveolar septa, a sign of parenchymal reaction to trauma, showed similar variations post-60 or 80 Gy in both mouse strains (supplemental Figure 5A). Finally, CCR2 KO mice demonstrated similar macrophage invasion compared to their WT littermates as revealed by CD68 immunostaining quantification (supplemental Figure 5B).

RNA-seq analyses demonstrate similar cell populations in both CCR2 KO and WT mice

Unirradiated CCR2 KO mice show significantly reduced monocyte numbers compared to unirradiated WT mice (Supplemental Figure 6A), but experienced radiation-induced macrophage invasion (supplemental Figure 6B), as observed in WT mice.

As for WT mice, 40,802 viable CD45⁺ leucocytes were analyzed by single cell RNA-seq, from lungs of unirradiated CCR2 KO mice (11 865 cells) and 60 Gy-irradiated mice, 1 month (17 040 cells) and 6 months post-exposure (11 897 cells). We identified several known CD45⁺ cells in the lung tissues with the discrimination of 7 different cell types (Figure 4A, left panel). Canonical markers are indicated in the heatmap Figure 4A, right panel. Myeloid cells were sub-clustered in macrophages and monocytes. We focused on those two clusters as "myeloid cells" to remain in the same configuration as for WT mice. Myeloid cells were sub-clustered in 6 different cell populations shown in Figure 4B. The same cell types as in WT mice were identified: classical monocytes, non-classical monocytes, AM, IM, DC cells and hybrid cells. The histogram in Figure 4C shows a slight

acute increase in AM and IM numbers, followed by reduced numbers during the chronic phase. We next focused on macrophages (AM and IM) from Figure 4B and obtained a new UMAP with 7 clusters shown in Figure 4D. We then applied the same scores as applied in the WT mice study (Supplemental Figure 3) to identify AM and IM (in blue, Figure 4D, left and middle panel, respectively). Cluster 2 corresponds to IM, clusters 0, 1, 3, 4 and 6 correspond to AM, and cluster 5 presents features of both AM and IM. The recruited macrophage score (Figure 4D, right panel) identifies numerous cells, shared in both IM and AM clusters. Ridge and violin plots show that clusters 4 and 5 demonstrate a recruited profile in response to radiation exposure (Figure 4E). These results suggest that in our model, a proportion of macrophages originating from circulating monocytes reaches the damaged lung area probably via a CCR2-independent pathway.

A proliferating alveolar macrophage population is present post-irradiation.

On the WT macrophage UMAP (Figure 5A, left panel), projection of a score based on genes expressed by proliferating cells (Figure 5A, middle panel, score details in supplemental Figure 3C) and ridge plots (Figure 5A, right panel) highlighted cluster 6, previously identified as AM (Figure 2D), as a proliferating cluster in control and irradiated tissues. BrdU staining analyzed by flow cytometry confirmed AM proliferation by the increase in BrdU-specific antibody AM geometric mean fluorescence compared to controls 1 and 2 weeks post-80 Gy exposure (Figure 5B). Representative images of BrdU staining are given in Figure 5C. To support BrdU data, Ki67/CD68 co-immunostaining was performed on all tissue samples and showed the presence of double-positive proliferating macrophages in the radiation-damaged area (Figure 5D).

Irradiation generates metabolic reprogramming over time possibly from proliferating AM.

To go further, we focused on AM and sub-clustered them using the Louvain method, thus obtaining 7 clusters (Figure 6A, left panel). Split UMAPs globally showed the appearance of cluster 5 during the acute phase and cluster 4 during the chronic phase (Figure 6A, right panel). Using the Monocle3 package on R (Trapnell *et al*, 2014), we projected a Pseudo-temporal ordering of individual cells (pseudotime Single-cell trajectory) onto the AM UMAP, choosing the proliferating AM cluster as the starting

point (Figure 6B, left panel). Superimposition of the proliferation score on the pseudotime is shown in Figure 6B, middle panel. Violin plots shown in Figure 6B, right panel, identify cluster 6 as the proliferating cluster. Using the “find markers” Seurat function, clusters 4 and 5 were differentiated from the others by genes implicated in cholesterol biosynthesis and fatty acid metabolism, respectively. We then projected onto the AM UMAP a fatty acid metabolism pathway score (score details in supplemental Figure 3C), superimposed with pseudotime, mainly identifying cluster 5 in response to ionizing radiation (Figure 6C, left panel). Violin plots confirmed cluster 5 as concerned with fatty acid metabolism (Figure 6C, right panel). ApoE/CD68 co-immunostaining revealed co-stained macrophages close to the damaged lung area (Figure 6D), confirming gene expression data. Cholesterol biosynthesis pathway score projection, superimposed with pseudotime, identified cluster 4 in response to ionizing radiation (Figure 6E, left panel, score details in supplemental Figure 3C). Violin plots confirmed cluster 4 as concerned with cholesterol biosynthesis score (Figure 6E, right panel). HMGSC1/CD68 co-immunostaining revealed co-stained macrophages (Figure 6F), confirming gene expression data. Interestingly, data obtained from CCR2 KO mice were similar (supplemental Figure 7).

DISCUSSION

Radiation exposure of the lung initiates a cascade of molecular and cellular events leading to acute pneumonitis which, in some cases, can perpetuate and evolve through RILF, depending roughly on the dose received, fractionation regimen and volume exposed (Hanania *et al*, 2019). Pulmonary macrophages are considered as the first line of defense in cases of lung trauma and may represent a promising therapeutic target against RILF (Meziani *et al*, 2018a). RILF is characterized by radiation-induced lung CCR2-dependent IM infiltration and orientation from M1 through M2-like phenotypes as fibrosis progresses (Duru *et al*, 2016; Meziani *et al*, 2018b). However, all data on the potential role of macrophages in RILF emerge from preclinical models using whole thorax irradiation (WTI), poorly representing the reality of clinical settings. Nevertheless, the lung is a parallel-organized organ with functioning reserve capacity, and we know that the volume exposed to ionizing radiation is a determinant factor governing the likelihood of developing RILF. In the present study, we challenged knowledge about the role of macrophages in RILF in an original preclinical model of limited irradiated lung volume in the mouse offering accurate clinical exposure miming (Bertho *et al*, 2020). We showed that focal irradiation of the lung was associated with M1-like alveolar and M2-like interstitial macrophage invasion near the irradiated area, confirming previous observations from our lab (Lavigne *et al*, 2019). Macrophage invasion was CCR2-independent and may implicate a population of proliferating resident AM as part of a metabolic shift towards cholesterol biosynthesis and through a foamy phenotype.

In our original results obtained by single cell RNA sequencing following focal lung radiation damage, we observed that both AM and IM populations were increased, both partly concerned by the recruited gene expression profile. Mice overexpressing IL10 show spontaneous lung fibrosis development, associated with M2 macrophage activation via a CCL2/CCR2 signaling axis (Sun *et al*, 2011). CCR2 KO mice are protected from FITC- and bleomycin-induced pulmonary fibrosis (Moore *et al*, 2001) and CCR2⁺ infiltrating monocyte-derived macrophages have been shown to participate in radiation-induced lung fibrosis following WTI in mice (Groves *et al*, 2018). This drove us to verify the hypothesis of CCR2-dependent monocyte recruitment in our model. Surprisingly, CCR2 KO mice experienced radiation-induced lung damage very similar to their WT littermates. Even though challenging, CT imaging is part of the basic diagnostic armamentarium in patients with radiation-induced fibrosis (Frakulli *et al*, 2017). In preclinical studies, the CT scan is an interesting noninvasive technique (van Berlo *et al*, 2019) but its use can be complicated, especially with the absence of

observable well-defined clinical features, given the small size of the mouse lungs (De Ruyscher *et al*, 2017). We therefore applied thresholds, based on the literature, to discriminate normo-aerated and poorly-aerated volumes and improve analysis accuracy (Ruscitti *et al*, 2020). We observed slight differences between strains, with especially increased percentage of normo-aerated volumes, i.e. lower HU values in CCR2 KO mice; however, these never reached values classically associated with emphysema. Higher percentages of poorly aerated volumes were also observed 1- and 3-months post-80 Gy in CCR2 KO mice, reflecting an increase in injury patch volume. It remains, however, impossible to conclude in possible higher severity of tissue damage at these time points in CCR2 KO mice based on CT scans or even HES observations. What remains clear is that abrogating CCR2-dependent monocyte recruitment had no obvious impact on lung damage severity in our model, suggesting a CCR2-independent monocyte recruitment process. Other pathways may be implicated in monocyte recruitment (Shi & Pamer, 2011), such as the CX3CL1-CX3CR1 axis as demonstrated in immune-mediated lung disease in mice (Mizutani *et al*, 2021; Zhang & Patel, 2010). This may be supported by the presence of “recruited” gene profile macrophages in CCR2 KO mice in our study. Further studies will be necessary to explore such hypotheses.

Interestingly, the demonstration of a role for recruited macrophages following WTI is associated with a role for interstitial subsets (Hanania *et al*, 2019; Meziari *et al*, 2018b). In our case, HES observations show numerous clusters of AM, also concerned by the recruited gene expression profile. It is conceivable that these AM may also come from recruited cells, since IM may be considered by some authors as the intermediaries between recruited macrophages and AM (Schyns *et al*, 2018). AM have also been shown to be able to move from one alveolus to another to prevent unnecessary inflammation and ensure lung homeostasis (Neupane *et al*, 2020). In our model exposing 4% of the total lung volume, and unlike WTI, numerous macrophages reside in unirradiated areas and may migrate through the damaged zone, explaining recruitment-independent increased macrophage populations. Further studies will be necessary to examine the existence of these migrating macrophages and find out whether they may express a “recruited” gene profile.

In our study, we identified by single cell RNA-sequencing a proliferating small population of macrophages. Resident macrophage proliferation has been demonstrated in idiopathic pulmonary fibrosis (Morse *et al*, 2019), and may contribute to lung damage in the context of focal radiation exposure. Moreover, pseudotime trajectories revealed that this proliferating sub-population of macrophages may switch

their metabolism through cholesterol biosynthesis, a possible reason for foam cell generation, including in case of CCR2-dependent monocyte recruitment abrogation (Keidar *et al*, 1999). AM clusters on HES tissue sections show numerous lipid-laden foam cells following radiation exposure in our model. Modifications of AM lipid metabolism have been associated with various pulmonary pathologies such as asthma, chronic obstructive pulmonary disease, or idiopathic fibrosis (Ogger & Byrne, 2021), and in preclinical models of lung damage, including radiation exposure; they may be implicated in lung damage following focal irradiation (Hirama *et al*, 2007; Hsieh *et al*, 2023; Ordway *et al*, 2005; Romero *et al*, 2015). Further studies will be necessary to explore this concept.

In conclusion, our paper provides new data on the possible roles of macrophages in radiation-induced lung damage, using an original preclinical model of limited lung volume exposure which accurately mimics clinical conditions. Macrophage implication in radiation-induced lung damage may strongly depend on the volume exposed. This highlights the importance of considering results depending on the preclinical model used and calls for extensive future studies to decipher the roles of macrophages in the development of lung focal radiation damage, especially concerning dysregulated cell metabolism which may open new therapeutic avenues in this context.

Acknowledgements

The authors thank the Groupe de Soutien à l'Experimentation Animale (GSEA) from IRSN for their excellent support in animal care.

This work was supported by the ROSIRIS program (IRSN funding); "INCA, Institut National du Cancer : "INCa 2018-1-PL BIO-06" and "INCa-SEQ-RTH22-n° Inca_16861" fundings.

Author contribution statement

AF and FM contributed to the conception and design of the study. MDS constructed the preclinical model. SBC, JL, MDS, GT, JB, VB and AF collected the data and interpreted the results. MAB constructed the scRNAseq analysis pipeline on R. AF and SBC wrote the first manuscript draft. FM, MDS, VP, JB, MAB, JL, OG, MM and ED realized a critical review of the manuscript. All authors contributed to manuscript revision, read, and approved the submitted version.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

REFERENCES

- Aegerter H, Lambrecht BN, Jakubzick CV (2022) Biology of lung macrophages in health and disease. *Immunity* 55: 1564-1580
- Almeida C, Nagarajan D, Tian J, Leal SW, Wheeler K, Munley M, Blackstock W, Zhao W (2013) The role of alveolar epithelium in radiation-induced lung injury. *PloS one* 8: e53628
- Arora S, Dev K, Agarwal B, Das P, Syed MA (2018) Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology* 223: 383-396
- Bertho A, Dos Santos M, Buard V, Paget V, Guipaud O, Tarlet G, Milliat F, Francois A (2020) Preclinical Model of Stereotactic Ablative Lung Irradiation Using Arc Delivery in the Mouse: Effect of Beam Size Changes and Dose Effect at Constant Collimation. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 107: 548-562
- Butterworth KT (2019) Evolution of the Supermodel: Progress in Modelling Radiotherapy Response in Mice. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 31: 272-282
- Choi SH, Hong ZY, Nam JK, Lee HJ, Jang J, Yoo RJ, Lee YJ, Lee CY, Kim KH, Park S, Ji YH, Lee YS, Cho J (2015) 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* 21: 3716-3726
- de Leve S, Wirsdorfer F, Cappuccini F, Schutze A, Meyer AV, Rock K, Thompson LF, Fischer JW, Stuschke M, Jendrossek V (2017) Loss of CD73 prevents accumulation of alternatively activated macrophages and the formation of profibrotic macrophage clusters in irradiated lungs. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 31: 2869-2880
- De Ruyscher D, Granton PV, Lieuwes NG, van Hoof S, Wollin L, Weynand B, Dingemans AM, Verhaegen F, Dubois L (2017) 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. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 124: 482-487
- Duru N, Wolfson B, Zhou Q (2016) Mechanisms of the alternative activation of macrophages and non-coding RNAs in the development of radiation-induced lung fibrosis. *World journal of biological chemistry* 7: 231-239

Frakulli R, Salvi F, Balestrini D, Palombarini M, Akshija I, Cammelli S, Morganti AG, Zompatori M, Frezza G (2017) Radiological differential diagnosis between fibrosis and recurrence after stereotactic body radiation therapy (SBRT) in early stage non-small cell lung cancer (NSCLC). *Translational lung cancer research* 6: S1-S7

Giuranno L, Ient J, De Ruyscher D, Vooijs MA (2019) Radiation-Induced Lung Injury (RILI). *Frontiers in oncology* 9: 877

Groves AM, Johnston CJ, Misra RS, Williams JP, Finkelstein JN (2015) Whole-Lung Irradiation Results in Pulmonary Macrophage Alterations that are Subpopulation and Strain Specific. *Radiation research* 184: 639-649

Groves AM, Johnston CJ, Williams JP, Finkelstein JN (2018) Role of Infiltrating Monocytes in the Development of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis. *Radiation research* 189: 300-311

Hanania AN, Mainwaring W, Ghebre YT, Hanania NA, Ludwig M (2019) Radiation-Induced Lung Injury: Assessment and Management. *Chest* 156: 150-162

Hirama N, Shibata Y, Otake K, Machiya J, Wada T, Inoue S, Abe S, Takabatake N, Sata M, Kubota I (2007) Increased surfactant protein-D and foamy macrophages in smoking-induced mouse emphysema. *Respirology* 12: 191-201

Hsieh MH, Chen PC, Hsu HY, Liu JC, Ho YS, Lin YJ, Kuo CW, Kuo WS, Kao HF, Wang SD, Liu ZG, Wu LS, Wang JY (2023) Surfactant protein D inhibits lipid-laden foamy macrophages and lung inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Cellular & molecular immunology* 20: 38-50

Keidar S, Attias J, Heinrich R, Coleman R, Aviram M (1999) Angiotensin II atherogenicity in apolipoprotein E deficient mice is associated with increased cellular cholesterol biosynthesis. *Atherosclerosis* 146: 249-257

Lavigne J, Soysouvanh F, Buard V, Tarlet G, Guipaud O, Paget V, Milliat F, Francois A (2017) Conditional Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Deletion in the Endothelial Compartment Has No Beneficial Effect on Radiation-Induced Whole-Lung Damage in Mice. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 99: 972-982

Lavigne J, Suissa A, Verger N, Dos Santos M, Benadjaoud M, Mille-Hamard L, Momken I, Soysouvanh F, Buard V, Guipaud O, Paget V, Tarlet G, Milliat F, Francois A (2019) 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

Meziani L, Deutsch E, Mondini M (2018a) Macrophages in radiation injury: a new therapeutic target. *Oncoimmunology* 7: e1494488

Meziani L, Mondini M, Petit B, Boissonnas A, Thomas de Montpreville V, Mercier O, Vozenin MC, Deutsch E (2018b) CSF1R inhibition prevents radiation pulmonary fibrosis by depletion of interstitial macrophages. *The European respiratory journal* 51

Misharin AV, Morales-Nebreda L, Mutlu GM, Budinger GR, Perlman H (2013) Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 49: 503-510

Mizutani S, Nishio J, Kondo K, Motomura K, Yamada Z, Masuoka S, Yamada S, Muraoka S, Ishii N, Kuboi Y, Sendo S, Mikami T, Imai T, Nanki T (2021) Treatment with an Anti-CX3CL1 Antibody Suppresses M1 Macrophage Infiltration in Interstitial Lung Disease in SKG Mice. *Pharmaceuticals (Basel)* 14

Moore BB, Paine R, 3rd, Christensen PJ, Moore TA, Sitterding S, Ngan R, Wilke CA, Kuziel WA, Toews GB (2001) Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling. *J Immunol* 167: 4368-4377

Morse C, Tabib T, Sembrat J, Buschur KL, Bittar HT, Valenzi E, Jiang Y, Kass DJ, Gibson K, Chen W, Mora A, Benos PV, Rojas M, Lafyatis R (2019) Proliferating SPP1/MERTK-expressing macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. *The European respiratory journal* 54

Neupane AS, Willson M, Chojnacki AK, Vargas ESCF, Morehouse C, Carestia A, Keller AE, Peiseler M, DiGiandomenico A, Kelly MM, Amrein M, Jenne C, Thanabalasuriar A, Kubes P (2020) Patrolling Alveolar Macrophages Conceal Bacteria from the Immune System to Maintain Homeostasis. *Cell* 183: 110-125 e111

Ogger PP, Byrne AJ (2021) Macrophage metabolic reprogramming during chronic lung disease. *Mucosal immunology* 14: 282-295

Ordway D, Henao-Tamayo M, Orme IM, Gonzalez-Juarrero M (2005) Foamy macrophages within lung granulomas of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* express molecules characteristic of dendritic cells and antiapoptotic markers of the TNF receptor-associated factor family. *J Immunol* 175: 3873-3881

Rahi MS, Parekh J, Pednekar P, Parmar G, Abraham S, Nasir S, Subramaniam R, Jeyashanmugaraja GP, Gunasekaran K (2021) Radiation-Induced Lung Injury-Current Perspectives and Management. *Clinics and practice* 11: 410-429

Romero F, Shah D, Duong M, Penn RB, Fessler MB, Madenspacher J, Stafstrom W, Kavuru M, Lu B, Kallen CB, Walsh K, Summer R (2015) A pneumocyte-macrophage paracrine lipid axis drives the lung toward fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 53: 74-86

Rouillard AD, Gundersen GW, Fernandez NF, Wang Z, Monteiro CD, McDermott MG, Ma'ayan A (2016) The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database : the journal of biological databases and curation* 2016

Ruscitti F, Ravanetti F, Bertani V, Ragionieri L, Mecozzi L, Sverzellati N, Silva M, Ruffini L, Menozzi V, Civelli M, Villetti G, Stellari FF (2020) Quantification of Lung Fibrosis in IPF-Like Mouse Model and Pharmacological Response to Treatment by Micro-Computed Tomography. *Frontiers in pharmacology* 11: 1117

Schyns J, Bureau F, Marichal T (2018) Lung Interstitial Macrophages: Past, Present, and Future. *Journal of immunology research* 2018: 5160794

Shi C, Pamer EG (2011) Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews Immunology* 11: 762-774

Soysouvanh F, Benadjaoud MA, Dos Santos M, Mondini M, Lavigne J, Bertho A, Buard V, Tarlet G, Adnot S, Deutsch E, Guipaud O, Paget V, Francois A, Milliat F (2020) Stereotactic Lung Irradiation in Mice Promotes Long-Term Senescence and Lung Injury. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 106: 1017-1027

Su L, Dong Y, Wang Y, Guan B, Lu Y, Wu J, Wang X, Li D, Meng A, Fan F (2021) Potential role of senescent macrophages in radiation-induced pulmonary fibrosis. *Cell death & disease* 12: 527

Sun L, Louie MC, Vannella KM, Wilke CA, LeVine AM, Moore BB, Shanley TP (2011) New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 300: L341-353

van Berlo D, Khmelinskii A, Gasparini A, Salguero FJ, Froot B, de Wit N, van de Ven M, Song JY, Coppes RP, Verheij M, Sonke JJ, Vens C (2019) Micro cone beam computed tomography for sensitive assessment of radiation-induced late lung toxicity in preclinical models. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 138: 17-24

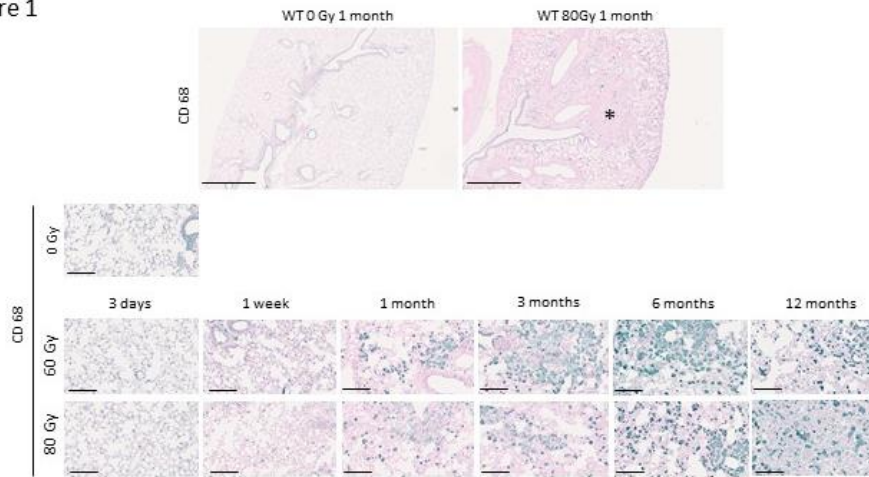
Yan Y, Fu J, Kowalchuk RO, Wright CM, Zhang R, Li X, Xu Y (2022) Exploration of radiation-induced lung injury, from mechanism to treatment: a narrative review. *Translational lung cancer research* 11: 307-322

Zaynagetdinov R, Sherrill TP, Kendall PL, Segal BH, Weller KP, Tighe RM, Blackwell TS (2013) Identification of myeloid cell subsets in murine lungs using flow cytometry. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 49: 180-189

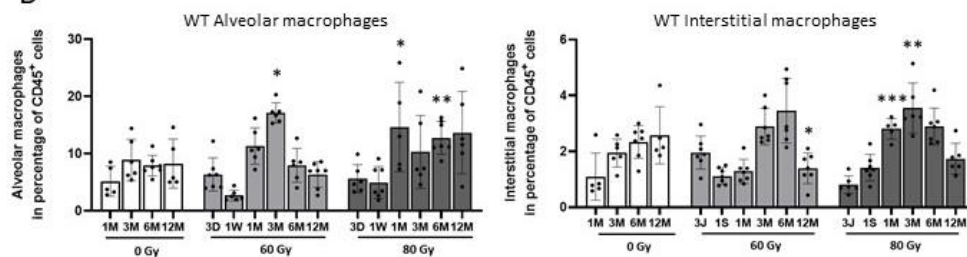
Zhang J, Patel JM (2010) Role of the CX3CL1-CX3CR1 axis in chronic inflammatory lung diseases. *International journal of clinical and experimental medicine* 3: 233-244

Figure 1

A



B



C

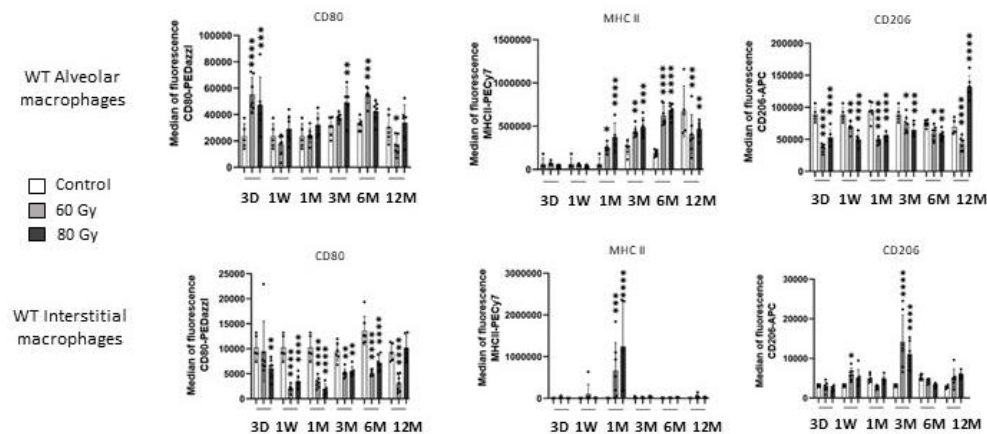


Figure 1: Focal lung radiation exposure is associated with macrophage invasion. A: Upper panel shows representative images of CD68 immunostaining (blue) in irradiated tissue 1-month post-80 Gy compared to age-matched control, showing that invading macrophages are located mainly around the injured area (*) (Scale bar=1mm). Lower panel shows representative pictures with higher magnification of CD68 immunostaining in control tissue and in irradiated ones 3 days, 1 week and 1, 3, 6 and 12 months post-exposure to 60 or 80 Gy. Scale bar=250µm. 6<n<8 animals per group. B: Damaged area or corresponding zone in unirradiated lungs were digested and analyzed by flow cytometry. Number of alveolar macrophages (AM, CD45⁺/CD11b⁺/CD68⁺/Ly6c⁺/CD11c⁺/Siglec F⁺) and interstitial macrophages (IM, CD45⁺/CD11b⁺/CD68⁺/Ly6c⁺/CD11c⁺/Siglec F⁻), expressed as percentage of CD45-positive cells, in irradiated area 3 days (3D), 1 week (1W), 1 month (1M), 3 months (3M), 6 months (6M) and 12 months (12M) post-exposure and in corresponding zone in unirradiated lungs from 1 to 12 months post-exposure to 0, 60 or 80 Gy. One month control mice served as controls for 3D, 1W and 1M time-points. 5<n<7 per group. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. C: Graphics showing the evolution of median fluorescence obtained by flow cytometry when staining AM and IM with CD80, MHC II and CD206, from 3D to 12M post-exposure to 60 or 80 Gy and from 1 to 12M in unirradiated tissues. One month control mice served as controls for 3D, 1W and 1M time-points. 5<n<7 per group. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.

Figure 2

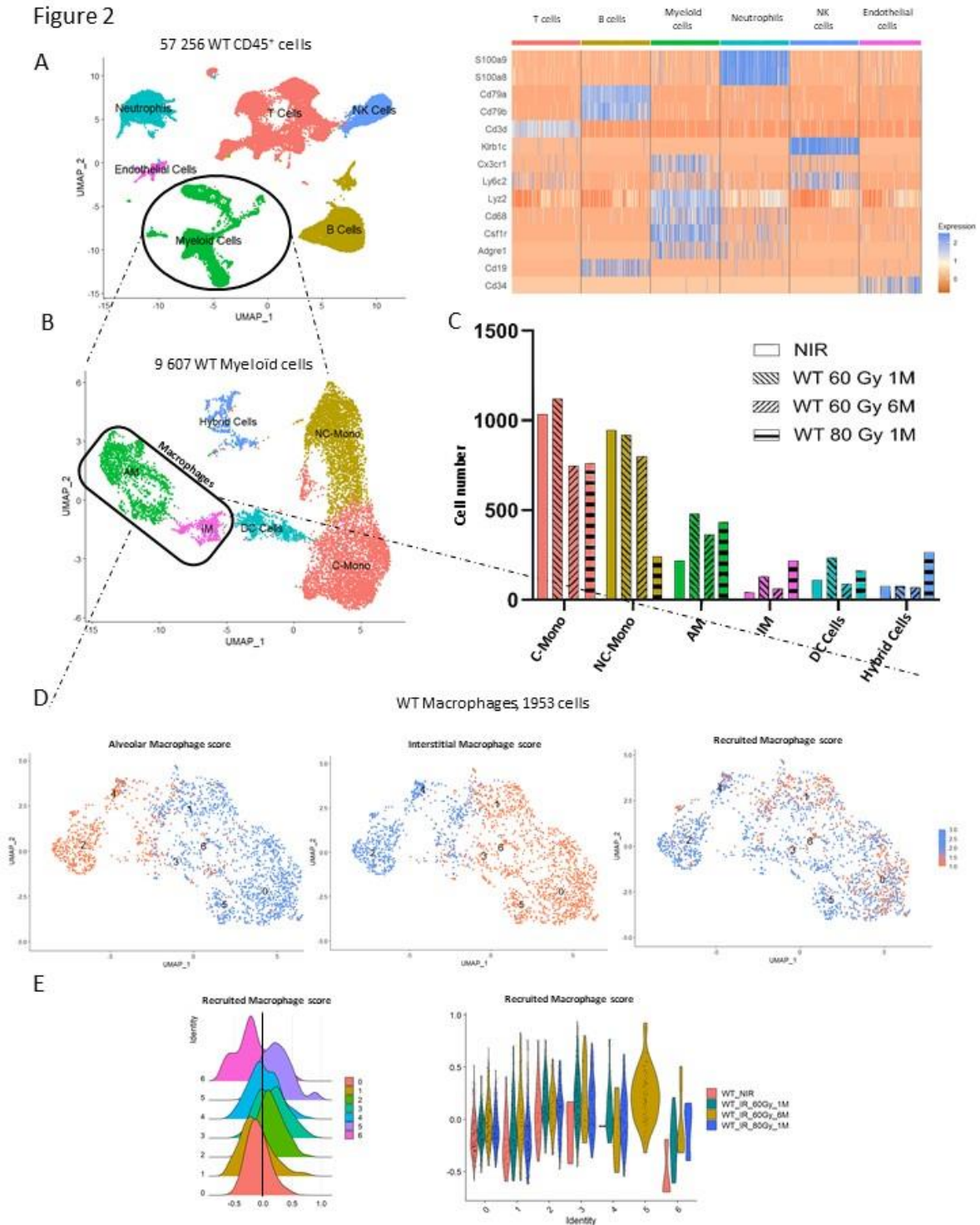


Figure 2: Focal lung irradiation is associated with macrophage invasion showing recruited profile. A: Global Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) of 57 258 WT CD45⁺ cells obtained across all samples (left panel, 14 314 cells per group, Louvain resolution 0.02) and heatmap visualization of markers identifying cell clusters in the global UMAP (right panel). B: UMAP obtained following sub-clustering of 9 607 myeloid cells (Louvain resolution 0.175). C: Histogram showing myeloid cell numbers in unirradiated tissues (NIR), 1 and 6 months following 60 Gy and 1 month following 80 Gy radiation exposure. D: New Seurat subobject including AM and IM from UMAP shown in B (1 953 cells), showing 7 clusters (Louvain resolution 0.4), and projection of alveolar, interstitial, or recruited macrophages scores as indicated. Concerned cells are shown in blue. E: Ridge plot and violin plot highlighting clusters demonstrating a recruited profile.

Figure 3

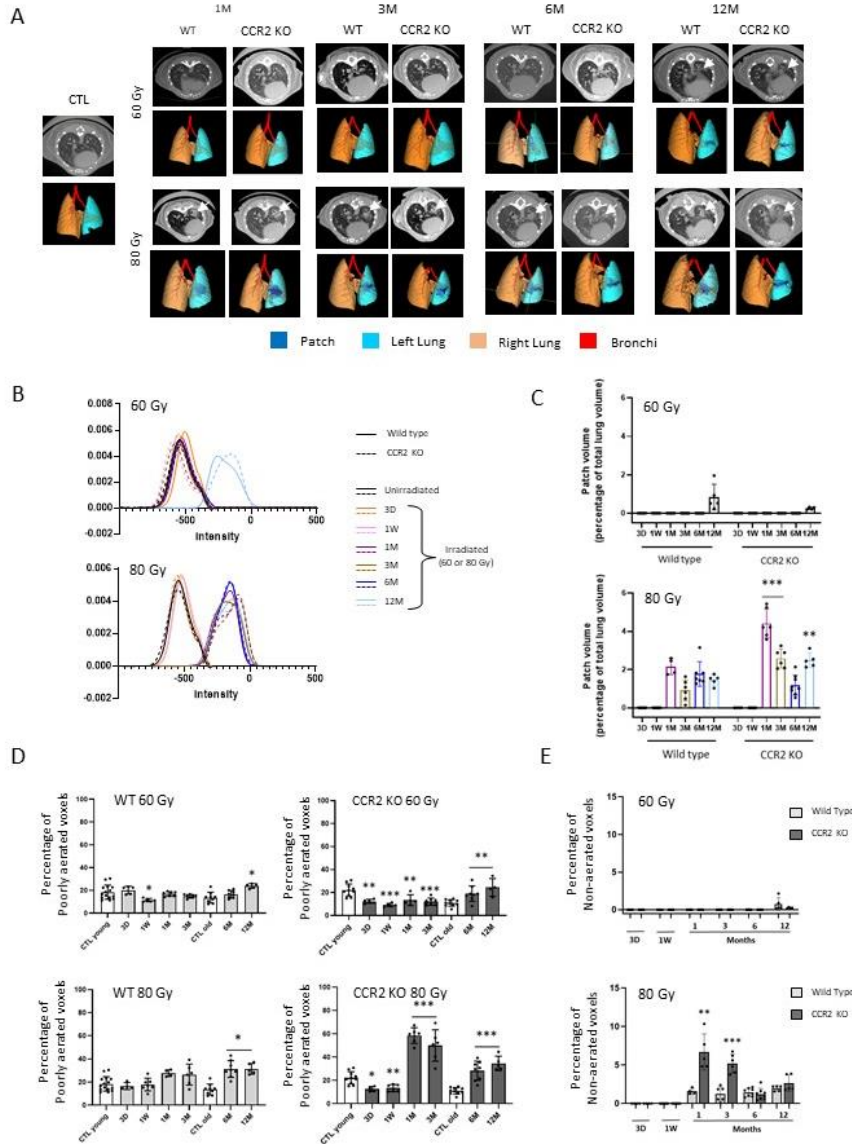


Figure 3: Abrogation of CCR2-dependent monocyte recruitment does not impact radiation-induced lung damage development. A: Representative micro-computed tomography images (upper lines) and 3-dimensional reconstructions (lower lines) in WT and CCR2 KO mice 1, 3, 6 and 12 months post-exposure to 60 or 80 Gy. WT control images are given as examples and are not different between strains and all along the experimental period. Lung opacification is indicated by white arrows when present. For 3D reconstructions, different colors have been used to differentiate the injury patch (dark blue), left lung (light blue), right lung (orange) and bronchi (red). B: Smoothed mean intensity representation in Hounsfield Units (HU) in the injured area (patch when visible, left lung otherwise) in WT and CCR2 KO mice 3 days (3D), 1 week (1W), and 1 (1M), 3 (3M), 6 (6M) and 12 months (12M) post-exposure to 0, 60 or 80 Gy. C: Volume of the injury patch as a percentage of total lung volume measured in WT and CCR2 KO mice from 3 days to 12 months post-exposure to 60 (upper panel) and 80 Gy (lower panel). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to time-matched patch volume in WT mice. $4 < n < 7$ per group. D: Lung aeration volumes as indicated by percentage of poorly-aerated volume ($[-435, +500]$ HU) measured in the left lungs of control WT and CCR2 KO mice and at 3D, 1W and 1, 3, 6 and 12M post-exposure to 60 Gy and 80 Gy. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to time-matched controls, i.e. pooled young (1 and 3 months) or pooled old controls (6 and 12 months). $10 < n < 15$ per control group; $4 < n < 8$ per irradiated group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. E: Percentage of non-aerated volume (> -121 HU) measured in the left lungs of WT and CCR2 KO mice at 3D, 1W and 1, 3, 6 and 12M post-exposure to 60 Gy (upper panel) and 80 Gy (lower panel). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to wild type littermates. $4 < n < 8$ per group.

Figure 4

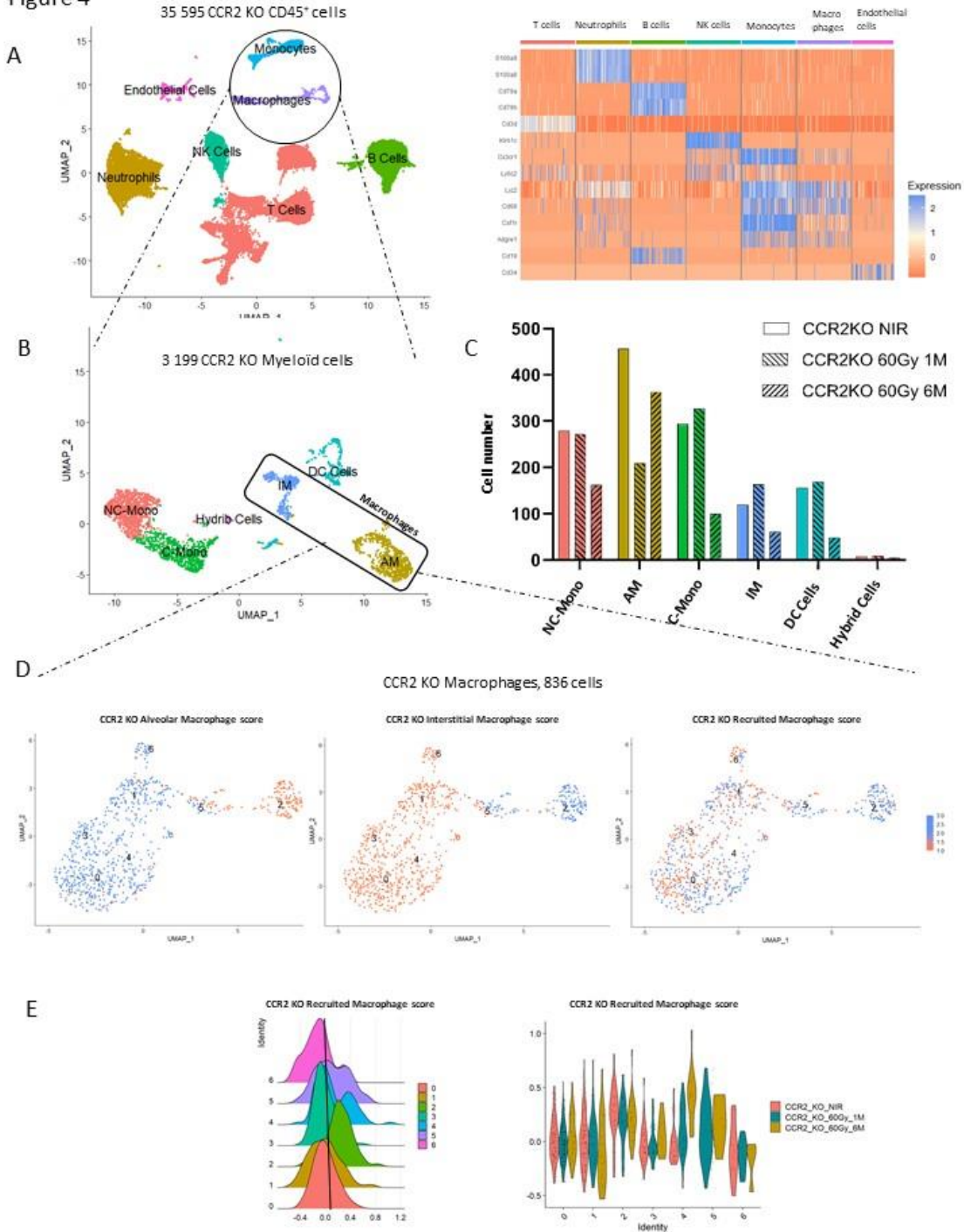


Figure 4: Focal lung irradiation is associated with macrophage invasion showing recruited profile in CCR2 KO mice as evidenced by single cell RNA-seq analyses. A: Global Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) of 35 595 CCR2 KO CD45⁺ cells obtained across all samples (left panel, 11 865 cells per group, Louvain resolution 0.01) and heatmap visualization of markers identifying cell clusters in the global UMAP (right panel). B: UMAP obtained following sub-clustering of 3 199 myeloid cells by the Louvain method (resolution 0.175). C: Histogram showing myeloid cell numbers in unirradiated tissues (NIR) and 1 and 6 months following 60 Gy radiation exposure. D: New Seurat subobject including AM and IM from UMAP shown in B (836 cells), showing 7 clusters (Louvain resolution 0.8), and projection of alveolar, interstitial, or recruited macrophage scores as indicated. Concerned cells are shown in blue. E: Ridge plot and violin plot highlighting clusters demonstrating a recruited profile.

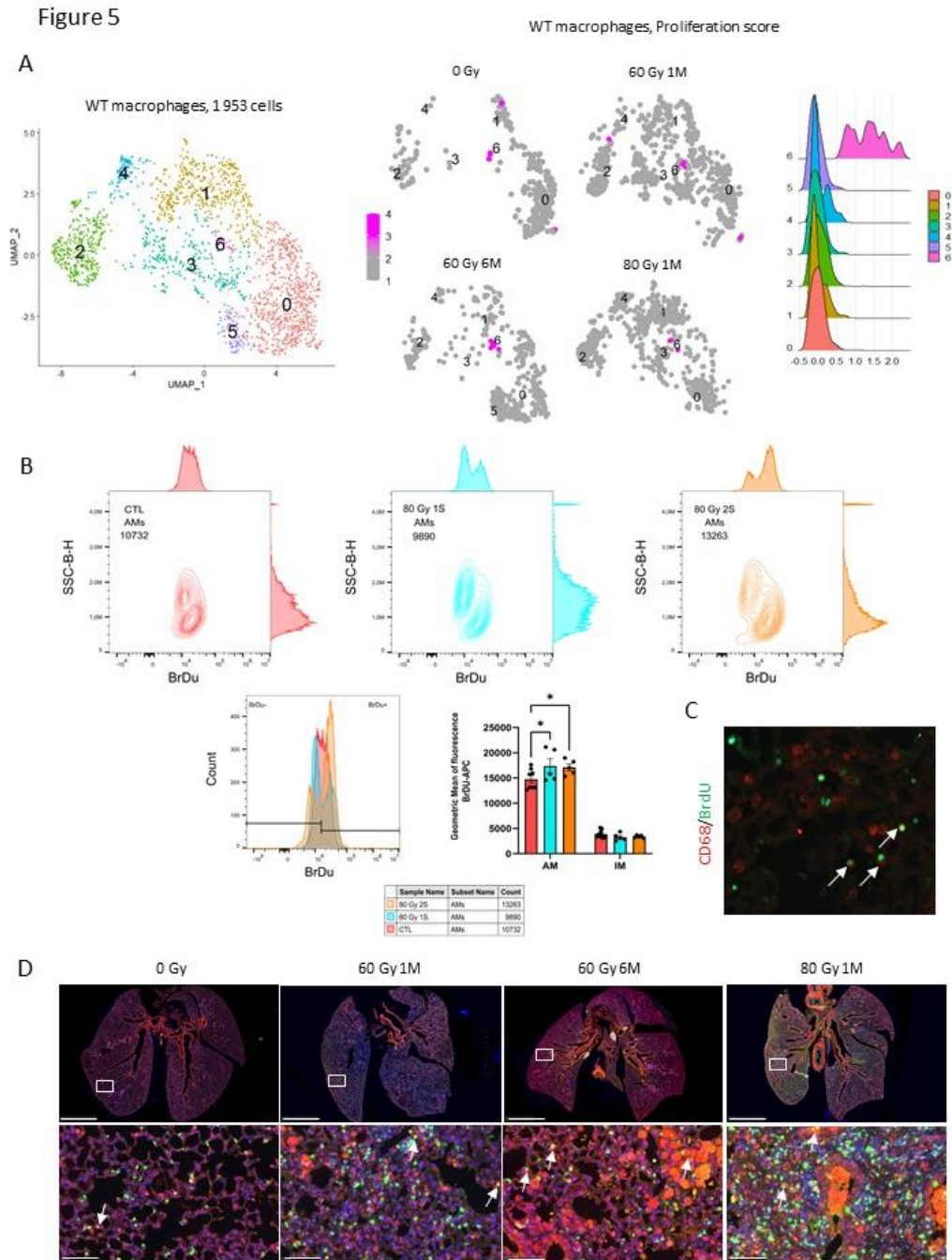


Figure 5: A sub-population of proliferating alveolar macrophages is present after radiation exposure. A: Global Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) of 1953 WT macrophages showing 7 clusters (left panel, Louvain resolution 0.4) and projection of a cell proliferation score on the split, according to irradiation conditions, i.e. unirradiated, 1- and 6-months post-60 Gy and 1-month post-80 Gy exposure. Proliferating cells are indicated in rose. Ridge plot (right panel) highlights cluster 6 as demonstrating a proliferating profile. B: flow cytometry analyses: Representative graph of SSC versus BrdU for unirradiated tissue, and 1- and 2-weeks post-80 Gy (upper panel). Geometric means of BrdU-specific antibody in control compared to irradiated tissues 1- and 2-weeks post-80 Gy (left lower panel) and fluorescence quantification in AM and IM (right lower panel). C: Immunohistological observations: Representative image of BrdU/CD68 co-immunostaining on irradiated lung tissue showing double-stained proliferating macrophages. D: Representative image of Ki67/CD68 co-immunostaining performed in unirradiated tissues, 1- and 6-months post-60 Gy exposure and 1 month post-80 Gy exposure showing several double-stained proliferating macrophages (white arrows). Global view: scale bar = 2.5mm, details: scale bar = 100 μ m.

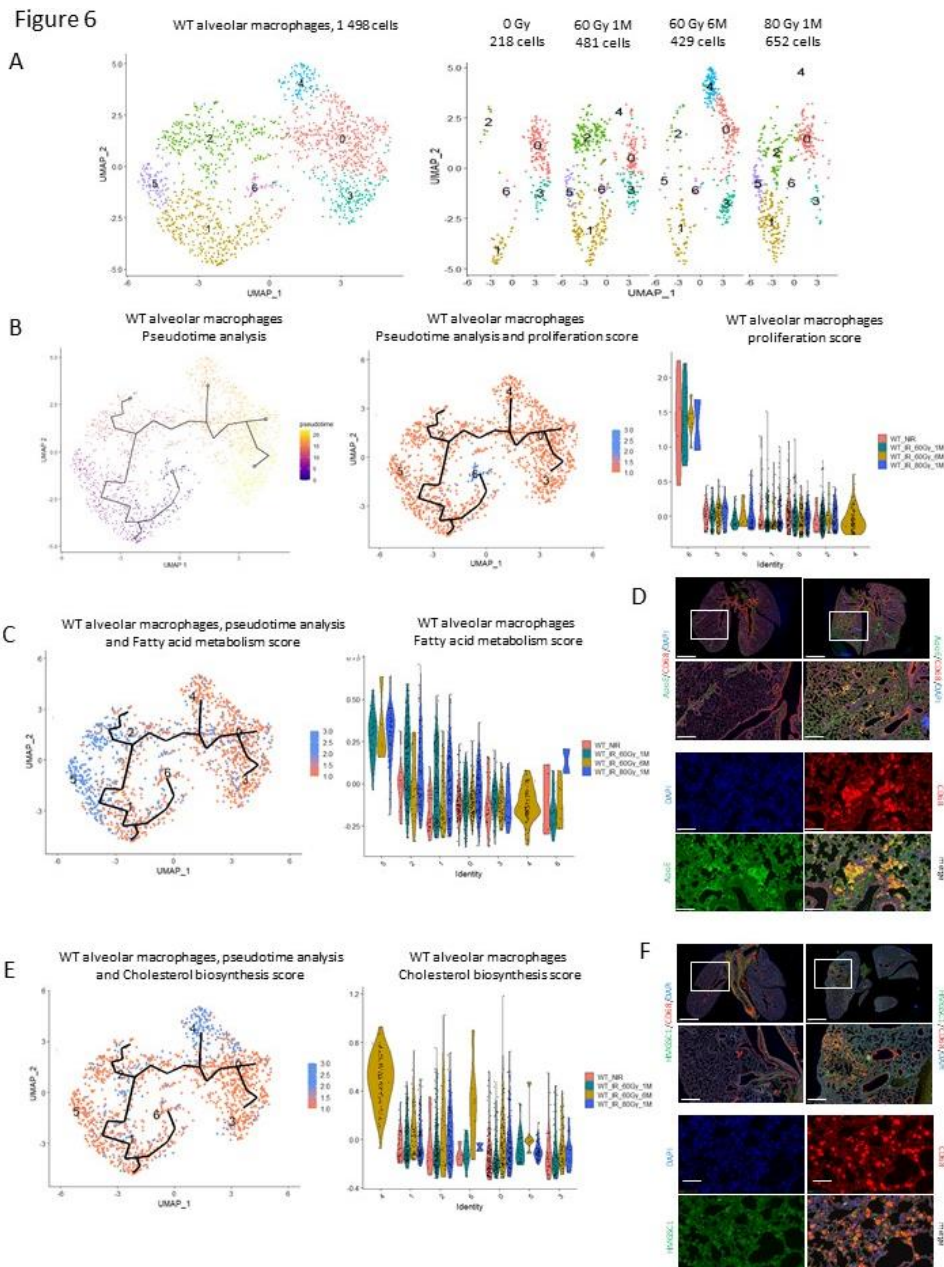
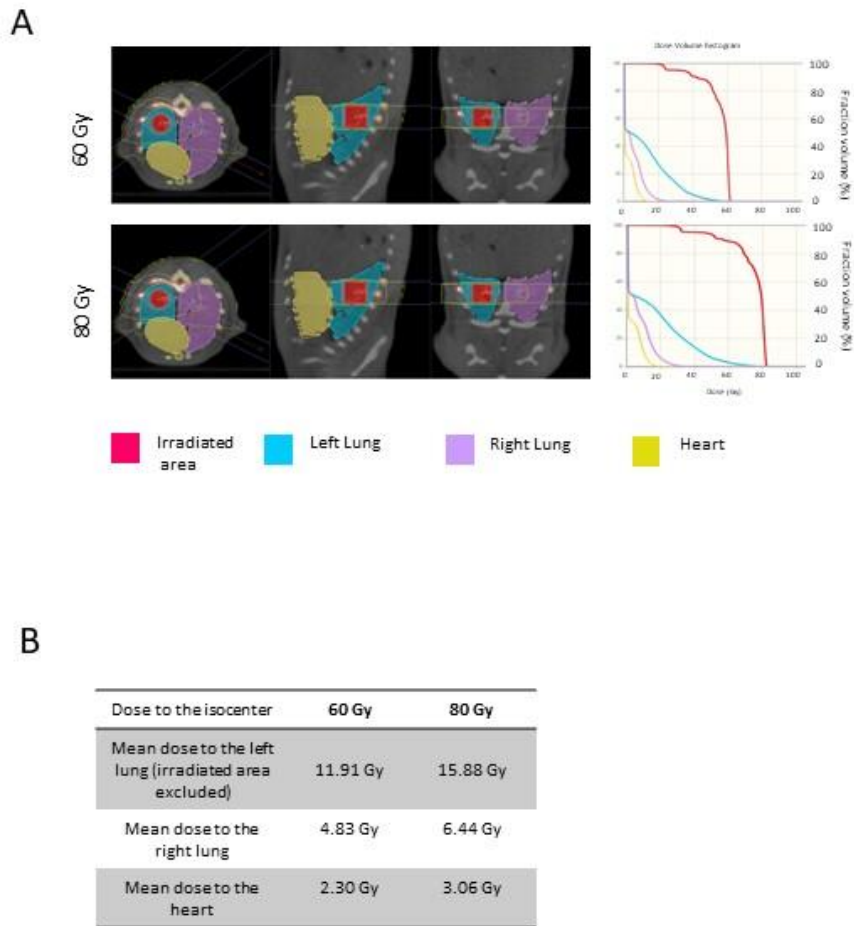


Figure 6: Metabolic reprogramming of WT alveolar macrophages following radiation exposure. A: Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) of 1 498 WT alveolar macrophages showing 7 clusters (left panel, Louvain resolution 0.5) and split by radiation condition, i.e. unirradiated, 1 or 6 months post-60 Gy, and 1 month post-80 Gy exposure (right panel). B: Pseudotime analysis, using Monocle3 package on R, of AM with proliferating macrophages as a starting point (left panel), highlighted in the middle panel by superimposition of pseudotime trajectory and proliferation score. Right panel shows violin plots according to irradiation conditions, identifying proliferating cluster 6. C: Projection of fatty acid metabolism score on alveolar macrophages UMAP (left panel, concerned cells in blue) superimposed with pseudotime trajectory and violin plots according to irradiation conditions (middle panel) identifying cluster 5 concerned by fatty acid metabolism. D: Representative images 1-month post-60 Gy irradiation of CD68 (red)/ApoE (green) co-immunostaining highlighting double-stained macrophages in yellow. Whole lung images scale bar = 2.5mm, details scale bar = 500µm, details with separated colors scale bar = 100µm. E: Projection of cholesterol biosynthesis score on alveolar macrophages UMAP (left panel, concerned cells in blue) superimposed with pseudotime and violin plots according to irradiation conditions (middle panel) identifying cluster 4 concerned by cholesterol biosynthesis. F: Representative images 6 months post-60 Gy irradiation of CD68 (red)/HMGSC1 (green) co-immunostaining highlighting double-stained macrophages in yellow. Whole lung images scale bar = 2.5mm, details scale bar = 500µm, details with separated colors scale bar = 100µm.

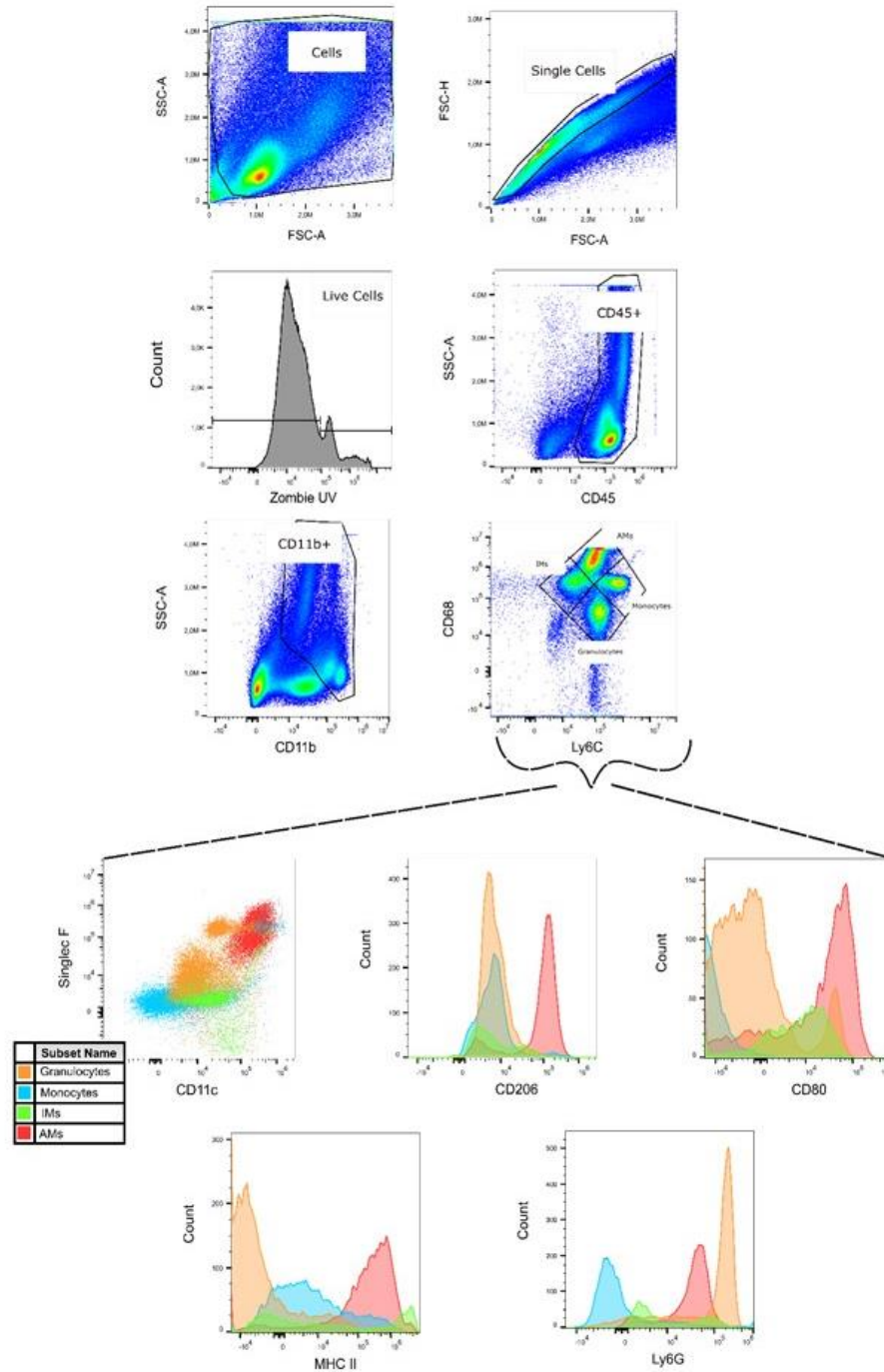
Supplemental figure 1



Supplemental figure 1: Left lung arc therapy.

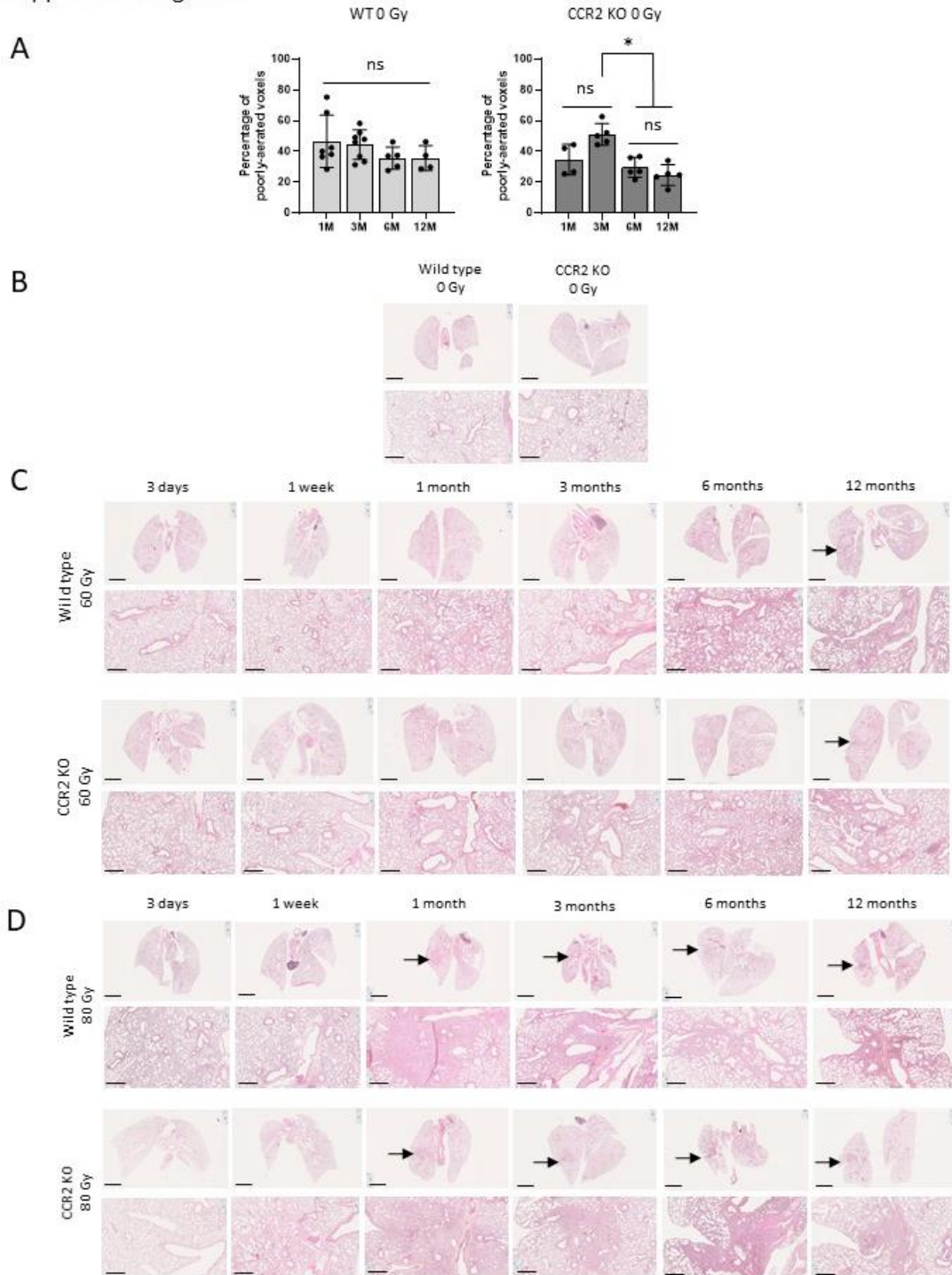
A: Example of isodose curves, organ contouring showing left lung, right lung, heart and irradiated area, and dose-volume histograms using 3-mm beam collimation. B: Examples of mean doses received by the left lung (irradiated area excluded), the right lung and the heart when delivering 60 or 80 Gy to the isocenter.

Supplemental figure 2



Supplemental figure 2: Gating strategy used to characterize lung macrophage populations. Irradiated volume was digested, and cell suspension stained using several markers to identify myeloid cells. Among single, live, CD45+/CD11b+/CD68+ cells, staining strategy identified granulocytes (CD45+/CD11b+/CD68-/Ly6C-/Ly6G+), monocytes (CD45+/CD11b+/CD68+/Ly6C+/Ly6G-), alveolar macrophages (AM: CD45+/CD11b+/-/CD68+/Ly6c+/-/CD11c+/Siglec F+) and interstitial macrophages (IM: CD45+/CD11b+/CD68+/Ly6c-/CD11c-/Siglec F-). CD80/MHC II and CD206 staining allowed to discriminate M1 and M2 phenotypes inside alveolar and interstitial macrophage populations.

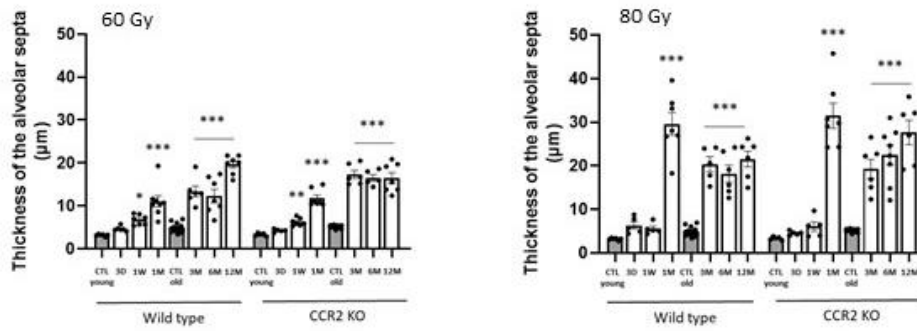
Supplemental figure 4



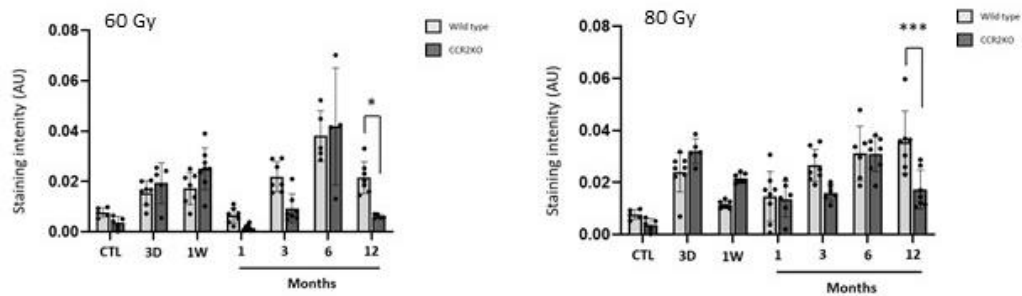
Supplemental figure 4: Poorly aerated volumes data in unirradiated groups and routine histology analyses on HES-stained tissue sections. A: Percentage of poorly aerated volumes in unirradiated WT (left panel) and CCR2 KO mice (right panel) justifying the pooling of 1/3 (“young” controls) and 6/12 months’ time points (“old” controls) for CBCT analyses. One way ANOVA * $p < 0.05$, ns: non-significant. B: Representative images of WT and CCR2 KO unirradiated lung tissues. C: Whole lung images scanned using Nanozoomer and details showing focal lung damage in WT and CCR2 KO mice, 3 days, 1 week, and 1, 3, 6 and 12 months following 60 Gy exposure. D: Whole lung images scanned using Nanozoomer and details showing focal lung damage in WT and CCR2 KO mice, 3 days, 1 week, and 1, 3, 6 and 12 months following 80 Gy exposure. For B, C and D, scale bars represent 2.5 mm for top panels and 500 μm for bottom panels. Arrows indicate tissue fibrosis.

Supplemental figure 5

A

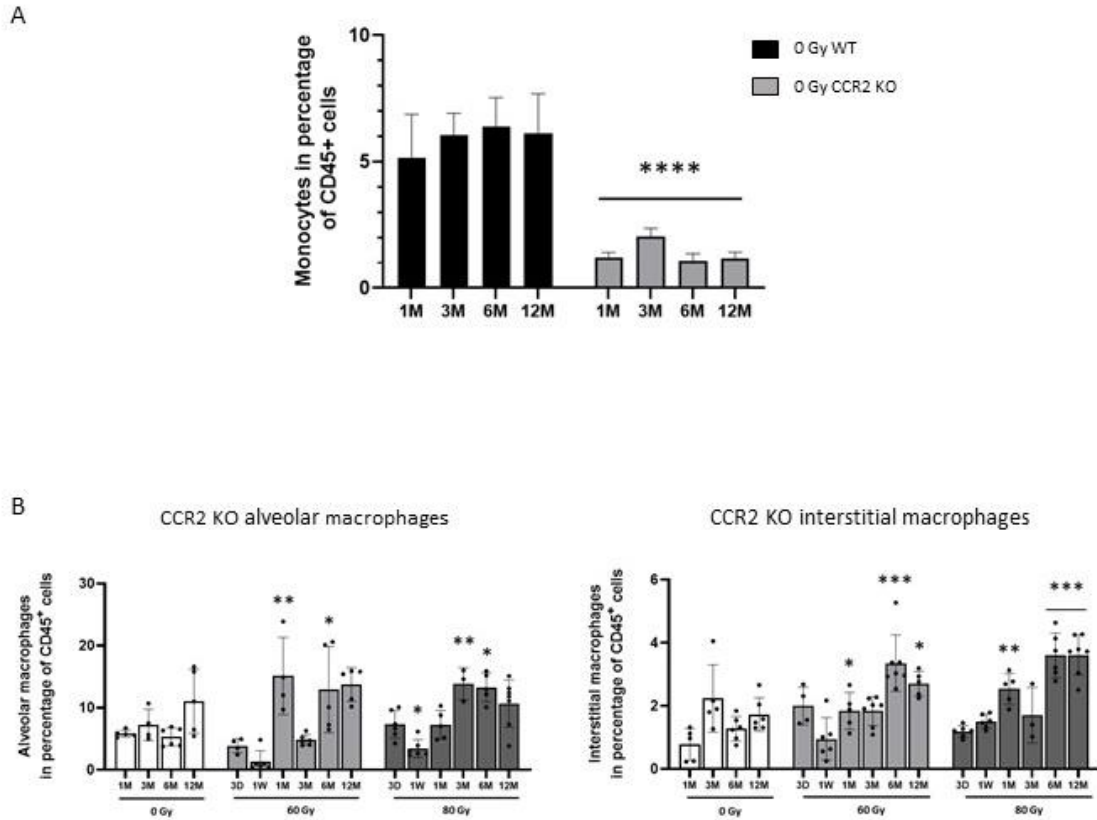


B



Supplemental figure 5: A: Thickness of the alveolar septa measured in wild type and CCR2 KO mice from 3 days to 12 months post-exposure to 60 Gy (left panel) and 80 Gy (right panel). Young control values (CTL young) mean 1 month time point measurements realized in unirradiated animals and serve as control for irradiated animals at 3 days, 1 week and 1-month post-exposure. Old control values (CTL old) mean pooled data from measurements realized in unirradiated animals at 3-, 6- and 12-months' time points and serve as control for irradiated animals at 3-, 6- and 12-months post-exposure. Ordinary one-way ANOVA * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to respective controls. $5 < n < 8$ animals per group. B: Quantification of CD68 staining intensity in control WT and CCR2 KO mice and in irradiated mice 3 days, 1 week, 1-, 3-, 6- and 12-months post-exposure to 60 Gy (left panel) and 80 Gy (right panel). $4 < n < 7$ per group. Ordinary one-way ANOVA * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

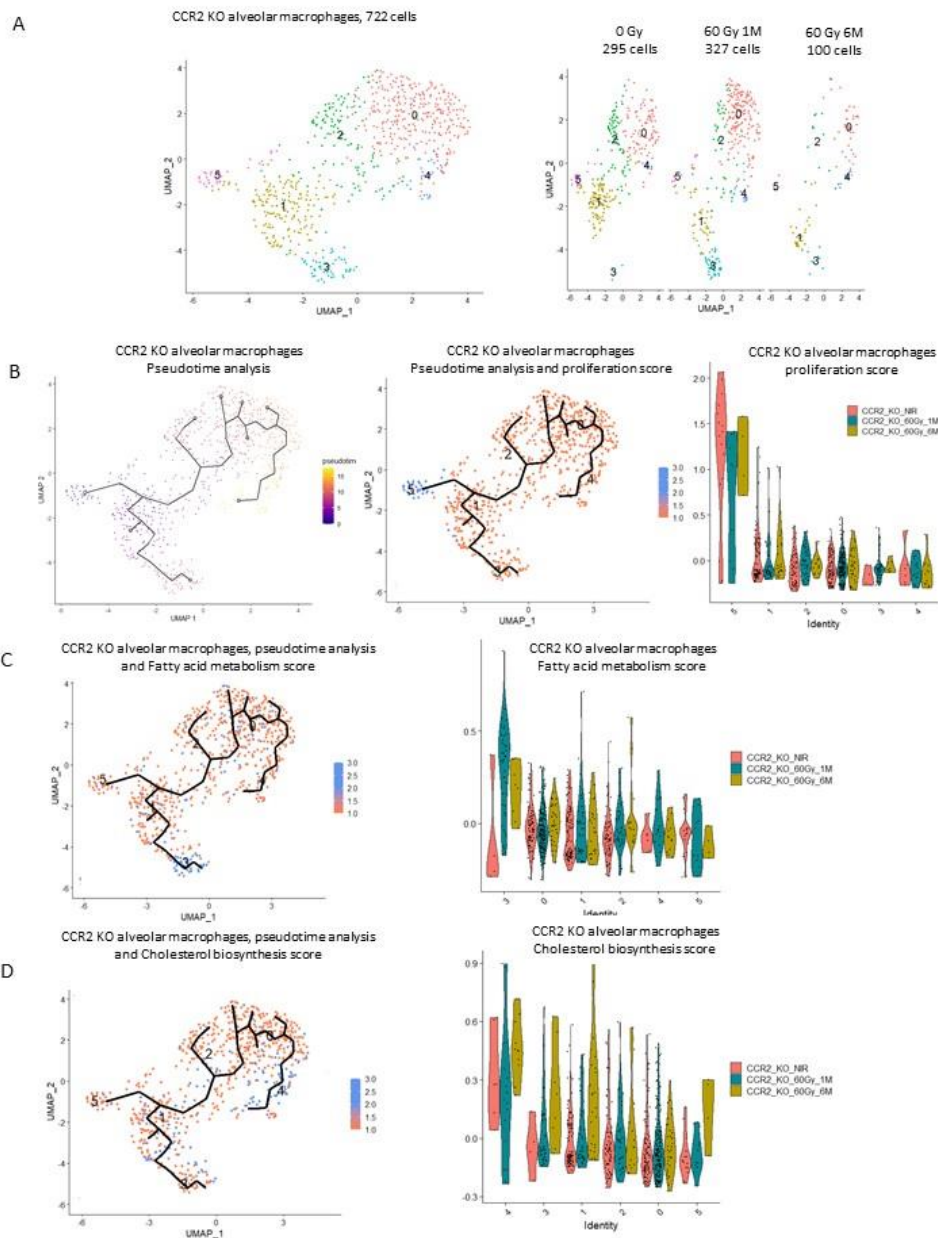
Supplemental figure 6



Supplemental figure 6: Focal lung radiation exposure in CCR2 KO mice is associated with macrophage invasion.

A: Number of monocytes in percentage of CD45+ cells in unirradiated WT and CCR2 KO mice all along the experimental period. B: In CCR2 KO tissues, number of alveolar macrophages (AM, CD45+/CD11b+/-/CD68+/Ly6c+/-/CD11c+/Singlec F+) and interstitial macrophages (IM, CD45+/CD11b+/CD68+/Ly6c-/CD11c-/Singlec F-), expressed as percentage of CD45+ cells, in irradiated area 3 days (3D), 1 week (1W), 1 month (1M), 3 months (3M), 6 months (6M) and 12 months (12M) post-exposure and in corresponding zone in unirradiated lungs from 1 to 12 months post-exposure to 0, 60 or 80 Gy. One month control mice served as controls for 3D, 1W and 1M time-points. 5<n<7 per group. Two-way ANOVA *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Supplemental figure 7



Supplemental figure 7: Metabolic reprogramming of CCR2 KO alveolar macrophages following radiation exposure. A: Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) of 722 CCR2 KO alveolar macrophages showing 6 clusters (left panel, Louvain resolution 0.85) and split by radiation condition, i.e. unirradiated and 1 or 6 months post-60 Gy exposure (right panel). B: Pseudotime analysis, using Monocle3 package on R, of AM with proliferating macrophages as a starting point (left panel), highlighted in the middle panel by superimposition of pseudotime and proliferation score. Right panel shows violin plots according to irradiation conditions, identifying proliferating cluster 5. C: Projection of fatty acid metabolism score on alveolar macrophages UMAP (left panel, concerned cells in blue) superimposed with pseudotime, and violin plots according to irradiation conditions (right panel) identifying cluster 3 concerned by fatty acid metabolism. D: Projection of cholesterol biosynthesis score on alveolar macrophages UMAP (left panel, concerned cells in blue) superimposed with pseudotime, and violin plots according to irradiation conditions (right panel) identifying cluster 4 concerned by cholesterol biosynthesis.

SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS

Animal irradiation procedure

The SARRP (Small Animal Radiation Research Platform, XSTRAHL Ltd., UK) was used to perform left lung focal exposure by arc therapy, using 3 x 3 mm beam collimation. Xstrahl carried out the commissioning of the SARRP platform and the calibration of the MuriPlan treatment planning system, using, for each collimator, a cylindrical ionization chamber for reference dose rate and EBT3 radiochromic films (Ashland ISP Advanced Materials, USA) for depth doses and dose profiles. We then completed the characterization of the SARRP by making Half Value Layer measurements (HVL) and reference dosimetry measurements with an ionization chamber, following the AAPM TG61 protocol (1). EBT3 films were also used to measure dose profiles at different depths with 3 x 3 mm beam collimation. In our configuration, at 1 cm depth, the dose rate is about 2.3 Gy/min in dose to water.

For mice irradiation, profound anesthesia was induced to limit respiratory motion using 100 mg/kg ketamine (Imalgene® 1000) and 10 mg/kg xylazine (Rompun® 2%, Bayer Healthcare, France). The animals were immobilized on a restraint treatment bed. The isocenter was placed on the left lung on the cone beam computed tomography (CBCT) image using the treatment planning system Muriplan®, taking anatomical landmarks for reference. CBCT images were obtained using a 20 x 20 cm uncollimated beam (60 kV, 0.8 mA, inherent and additional filtration of 0.8 and 1 mm of beryllium and aluminum respectively). A total of 236 projections were obtained and a 3D reconstruction image of the mouse was transferred to the Muriplan® dose planning, verification and delivery system. After image segmentation into air, lung, fat, tissue and bone, we then placed the isocenter within the left lung. 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, and an HVL of 0.667 mm of copper. Arc therapy treatment with immobile stage and 220° gantry rotation from -110 to 110° was designed to deliver single doses of 60 Gy (inducing progressive lung fibrosis) or 80 Gy (inducing rapid lung fibrosis).

Micro-computed tomography

Mice were anaesthetized by inhalation of 1.5% isoflurane. Mouse lung imaging was performed using micro-CT Quantum GX2 (PerkinElmer, USA) with respiratory gating at

each study time point. Images were acquired at 90 kV, 88 μ A, with an additional filtration of 0.06 mm of copper + 0.5 mm of aluminum and with a field of view of about 36 mm with a reconstruction of 25 mm, allowing for a voxel size of 50 μ m. The estimated shooting time was about 4 minutes and 512 slices were acquired. The mean dose absorbed by the mice was about 900 mGy in dose to water.

The images were analyzed using AnalyzePro Software (AnalyzeDirect, Inc., USA), which allows for semi-automatic and manual segmentation. The semi-automatic mode was used to define airways and right and left lung volume, with the same threshold range for each mouse in order to be able to compare them. Lesions induced by irradiation - the injury patch - were manually contoured by the same operator. For each mouse, patch volume (when present) was then expressed as percentage of the total lung volume (left lung + right lung + bronchi).

Based on these segmentations and to assess lung parenchyma, volumes were computed, and for each volume, Hounsfield Unit (HU) histograms were extracted using a bin width of 1-HU. For density distribution representation of the irradiated volume, smoothing curves were constructed using GraphPad Prism software applying second order smoothing with 60 neighbors. As a second step, the volume of the left lungs, excluding bronchi but including the irradiated area, was analyzed using HU attenuation thresholds as described by Ruscitti *et al.* in the mouse (2), and more generally by Mecozzi *et al.* (3). Lung tissues were sub-divided into normally aerated ([-900, -435] HU) and poorly aerated ([-435, +500] HU). To favor clarity in these graphs, control data were pooled as 'young controls' corresponding to pooled 1- and 3-months data, serving as controls for the 3 days, 1 week, 1 and 3 months irradiated mice, and 'old controls', corresponding to pooled 6 and 12 months control mice, serving as controls for 6 and 12 months irradiated mice. Finally, quantification of non-aerated volumes was realized by applying a threshold at -100 HU.

Histology and immunohistology

The whole lung was removed, fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Tissue sections (5 μ m) were stained with hematoxylin-eosin-saffron for routine histological examination. Whole lung images were obtained using slide scanner NanoZoomer S60 (Hamamatsu Photonics, France). Measurement of the thickness of the alveolar septa was performed using the VisioL@b 2000 image analysis software (Biocom SA, France). For CD68 immuno-staining, sections were incubated with anti-CD68 antibody (dilution 1:200, Abcam, France) and revealed using Permanent HRP

Green kit (Zytomed, Diagomics, France). Images were processed using the VisioL@b 2000 for CD68 staining quantification. Co-immunostainings of CD68 (1/200) with BrdU (1/250), Ki67 (1/250), ApoE (1/500) and HMGSC (1/500) (all from Abcam), were performed using Opal Multiplex IHC Kit according to the manufacturer's instructions (Akoya Biosciences, USA). For BrdU experiments, 250µl of 5-Bromo-2'-deoxyuridine (10mg/mL, Sigma-Aldrich, France) were injected intra-peritoneally 24h before euthanasia. A total of 28 mice was used, with half for histological studies and half for flow cytometry studies: 0 Gy 1 week (n=6), 0 Gy 2 weeks (n=6), 80 Gy 1 week (n=8) and 80 Gy 2 weeks (n=8).

Tissue digestion and spectral flow cytometry analyses

Lungs were perfused via the right atrium with 10 ml sterile normal saline solution. The injured patch or corresponding volume was dissected and harvested from the left lung and digested. Briefly, samples were placed in gentleMACS C tube (Miltenyi Biotec, France) with 1mg/mL collagenase, 1.5U/mL dispase and 0.1mg/ml DNase I-containing dissociation buffer (Thermo Fisher Scientific, USA). We attached to the sleeve of the gentleMACS Octo Dissociator (Miltenyi) and ran using the "37C_m_LDK_1" program. After termination of the program, the cells were passed through a 70µm strainer (Miltenyi), spun down at 300 x g for 7 min and resuspended in 250 µl of PBS without Mg²⁺/Ca²⁺ (Thermo Fisher). Dead cells were labeled using Zombie UV Fixable Viability Kit (BioLegend, The Netherlands). For the gating strategy, the following antibodies were used: anti-BrdU-APC (Bu20a), anti-CD11b-FITC (Clone M1/70), anti-CD206-APC or AF700 (Clone C068C2), anti-CD68-BV421 (Clone FA-11), anti-CD80-PE Dazzle (Clone 16-10A1), anti-MHCII-PE Cy7 (Clone M5/114.15.2) and anti-Siglec F-PE (Clone S17007L), all from BioLegend, and anti-CD11c-BB700 (Clone HL3), anti-CD24-BV786 (Clone 30-F1), anti-CD45-BUV395 (Clone 30-F11), anti-Ly-6C-BV605 (Clone HK1.4), anti-Ly-6G-APC H7 (Clone A18), all from BD Biosciences, France. The antibodies were diluted as recommended by the manufacturer and we obtained a complexity index of 3.56 for the entire panel. Single cell suspension was fixed and permeabilized with Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer kit (Thermo Fisher) to access the intracellular markers. Membrane and viability markers were used before cell fixation and permeabilization.

Cell suspensions were run on a spectral flow cytometer Cytex® Aurora, with a 5 Laser 16UV-16V-14B-10YG-8R configuration (Cytex Biosciences Inc., USA) using SpectroFlo® 3.0.1 software for visualization, recording and unmixing of data. For the positioning of the populations of interest, fluorescence controls minus one tube for

CD68, CD206 and CD80 markers were performed. Then, unmixed data were extracted into FSC 3.1 files, which were used to perform post-acquisition analyses using FlowJo 10.7.1 software (FlowJo LLC) (BD Biosciences).

Single cell RNA-seq

In total, 30 samples were included in the study: unirradiated (6 WT and 4 CCR2 KO), 60 Gy 1 month (4 WT and 4 CCR2 KO), 60 Gy 6 months (4 WT and 4 CCR2 KO) and 80 Gy 1 month (4 WT). The first steps, from the sampling to the mechanical digestion, were the same as the flow cytometry protocol. After a red cell lysis step (RBC lysis buffer, Thermo Fisher, France), cells were resuspended in 90 μ L of PBS without $Mg^{2+}/Ca^{2+}/0.5\%$ BSA/2 mM EDTA with 10 μ L of CD45 (TIL) MicroBeads (Miltenyi) and passed into MS columns (Miltenyi) to sort CD45-positive cells. For the encapsulation, we loaded 16,000 cells into a 10X Chromium Controller (10X Genomics) and scRNA-seq libraries were prepared using a Single-Cell 3'v3 Reagent Kit (10X Genomics) according to the manufacturer's protocols. Library quantification and quality assessment was performed using the Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Genomics). Indexed libraries were equimolarly pooled and sequenced on a NovaSeq 6000 sequencing system (Illumina Inc., USA) with a minimum depth sequencing at 20,000 read pairs/cell. Single-cell RNA-seq outputs were processed using the Cell Ranger software (10X Genomics). Analysis was performed using the Seurat package (4.1.1) in R (4.1.3) and Monocle3 package (1.2.9) in R (4.2). Quality control metrics including those cells with less than 200 or more than 3000 transcripts profiled or presenting more than 15% of their transcriptome of mitochondrial origin were removed.

1. Ma CM, Coffey CW, DeWerd LA, Liu C, Nath R, Seltzer SM, et al. AAPM protocol for 40-300 kV x-ray beam dosimetry in radiotherapy and radiobiology. *Medical physics*. 2001;28(6):868-93. Epub 2001/07/07.
2. Ruscitti F, Ravanetti F, Bertani V, Ragionieri L, Mecozzi L, Sverzellati N, et al. Quantification of Lung Fibrosis in IPF-Like Mouse Model and Pharmacological Response to Treatment by Micro-Computed Tomography. *Frontiers in pharmacology*. 2020;11:1117. Epub 2020/08/15.
3. Mecozzi L, Mambrini M, Ruscitti F, Ferrini E, Ciccimarra R, Ravanetti F, et al. In-vivo lung fibrosis staging in a bleomycin-mouse model: a new micro-CT guided densitometric approach. *Scientific reports*. 2020;10(1):18735. Epub 2020/11/01.

Nos résultats de l'article soumis nous ont permis de conclure sur la présence de macrophages alvéolaires proliférants et entamé une reprogrammation métabolique vers un phénotype spumeux après irradiation stéréotaxique pulmonaire chez la souris.

Nous voulions également comprendre l'implication du recrutement depuis la circulation des macrophages dans ces lésions pulmonaires induites par irradiation stéréotaxique. Pour cela nous avons réalisés des expériences de parabiose. Cependant, les résultats issus de ces expériences ne nous ont pas permis de conclure clairement. Les détails du protocole utilisés et des résultats obtenus sont décrits dans la section suivante : « Détermination de l'origine de l'envahissement macrophagique radio-induit par le modèle de parabiose ».

Nos observations suggèrent l'impact spécifique des macrophages alvéolaires, et non interstitiels, dans les lésions induites par irradiation stéréotaxique chez la souris. Leurs proliférations, de manière précoce après l'irradiation, semblent être le point de départ de leurs implications dans le développement des lésions induites par l'irradiation stéréotaxique. Nous avons donc souhaité confirmer cette hypothèse en observant le développement des lésions radio-induite en absence de macrophages alvéolaires. Nous les avons donc déplétés en amont de leurs proliférations en réaction de l'irradiation. Les résultats obtenus ne nous ont pas permis de conclure sur cette question scientifique. Les détails du protocole utilisés et des résultats obtenus sont décrits dans la section suivante : « Déplétion des macrophages alvéolaires par instillation intranasale de liposomes clodronate ».

Détermination de l'origine de l'envahissement macrophagique radio-induit par le modèle de parabiose

L'action des macrophages et la possibilité de lutter contre l'envahissement macrophagique dépendent de l'origine des cellules, à savoir par exemple si elles prolifèrent sur place ou si elles sont recrutées à partir de la circulation sanguine. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé le modèle de parabiose. La parabiose est un modèle chirurgical utilisé depuis plus de 150 ans, qui consiste en la connexion via un acte chirurgical de deux organismes vivants qui vont partager un même système circulatoire. La première parabiose a été réalisée par le biologiste français Paul Bert dans les années 1860, démontrant la connexion des systèmes sanguins via la formation de nouveaux capillaires chez deux rats attachés l'un à l'autre (341). Depuis, ce modèle est utilisé dans de nombreuses thématiques de recherche comme l'endocrinologie, l'immunologie, les neurosciences, les cellules souches et l'oncologie, ainsi que dans les études sur le vieillissement et les pathologies associées au vieillissement via ce qu'on appelle la parabiose hétérochronique, liant deux animaux d'âges différents (342, 343).

1) Principe et organisation du projet

Le projet a eu pour objectif de connecter le système sanguin de souris sauvages, destinées à recevoir l'irradiation stéréotaxique pulmonaire, avec le système sanguin de souris GFP, dont les cellules expriment de manière constitutive une protéine verte, la GFP, qu'il est possible de suivre ensuite par immunofluorescence. Une fois la parabiose souris sauvage/souris GFP installée, les deux souris partagent le même système sanguin et présentent 50% des cellules sanguines GFP⁺ et 50% des cellules sanguines non marquées. Suivre ensuite les macrophages GFP⁺ au sein du tissu irradié permet de savoir si, sur le principe, un recrutement a lieu depuis la circulation sanguine vers le tissu lésé après irradiation stéréotaxique. La Figure 25 présente le schéma expérimental.

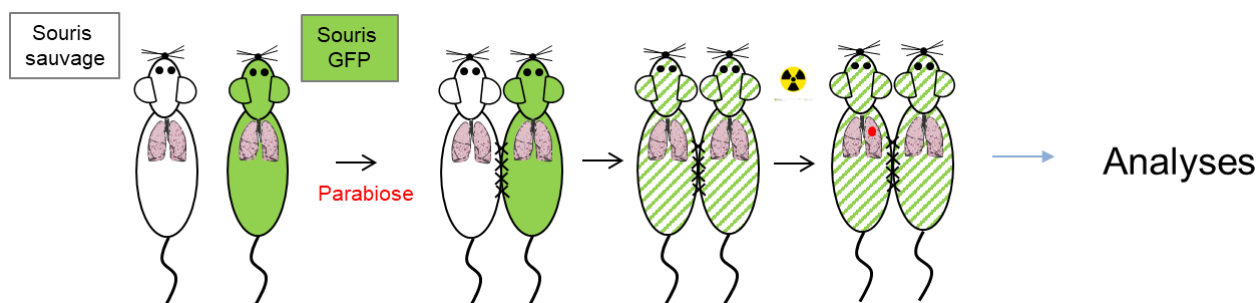


Figure 25: Modèle de parabiose

Des paires sont créées entre une souris sauvage et une souris GFP, entraînant en deux semaines un chimérisme sanguin et la circulation de cellules sanguines GFP⁺ dans l'organisme de la souris sauvage. L'irradiation focale est réalisée sur le poumon gauche de la souris sauvage. La présence de macrophages GFP⁺ après irradiation signe le recrutement depuis la circulation sanguine.

2) Mise au point du modèle de chirurgie

Le modèle de parabiose passe par la mise en place d'une chirurgie lourde, qui demande un temps de mise au point important avec la répétition du geste chirurgical et une gestion fine de l'état clinique des animaux pendant la période post-opératoire.

Des souris, approximativement de même âge, de souche sauvage (femelles C57BL6J, Charles River Laboratories) et des souris exprimant de manière constitutive la GFP (femelles UBC GFP) ont été utilisées pour réaliser les expériences de parabiose. Les souris GFP expriment une protéine fluorescente verte dans toutes leurs cellules. Elles proviennent d'un élevage de l'animalerie de l'IRSN. Les souris ont été placées par paires, une souris sauvage et une souris GFP, pendant 2 semaines d'habituation, afin de limiter le stress au moment de la réalisation des couples parabiose. Pour la chirurgie, les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane (5% en induction, 1,5% en maintien). Une incision est réalisée sur le flanc des animaux, de l'articulation du coude aux genoux. Les jonctions des coudes et des genoux sont suturées ensemble avec du fils de soie (4-0, Ethicon). Des sutures cutanées sont réalisées, peau dorsale contre peau dorsale et peau ventrale contre peau ventrale, avec du fils de soie afin de favoriser la formation d'une circulation sanguine commune (chimérisme sanguin) entre les souris lors du processus de cicatrisation. Trente minutes avant puis immédiatement après la chirurgie, chaque souris a été injectée avec de la Buprénorphine (antidouleur, Buprecare®, 0,1 mg/kg), suivi après la chirurgie par du Carprofren (anti-inflammatoire, Rimadyl®, 10 mg/kg), et du sérum physiologique pour prévenir la déshydratation. Les

souris ont eu un suivi post-opératoire pendant 48 heures par des injections sous-cutanées matin et soir de Buprénorphine et de Carprofen et ont été placées sous Bactrim® (antibiotique, 5ml/100ml, dans l'eau de boisson) pendant 10 jours après la chirurgie pour minimiser les infections. Au bout de deux semaines, le mélange des circulations sanguines a été vérifié par cytométrie en flux après des prélèvements sanguins rétro orbitaux sur chacune des souris du couple parabiose (Figure 26).

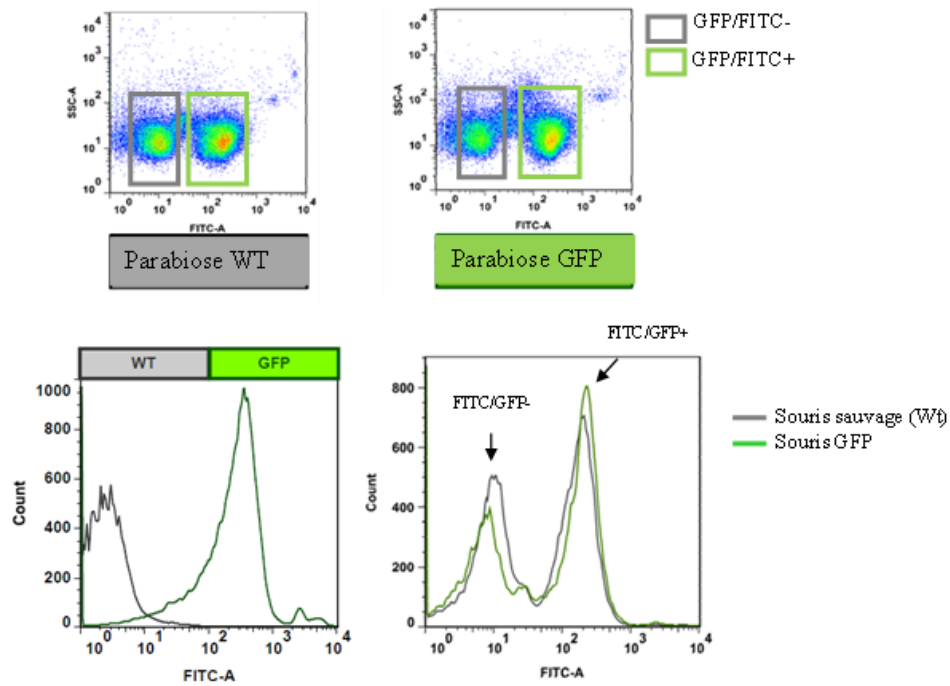


Figure 26 : Chimérisme sanguin dans le modèle de parabiose

Exemples de mesures par cytométrie en flux du marquage GFP/FITC dans le sang circulant d'une souris sauvage (en gris) et d'une souris GFP (en vert) en parabiose depuis 2 semaines.

3) Test de recherche de macrophages GFP⁺ après SBRT pulmonaire chez la souris sauvage

Un premier test a été effectué sur un seul couple parabiotique, dont la souris sauvage a été irradiée à une dose de 80 Gy au niveau du poumon gauche, tout en restant liée à la souris GFP. Un mois après irradiation, le poumon a été prélevé et des marquages immunohistologiques réalisés afin de rechercher des macrophages issus de la circulation sanguine (CD68⁺/GFP⁺). Un premier marquage GFP seul montre de nombreuses cellules GFP⁺ au niveau du patch lésionnel (figure 3 panel haut). Un double marquage CD68/GFP révèle, sur le principe, la présence de macrophages doublement marqués, donc issus de la circulation sanguine (Figure 27, panel bas).

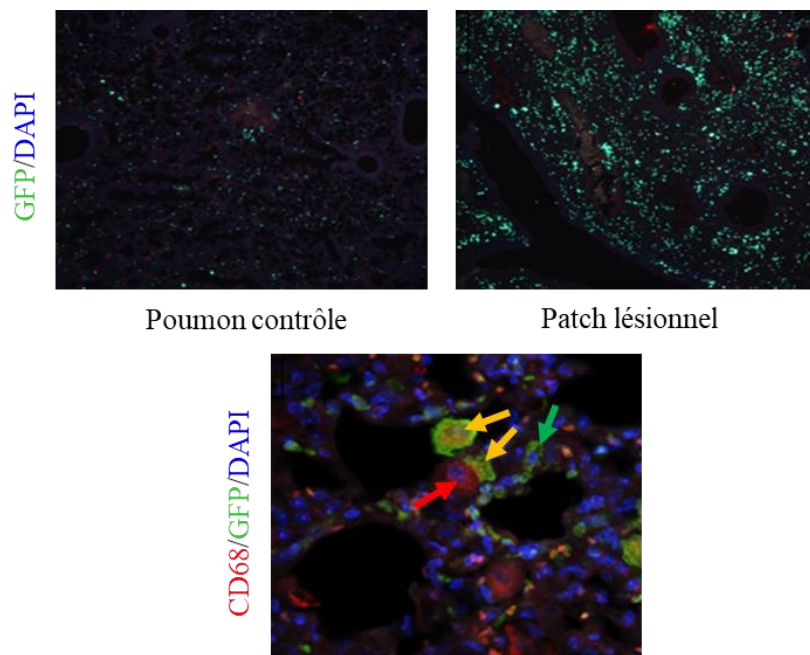


Figure 27 : Recrutement des macrophages dans le modèle de parabiose

Panel haut : exemple de marquage GFP obtenu sur un poumon de souris sauvage en parabiose avec une souris GFP, sur poumon non irradié (à gauche) et sur le patch lésionnel (à droite) 1 mois après irradiation focale à 80 Gy (grossissement x200). Panel bas : co-marquage CD68/GFP des macrophages issus du sang circulant. Flèche rouge: macrophage CD68⁺/GFP⁻; flèche verte: cellule GFP⁺; flèches orange : macrophages issus de la circulation sanguine CD68⁺/GFP⁺ (grossissement x400).

4) Bilan du projet global

Lors de la thèse, 40 couples parabiotiques ont été réalisés (avec 20 souris sauvages et 20 souris GFP). Des infections parabiotiques ont été observées sur quasiment l'ensemble des couples, ce qui nous a obligés à séparer les parabiotés plus tôt que prévu. L'infection parabiotique est caractérisée lorsqu'une des souris du couple faiblit, parfois jusqu'au décès, alors que l'autre prend le dessus. Les parabiotés ont donc été séparés une semaine après la mise en place du chimérisme sanguin, et après vérification de la présence de sang GFP⁺ chez les souris sauvages par cytométrie en flux (Figure 28). Seulement 5 souris sauvages issues des chirurgies de parabiose ont pu être irradiées au SARRP en arc thérapie à 80 Gy. Après prélèvement à 1 mois post-irradiation, les co-marquages CD68/GFP n'ont pas révélé de recrutement des macrophages après irradiation stéréotaxique chez ces souris (Figure 29). Les problèmes rencontrés au cours de ces expérimentations seront discutés dans la discussion de la

thèse, dans la section « Quel est l'impact de l'origine des macrophages dans les lésions pulmonaires induites par irradiation stéréotaxique ? ».

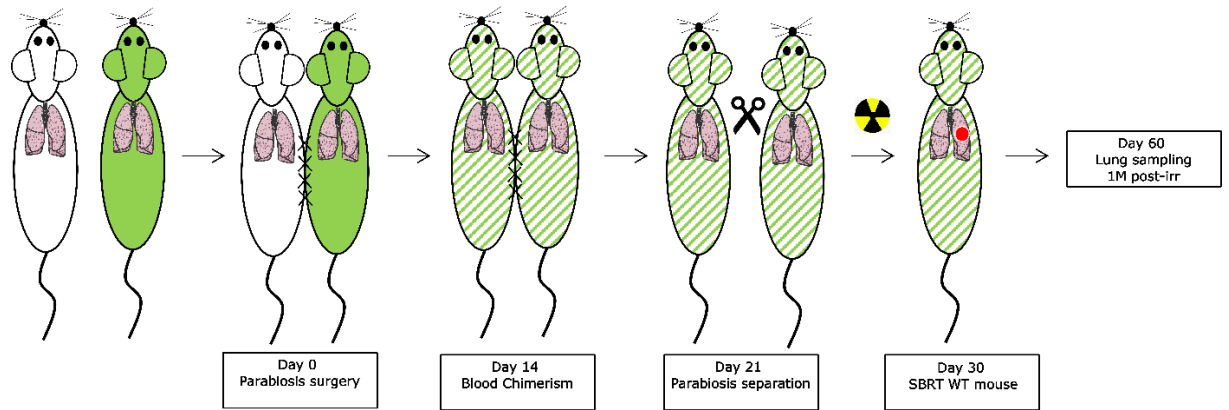


Figure 28 : Protocole de parabiose mis à jour à la suite des problèmes post-opératoires

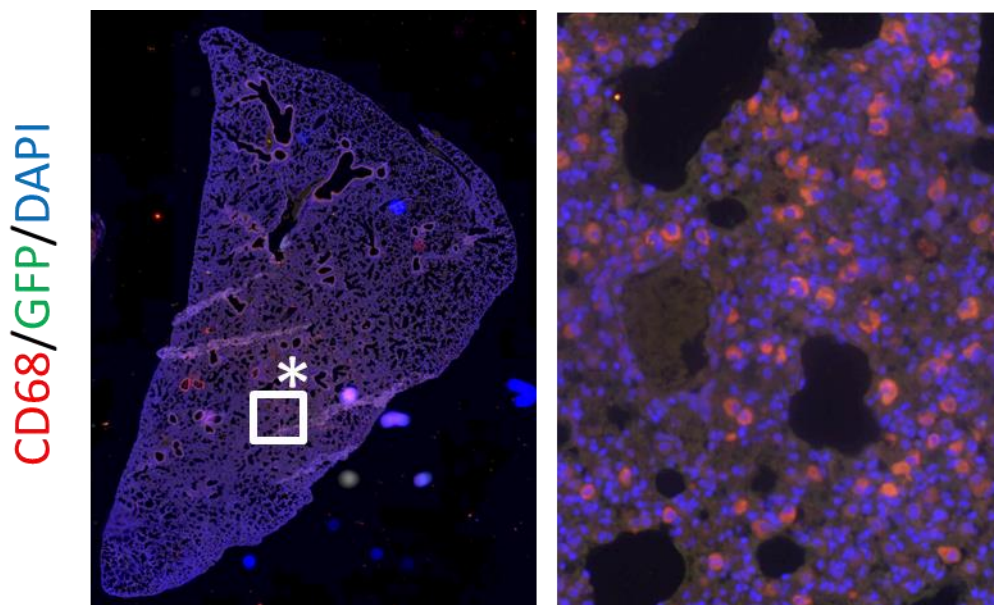


Figure 29 : Absence de recrutement des macrophages dans le nouveau modèle de parabiose
 Images du co-marquage CD68/GFP sur le poumon (à gauche, x40) et détail du le patch lésionnel (à droite, x200) issu d'une des souris sauvage 1 mois après irradiation focale à 80 Gy.

Déplétion des macrophages alvéolaires par instillation intranasale de liposomes clodronate

Les liposomes sont des structures sphériques formées de deux couches lipidiques concentriques. La partie externe est hydrophile et la partie interne est hydrophobe. Entre les deux couches lipidiques on trouve une partie hydrophile au sein de laquelle peuvent être dissoutes des molécules d'intérêt qui se retrouvent encapsulées et peuvent ainsi facilement traverser les membranes lipidiques des cellules. Le clodronate (*dichloromethylene-biphosphonate* ou Cl2MBP), molécule hydrophile, est rapidement éliminé par le système rénal avec une demi-vie de quelques minutes. En revanche, une fois encapsulé dans des liposomes, le clodronate peut pénétrer dans les macrophages qui phagocytent les liposomes. La bicouche lipidique est digérée et le clodronate est libéré au sein des macrophages. Lorsque le clodronate intracellulaire est présent en quantité suffisante, il induit l'apoptose des macrophages. Le clodronate ne peut avoir d'effet que si les liposomes atteignent les macrophages ciblés. La voie d'administration aura donc un impact important (344).

Pour cibler les macrophages alvéolaires, deux voies d'administration peuvent être utilisées : la voie intra-trachéale ou la voie intra-nasale. L'administration intra-trachéale est possible de manière non invasive par intubation via la cavité buccale et permet des administrations répétées, sans dissémination majeure dans le tractus digestif ou dans la circulation sanguine comme observé lors des procédures intra-trachéales chirurgicales (345-347). Une autre voie d'administration est l'instillation intra-nasale. Plus aisée techniquement que la voie intra-trachéale, elle est utilisée en administration unique ou répétée (76, 348).

Objectifs :

Les résultats obtenus par séquençage sur cellule unique dans notre projet ont montré qu'une sous-population proliférante de macrophages alvéolaires, présente très tôt après irradiation d'après les marquages tissulaires réalisés 1 et 2 semaines post-exposition, pourrait être impliquée dans le développement des lésions pulmonaires. Afin d'empêcher cette population macrophagique de proliférer, nous avons donc réalisé une déplétion des macrophages alvéolaires par instillation intra-nasale de liposomes clodronate dès 2 semaines après irradiation à 80 Gy. La déplétion a été maintenue par une administration répétée de liposomes clodronate jusqu'au point d'étude 1 mois post-irradiation (Figure 30). Les animaux contrôles ont été instillés avec des liposomes PBS. Brièvement, deux semaines après irradiation focale à 80 Gy, les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane puis 30 µl de liposomes clodronate

ou liposomes PBS en suspension dans du PBS (Liposoma BV, Amsterdam, Pays Bas) sont instillés dans chaque narine, en fraction de 15 μ l. Les instillations ont été répétées tous les 3 à 4 jours jusqu'au point de prélèvement de l'expérience. Un mois après irradiation, les souris sont euthanasiées et le bloc pulmonaire prélevé pour observation histologique et évaluation de la sévérité globale des lésions pulmonaires radio-induites.

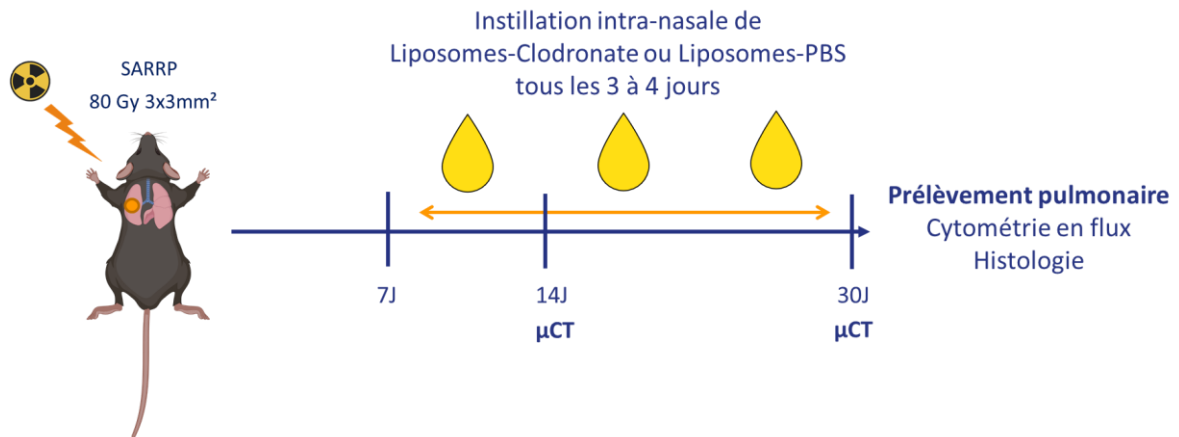


Figure 30 : Déplétion des macrophages alvéolaires par instillation intra-nasale de liposomes clodronate. Les animaux contrôles sont instillés avec des liposomes PBS.

Résultats et évaluation critique :

1) Vérification de la déplétion des macrophages alvéolaires par cytométrie en flux

Les études en cytométrie en flux n'ont pas mis en évidence de déplétion macrophagique significative chez les souris traitées aux liposomes clodronate par rapport aux souris traitées aux liposomes PBS, que les animaux soient irradiés ou non (Figure 31). Nous n'avons pas d'explication concrète pour cet échec de déplétion macrophagique via l'utilisation d'un modèle bien décrit. Cependant, il est connu que l'apoptose des macrophages dépend de la quantité de liposomes phagocytés (344). Contrairement au modèle d'instillation intra-trachéal, le modèle d'instillation intra-nasale peut générer des biais concernant les quantités de liposomes atteignant effectivement les structures pulmonaires profondes, limitant ainsi la possibilité de dépléter de manière efficace les macrophages alvéolaires. En effet, les réflexes d'éternuement, de toux suite à l'instillation, peuvent réduire les quantités instillées et aboutir à une redirection des liposomes vers le tube digestif par déglutition. Une vérification de notre geste technique par instillation intra-nasale de bleu brillant de Coomassie et observation du poumon et de l'estomac pourrait répondre à cette question (345).

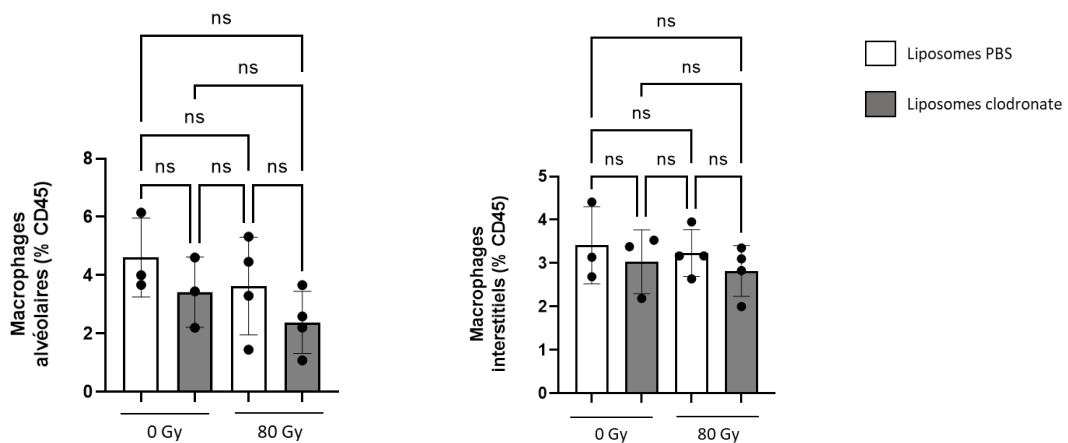


Figure 31 : Quantification des macrophages alvéolaires et interstitiels

Quantification des macrophages alvéolaires et interstitiels, exprimées en pourcentage des cellules CD45-positives, au sein des tissus pulmonaires de souris exposées à 0 ou 80 Gy et instillées avec des liposomes PBS ou clodronate. Les instillations sont réalisées de 2 à 4 semaines post-irradiation et les prélèvements 4 semaines post-irradiation. $3 < n < 4$ souris par groupe.

2) Observations histologiques des souris non irradiées

Nous avons tout de même effectué les études histologiques afin d'observer les tissus pulmonaires des animaux irradiés ou non irradiés, traités aux liposomes PBS ou aux liposomes clodronate. Les observations nous ont amenés à nous poser de nombreuses questions sur ce modèle et à son utilisation par les études publiées qui ne mentionnent souvent pas de données détaillées sur l'effet de l'instillation nasale sur la structure pulmonaire. Nos observations montrent que, par rapport à un tissu pulmonaire de souris ne subissant pas d'instillation intra-nasale, les poumons des souris instillées avec des liposomes PBS ou des liposomes clodronate montrent un infiltrat leucocytaire dense, à la fois périvasculaire et péri-bronchiolique, et une inflammation légère mais globale du parenchyme pulmonaire. La Figure 32 montre des images représentatives des observations, chez les souris traitées aux liposomes PBS montrant l'infiltrat péri-bronchiolique (ligne du haut, flèche), et chez les souris traitées aux liposomes clodronate montrant l'infiltrat péri-vasculaire (ligne du bas, flèche). L'exemple choisi pour les souris traitées aux liposomes clodronate montre la lésion la plus sévère observée, avec une zone tissulaire très inflammatoire localisée sur le poumon droit.

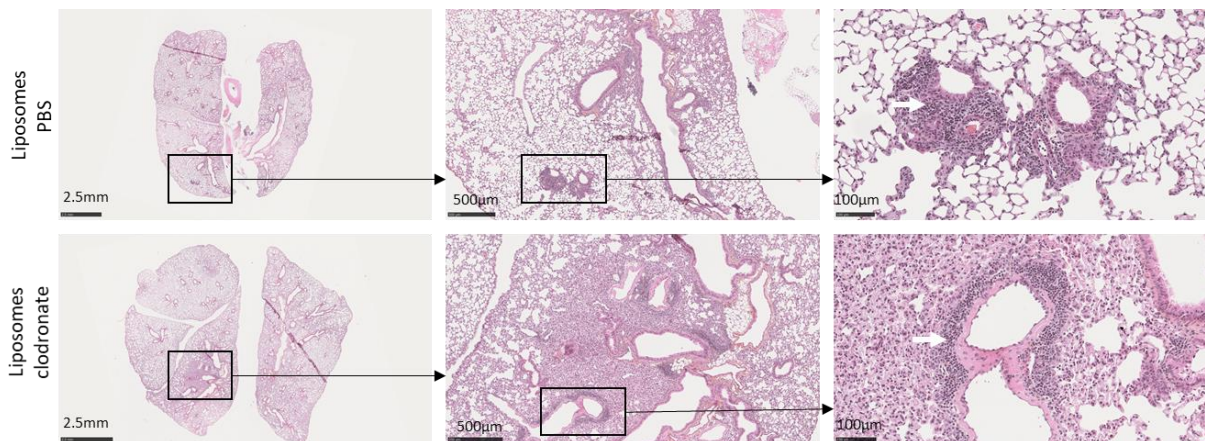


Figure 32 : Images représentatives des dommages observés sur coupes de tissus pulmonaires de souris non irradiées, après instillation intranasale de liposomes PBS ou de liposomes clodronate.

Peu de données sont disponibles dans la bibliographie concernant les conséquences de l'instillation intranasale sur la structure pulmonaire. Froes et al. ont publié récemment un article sur les effets de l'instillation intranasale de différentes solutions sur la réponse inflammatoire pulmonaire, 24h après 5 instillations quotidiennes (349). Toutes ces solutions sont connues pour être mucoactives, c'est-à-dire qu'elles peuvent modifier la sécrétion de mucus par les cellules goblet et déséquilibrer l'homéostasie pulmonaire. Globalement dans cette publication, l'instillation d'eau distillée, de solution saline hypertonique, de solution saline isotonique ou d'une solution de bicarbonate de sodium induit dans tous les cas un déséquilibre rédox et une augmentation des leucocytes présents dans les lavages broncho-alvéolaires, avec une prédominance des lymphocytes et des neutrophiles dans le cas de la solution saline isotonique. Peu d'informations sont données dans cette étude sur la structure pulmonaire globale mais on peut supposer que l'instillation de liposomes, en suspension dans une solution isotonique de PBS, pourrait être responsable des infiltrats inflammatoires observés dans notre cas. Cette hypothèse serait à vérifier.

3) Observations chez les souris irradiées à 80 Gy

Les observations sur souris irradiées sont présentées ici, même si les conséquences de l'instillation en tant que telle présentées plus haut ne permettent pas de conclure quant aux effets du clodronate sur la réponse pulmonaire aux rayonnements ionisants dans notre modèle. Nous n'apporterons donc pas d'interprétation ni de conclusion sur ces expérimentations.

a) Analyses microCT

La figure 4A montre la répartition des voxels du patch lésionnel ou de la zone correspondante en fonction de leur intensité en unités Hounsfield (HU) chez les souris irradiées à 0 Gy ou 80 Gy, instillées avec des liposomes PBS (LP-PBS) ou des liposomes clodronate (LP-CLO), 14 et 30 jours après irradiation. Aucune différence n'est visible entre les souris traitées au LP-PBS et celles traitées au LP-CLO. De la même manière, le volume du patch lésionnel est similaire chez les souris irradiées traitées au LP-PBS ou LP-CLO (Figure 33B). Enfin, la figure 4C montre une augmentation radio-induite du volume pulmonaire pauvrement aéré avec des valeurs similaires chez les souris traitées au LP-PBS ou au LP-CLO 14 jours après irradiation. A 30 jours, l'instillation de LP-CLO montre une tendance à l'augmentation des volumes pauvrement aérés chez les souris non irradiées comme chez les souris irradiées à 80 Gy.

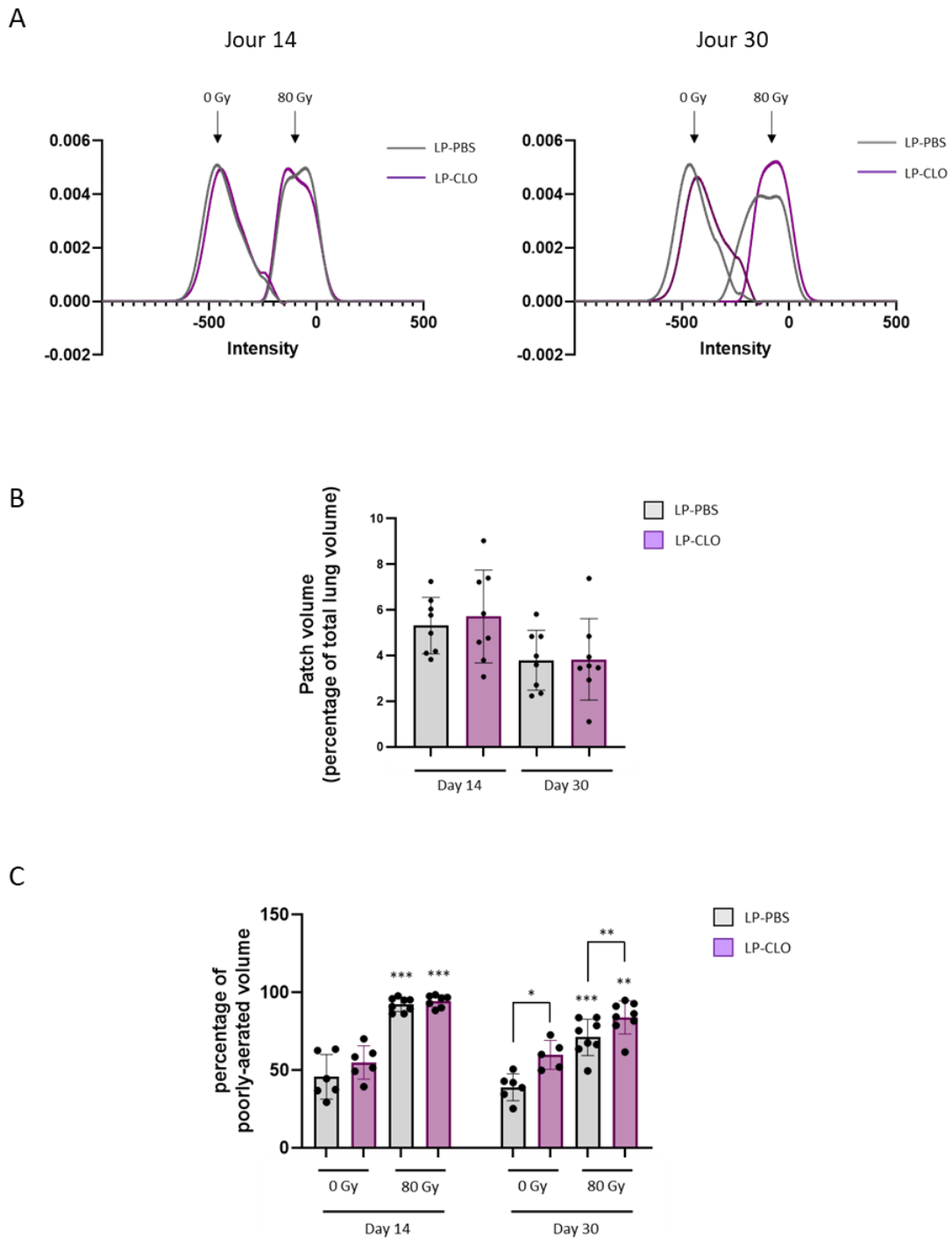


Figure 33 : Analyses des images microCT

A : répartition des voxels en fonction de leur intensité en unités Hounsfield (HU) 14 et 30 jours post-irradiation, au niveau du patch lésionnel chez les souris irradiées traitées au LP-PBS ou LP-CLO, et dans la zone correspondante chez les souris non irradiées traitées au LP-PBS ou LP-CLO. B : Volume du patch lésionnel observé chez les souris irradiées traitées au LP-PBS ou au LP-CLO 14 et 30 jours post-irradiation. C : Pourcentage de volume pauvrement aéré chez les souris irradiées traitées au LP-PBS ou au LP-CLO 14 et 30 jours post-irradiation.

b) Analyses histologiques

Nous n'avons pas observé de différence notable entre les lésions générées chez les souris traitées aux liposomes PBS ou les souris traitées aux liposomes clodronate (Figure 34). Cependant, et considérant les effets propres de l'instillation nasale chez les animaux non irradiés, nous ne sommes pas allés plus loin dans les investigations.

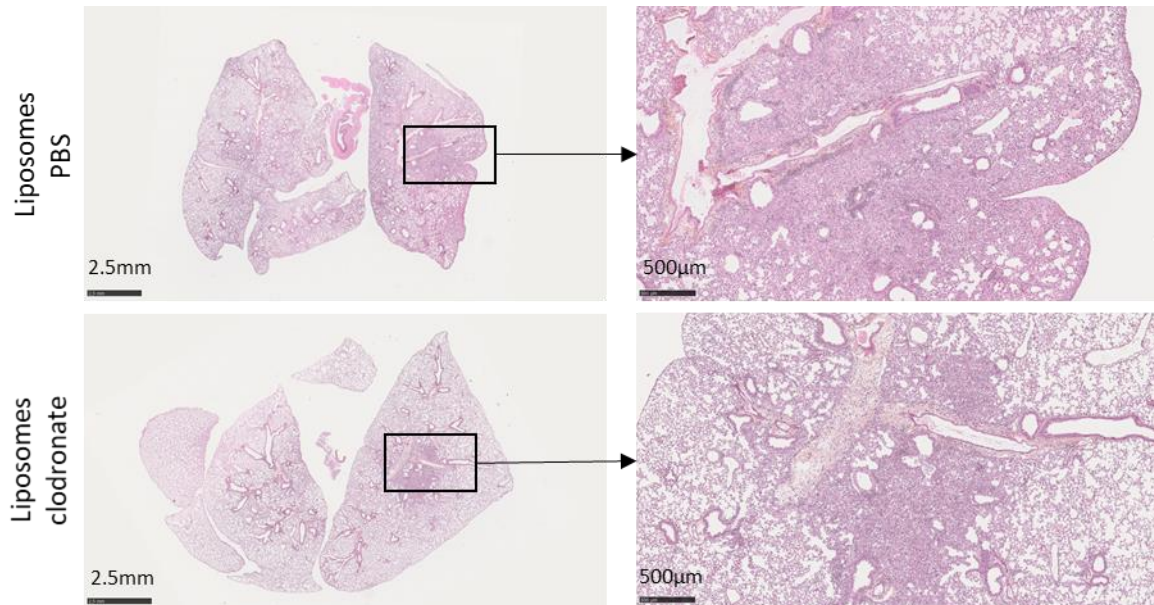


Figure 34 : Images représentatives des dommages observés sur coupes de tissus pulmonaires de souris 1 mois après irradiation focale à 80 Gy, après instillation intranasale de liposomes PBS ou de liposomes clodronate.

Discussion et Perspectives

L'irradiation des poumons induit de nombreux évènements moléculaires et cellulaires qui aboutissent dans un premier temps à une inflammation pulmonaire, la pneumopathie radique, qui peut évoluer en fibrose pulmonaire radio-induite. Les macrophages ont été décrits comme étant des acteurs majeurs impliqués dans le développement de diverses pathologies pulmonaires comme la fibrose idiopathique ou la bronchopneumopathie chronique obstructive. Dans le cadre des lésions radio-induites, les macrophages ont également montré leur importance mais ont souvent été étudiés dans des modèles d'irradiation de l'ensemble du thorax, et beaucoup moins dans des modèles précliniques d'exposition de petits volumes pulmonaires, plus proches des conditions cliniques. Au cours de cette thèse, nous avons caractérisé les macrophages présents à la lésion dans un modèle d'irradiation d'un petit volume pulmonaire, mimant l'irradiation en conditions stéréotaxiques. L'hétérogénéité des phénotypes macrophagiques compliquant souvent leur caractérisation, nous avons fait le choix d'utiliser des techniques innovantes comme le séquençage de cellules uniques et la cytométrie spectrale. Bien que dans la littérature il soit généralement admis que les macrophages après irradiation s'orientent vers un phénotype M2-like, mes résultats montrent que considérer uniquement le processus de polarisation ne suffit pas à caractériser les macrophages présents à la lésion. Nous avons par exemple observé la présence de macrophages issus de différentes origines, ce qui pourrait conditionner le choix des stratégies thérapeutiques, ou influencer différemment le processus lésionnel. De plus, les macrophages après irradiation semblent s'orienter vers un phénotype spumeux, avec un détournement de leurs voies métaboliques vers la biosynthèse de cholestérol. Les macrophages spumeux ont été mis en évidence notamment dans la fibrose idiopathique pulmonaire comme étant des acteurs pro-fibrosants et pourraient donc être une piste thérapeutique intéressante pour la fibrose pulmonaire radio-induite. L'objet de cette section est de discuter les limites de mes résultats d'un point de vue technique mais également de les mettre en perspective avec les connaissances déjà observées dans la littérature scientifique sur le sujet. Mes résultats ouvrent vers des perspectives directes de recherche sur la thématique du rôle des macrophages dans la réponse des tissus sains aux rayonnements ionisants mais suggèrent également l'importance de continuer à implémenter les modèles précliniques pour s'adapter aux nouvelles pratiques de radiothérapie. La notion de volume irradié semble être centrale dans le développement des lésions radio-induites pulmonaires. En effet, nos résultats ne s'accordent pas complètement avec ceux déjà observés dans des modèles d'irradiation du thorax entier chez la souris. Nous pouvons supposer que vu les différences observées sur les sous-populations macrophagiques, la caractérisation d'autres populations cellulaires, endothéliale ou épithéliale par exemple, montrerait également des divergences avec les conclusions résultant des modèles d'irradiation de l'ensemble du thorax.

Est-ce que le modèle d'irradiation pulmonaire au SARRP est le plus pertinent ?

Pour caractériser l'implication des macrophages dans le développement des lésions pulmonaires, mais également pour la plupart des données connues sur l'effet de l'irradiation sur le poumon sain, le modèle murin majoritairement utilisé est l'irradiation en thorax entier, en doses uniques généralement de 12 à 20 Gy. Le plus souvent, les animaux sont irradiés avec des accélérateurs linéaires de photons de haute énergie (LINAC), similaires à ceux utilisés en radiothérapie clinique. La souche de souris la plus couramment utilisée est la souche C57BL/6J. Cette souche est connue pour développer une fibrose pulmonaire après irradiation, bien qu'il faille utiliser des doses plus importantes que pour d'autres souches de souris plus radiosensibles (350). Ce modèle d'irradiation a permis de comprendre de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu au sein du poumon en réponse à l'exposition aux rayonnements ionisants. L'inflammation radio-induite, l'activation vasculaire, la sénescence, l'apoptose et l'activation de différents types cellulaires pulmonaires ont pu être étudiés grâce à ce modèle d'irradiation du thorax entier (76, 295, 351, 352). Plus spécifiquement concernant les macrophages, des études utilisant le modèle d'irradiation de l'ensemble du thorax ont démontré un envahissement macrophagique du tissu, issu du recrutement monocytaire en particulier via la voie CCR2, la polarisation des macrophages une fois dans le tissu vers un phénotype M2-like, et enfin l'implication des macrophages interstitiels, plutôt qu'alvéolaires, dans le développement des lésions pulmonaires radio-induites (76, 252, 325). Finalement, nos résultats ne vont pas dans le même sens que les données issues de la littérature. D'une part, nos résultats montrent que l'infiltrat macrophagique observé après irradiation stéréotaxique est bien issu pour une part du recrutement monocytaire mais probablement indépendamment de la voie CCR2, et nous avons également mis en évidence la présence de macrophages alvéolaires proliférants. D'autre part, le phénotype d'activation des macrophages présents à la lésion focale pulmonaire ne s'inscrirait pas dans la dichotomie M1/M2, mais plutôt dans une reprogrammation métabolique qui aboutirait à leur activation en macrophages spumeux. La grande différence dans notre étude par rapport à la majorité des données publiées est l'utilisation d'un modèle d'irradiation focale pulmonaire, n'irradiant qu'une petite partie du volume pulmonaire total. En effet, les limites importantes des modèles d'irradiation en thorax entier sont d'une part l'exposition du cœur et des gros vaisseaux, et d'autre part, l'exposition de la totalité du volume pulmonaire, volume bien plus important que les volumes irradiés en conditions cliniques. En effet, lors des radiothérapies pulmonaires, jamais l'intégralité des poumons n'est irradiée. De plus, l'utilisation

croissante de la radiothérapie stéréotaxique irradiant de petits volumes à de fortes doses par fraction incite le déploiement de modèles précliniques plus pertinents et leur implémentation pour se rapprocher au maximum des conditions cliniques.

Notre modèle d'irradiation stéréotaxique en arc thérapie a été mis au point au laboratoire, prenant en compte dans un premier temps les données existantes. En effet, les premiers modèles d'irradiation focale chez la souris ont été mis en place en Corée par l'équipe de Cho *et al* (353, 354). Ils utilisent un irradiateur X-RAD 320 équipé d'un système de collimation et d'un système d'imagerie. Leur modèle consiste en une irradiation avec un faisceau unique dans la direction dorso-ventrale, avec un débit de dose de 5,6 à 9,8 Gy/min, un collimateur de 3x3 mm² et une dose unique de 90 Gy (355). Dans ces conditions, les animaux développent une fibrose pulmonaire rapide. Cependant, ce système d'irradiation en faisceau unique induit une grande toxicité à la peau. En effet, 2 à 3 semaines après irradiation, les animaux développent une radionécrose cutanée qui empêche l'étude des temps tardifs. Pour contourner ce problème de radionécrose cutanée, lors du développement du modèle au laboratoire, il a été choisi de délivrer la dose en arc thérapie avec l'utilisation d'un SARRP (293). Cet irradiateur est associé à un système d'imagerie scanner qui permet de guider le positionnement de l'isocentre, où la dose sera délivrée. Un scanner corps entier de la souris à irradier permet la planification de l'irradiation avec le logiciel Muriplan®. Ce logiciel est semblable aux logiciels utilisés en clinique et adapté au petit animal. Il permet de réaliser une planification de traitement de manière similaire à ce qui est réalisé en clinique. L'angle de 240° utilisé permet d'être tangent au cœur tout au long de la délivrance de la dose et ainsi éviter une irradiation cardiaque à trop forte dose. L'isocentre est placé sur le poumon gauche. Lors des premières irradiations au SARRP au laboratoire, le volume cible avait été placé au niveau du poumon droit afin d'éviter toujours plus l'irradiation du cœur. Cependant, le poumon droit des souris étant composé de 3 lobes, la lésion radio-induite s'étalait sur les 3 lobes, compliquant les prélèvements et les analyses histopathologiques. L'irradiation du poumon gauche, composé d'un seul lobe chez la souris, a permis de pallier ce problème. Le logiciel Muriplan® permet de calculer la distribution de la dose dans le volume cible. En effet, il donne accès aux histogrammes dose/volume et aux courbes isodoses. Cela permet de calculer les doses moyennes reçues par les différentes structures en dehors du volume cible. De nombreuses études cliniques montrent en effet que plus les volumes de tissus recevant 5 Gy, 10 Gy ou 20 Gy sont importants, plus le risque de développer une pneumopathie radique est élevé (223, 231, 356). L'énergie moyenne utilisée pour l'irradiation au SARRP est de 60 keV, c'est donc une irradiation de basse énergie, contrairement aux énergies utilisées en clinique qui sont de l'ordre du MeV. Cette différence d'énergie peut être une limite de notre modèle, néanmoins pour l'instant il nous est impossible d'irradier d'aussi petits volumes avec le LINAC. Peu de données

existent dans la littérature sur les effets biologiques des différentes énergies de rayonnements ionisants. Au laboratoire, des projets de recherche sont en cours afin d'acquérir des connaissances sur l'impact des modifications d'énergie sur les réponses cellulaires et tissulaires aux rayonnements ionisants (357).

Le modèle murin d'irradiation stéréotaxique en arc thérapie que j'ai utilisé pendant ma thèse a été caractérisé au laboratoire pendant la thèse d'Annaïg Bertho et grâce à un travail conjoint avec le docteur Morgane Dos Santos, physicienne. La thèse d'Annaïg Bertho a permis de caractériser les effets de différentes doses et de différents volumes d'irradiation stéréotaxique du poumon chez la souris. C'est sur la base de ses résultats que nous avons choisi les doses d'irradiation et le collimateur utilisés durant mon projet. Dans l'analyse de l'effet volume que Bertho *et al.* ont réalisée, utilisant une dose unique de 90 Gy, publiée précédemment par Cho *et al.*, le collimateur de diamètre 1mm ne permettait pas d'induire de fibrose pulmonaire (293). De plus, ils ont observé que l'utilisation des collimateurs de 7x7 mm² et 10x10mm² induisait l'apparition de bronchiolite oblitérante dans les poumons des souris qui impactait leur survie (293). Le collimateur 3x3 mm², quant à lui, permet d'une part d'induire la fibrose pulmonaire radio-induite, et d'autre part de garantir la survie des souris pour l'observation des temps tardifs. De plus, le collimateur de 3x3 mm² permet d'irradier un volume pulmonaire de 0,021 cm³, représentant environ 4% du volume pulmonaire total de la souris (0.5 cm³). Chez l'Homme, la radiothérapie stéréotaxique traite des tumeurs assimilées à des sphères de 7 cm de diamètre maximal, ce qui représente 1 à 4% du volume pulmonaire total humain.

L'effet de la dose totale d'irradiation a également été caractérisé pendant la thèse d'Annaïg Bertho. Les doses uniques en dessous de 60 Gy n'ont pas permis d'induire une fibrose pulmonaire à 6 mois post-irradiation chez les souris. En effet, Bertho *et al.* ont montré que pour générer la fibrose pulmonaire radio-induite il était nécessaire d'induire la prolifération réactionnelle des pneumocytes de type II dans la zone pulmonaire irradiée (293). La dose unique de 60 Gy semble être une dose charnière qui permet d'observer la mise en place d'une fibrose progressive. Il n'y a pas d'opacification des poumons jusqu'à 6 mois post-irradiation mais les effets de l'irradiation sont observables dès 1 mois post-irradiation, avec l'épaississement des septas alvéolaires, la diminution du nombre de cellules club et la prolifération des pneumocytes de type II (293). Le délai d'apparition de la fibrose observé avec cette dose unique de 60 Gy permet de se rapprocher de la cinétique d'apparition de la fibrose pulmonaire chez l'Homme après radiothérapie. Nous avons d'ailleurs choisi dans ma thèse d'utiliser cette dose afin de modéliser une fibrose progressive mais nous n'avons observé l'apparition du patch fibreux via l'imagerie scanner qu'à partir de 12 mois post-irradiation chez nos souris, et non 6 mois comme dans les travaux d'Annaïg

Bertho. Toujours dans l'étude de Bertho *et al.*, la dose de 80 Gy a été caractérisée comme induisant une fibrose rapide, avec l'apparition d'une opacification pulmonaire à partir de 1 mois post-irradiation (293). La fibrose pulmonaire observée, après irradiation à 80 Gy est une fibrose à développement rapide qui serait la conséquence directe d'une réaction inflammatoire sévère et précoce. Après irradiation à 80 Gy, nous observerions donc des effets tardifs dits « conséquentiels ». Les effets tardifs conséquentiels se différencient des effets tardifs dits « primaires » par le temps d'apparition après le traitement et sont définis comme la conséquence directe d'effets précoces sévères (358). En effet, en clinique, les effets tardifs primaires se développent des mois voire des années après le traitement par radiothérapie. Les effets tardifs conséquentiels résultent des effets précoces sévères ne parvenant pas à cicatriser et persistant au point de devenir chroniques. Bien que le concept d'effet conséquentiel soit encore controversé, de nombreuses études montrent une composante conséquentielle dans les lésions pulmonaires tardives chez l'Homme. En effet, Dörr *et al.* et Slanina *et al.* observent que les fibroses pulmonaires radio-induites tardives que les patients développent font suite à l'observation préalable de pneumopathies radiques inflammatoires précoces (359, 360). Dans les études précliniques, l'observation d'effets tardifs primaires n'est pas évidente car les modèles précliniques, quel que soit l'organe étudié, utilisent la plupart du temps de fortes doses uniques, générant ainsi de la fibrose tissulaire faisant suite à une inflammation précoce sévère, sans transition anatomopathologiquement silencieuse comme cela peut être observé chez l'homme. Pour ma thèse, nous avons choisi d'utiliser également la dose de 80 Gy afin de pouvoir comparer l'impact des macrophages dans la mise en place d'une fibrose progressive, avec la dose unique de 60 Gy, et d'une fibrose rapide après une dose unique de 80 Gy.

Le modèle d'irradiation que nous utilisons nous permet de nous rapprocher des pratiques cliniques en termes de volume. En revanche, comme dans le cas de la quasi-totalité des modèles précliniques publiés étudiant les dommages radio-induits aux tissus sains, l'utilisation d'une dose unique est discutable. En effet, en radiothérapie clinique, la dose prescrite à la tumeur n'est jamais délivrée en dose unique. En clinique, la dose totale est fractionnée, et en SBRT pulmonaire le protocole est administré en hypofractionnement sévère, le plus sévère étant de 3x22 Gy. Pour autant, ni le protocole de 3x20 Gy, ni celui de 5x20 Gy chez la souris (collimateur 3x3mm², 1 fraction tous les deux jours) ne génèrent de fibrose 6 mois post-irradiation. Pour le protocole de 5x20 Gy, aucune fibrose observable en imagerie microCT n'apparaît jusqu'à 15 mois post-irradiation (286, 361). Dans leur étude sur l'effet du fractionnement de la dose en SBRT préclinique chez la souris, Bertho *et al.* ont d'ailleurs montré que pour qu'un protocole de fractionnement chez la souris soit fibrosant à 6 mois post-irradiation, la BED_{3Gy} doit être supérieure à 1000 Gy (361). Les auteurs ont choisi d'observer l'effet du

fractionnement à 6 mois post-irradiation car compte tenu de la durée de vie de la souris, en moyenne 2 ans, cela permettait d'observer l'apparition de la fibrose dans des délais excluant le vieillissement des animaux. Afin de réaliser les protocoles de fractionnement étalés sur une semaine et en 3 fractions (20, 28, 40 et 50 Gy par fraction, 1 fraction tous les deux jours), la dose par fraction doit être au moins de 40 Gy pour observer la fibrose pulmonaire chez toutes les souris irradiées, 6 mois post-irradiation. Notons qu'il serait probablement possible d'observer de la fibrose pulmonaire radio-induite, avec des doses par fraction plus faibles, en augmentant le nombre de fractions ou en allongeant le temps d'observation, avec les limites que cela comporte sur la lourdeur des irradiations et le vieillissement des animaux. Finalement, dans notre modèle de SBRT pulmonaire, les protocoles fractionnés induisant une fibrose pulmonaire ne permettent pas de se rapprocher plus, en termes de dose, des protocoles utilisés en clinique, la radiosensibilité de la souris étant trop différente de celle de l'Homme. La publication de Bertho *et al.* pose d'ailleurs la question de la nécessité de fractionner la dose dans notre modèle. Dans le cadre de l'étude du poumon radique, la priorité est de générer une lésion pulmonaire chez tous les animaux, plutôt que de comparer des schémas de fractionnement utilisés en clinique, dont les conséquences tissulaires seraient forcément plus hétérogènes, reflet de la réalité clinique peut-être mais difficiles à gérer dans un programme de recherche. Enfin, les modèles précliniques d'irradiation en thorax entier et en hémithorax utilisent déjà des doses (souvent uniques) très différentes de celles utilisées en clinique. Ces modèles ont néanmoins permis de décrypter et de comprendre de nombreux processus tissulaires, cellulaires et moléculaires radio-induits, et offrent des pistes thérapeutiques prometteuses (362). Ainsi, notre modèle d'irradiation stéréotaxique pulmonaire chez la souris permet de se rapprocher des volumes irradiés en SBRT pulmonaire en clinique, ce qui, d'après ce que nous avons observé sur les macrophages, semble avoir un impact important sur les effets observés dans les tissus après irradiation et pourrait non pas remettre en cause ce qui est déjà connu mais affiner les données en prenant en considération l'impact du volume irradié.

Nous avons réalisé une cinétique très large pour ce projet de thèse, avec des points à 3 jours, 1 semaine, et 1, 3, 6 et 12 mois post-irradiation. Contrairement à ce qui a été observé au cours de la thèse d'Annaïg Bertho, la dose unique de 60 Gy n'a pas permis l'observation via l'imagerie scanner d'une fibrose pulmonaire radio-induite à 6 mois post-irradiation, mais seulement à 12 mois post-irradiation. Cette différence sur le développement de la fibrose à une dose donnée n'est pas inédite. La dose de 60 Gy pourrait être une dose considérée comme charnière en radiobiologie, associée à une variabilité importante dans le développement des dommages tissulaires d'une campagne d'irradiation à l'autre. Irradier plus d'animaux pourrait aider à répondre à cette question. Le développement de la fibrose peut aussi être influencé par de

nombreux paramètres et varier en fonction des différentes souches de souris. Cela nous a tout de même permis de modéliser l'installation de la fibrose progressive et c'est pourquoi nous avons conservé cette dose dans notre étude. Nous observons donc la mise en place d'une fibrose progressive radio-induite avec la dose unique de 60 Gy, et d'une fibrose rapide pour la dose unique de 80 Gy. Pour caractériser la lésion, nous avons réalisé des images scanner de haute résolution du thorax des souris à tous les temps d'étude. La variation d'intensité des voxels, en unités Hounsfield (HU), reflète la densification du tissu pulmonaire. Après irradiation à 60 Gy, nous avons observé le décalage de la courbe HU vers la droite, marqueur de la présence du patch fibreux, à partir de 12 mois post-irradiation. Après irradiation à 80 Gy, ce décalage de la courbe apparaît à partir de 1 mois post-irradiation et persiste jusqu'à 12 mois. En ce qui concerne les macrophages, on observe un infiltrat macrophagique après les deux doses d'irradiation. Pour la dose de 60 Gy, les macrophages sont observables sur les images histologiques des poumons des souris en amont de l'opacification observée sur les images des scanners thoraciques. Bien que cela soit encore difficile à démontrer, ces observations semblent indiquer que les macrophages présents après irradiation pourraient être la cause et non la conséquence de la lésion fibreuse observée. Dans d'autres modèles de fibrose pulmonaire, la présence des macrophages en amont du développement de la fibrose a également été observée. C'est le cas par exemple dans la fibrose induite par la bléomycine chez la souris. La fibrose pulmonaire est observée histologiquement à partir de 14 jours après instillation de bléomycine alors que le pourcentage de macrophages dans les lavages bronchoalvéolaires des souris est significativement augmenté à partir de 3 jours post-instillation, avec un pic à 7 jours post-instillation. L'invasion des macrophages alvéolaires est d'ailleurs corrélée au dépôt de collagène observé dans les poumons des souris (363). Dans notre étude, pour les deux doses d'irradiation, l'infiltrat macrophagique apparaît à partir de 1 mois post-irradiation et se localise autour de la lésion. Les analyses histologiques nous fournissent une information sur la localisation des macrophages mais ne permettent ni une analyse quantitative des macrophages présents à la lésion, ni la distinction entre les macrophages alvéolaires et interstitiels. Nous avons donc réalisé des analyses en cytométrie en flux spectrale. La stratégie de gating utilisée a permis de différencier les macrophages alvéolaires ($CD45^+/CD11b^+/CD68^+/Ly6C^{+/-}/CD11c^+/SiglecF^+$) et les macrophages interstitiels ($CD45^+/CD11b^+/CD68^+/Ly6C^-/CD11c^-/SiglecF^-$). Les macrophages alvéolaires, après irradiation à 60 Gy, sont significativement augmentés par rapport aux contrôles 3 mois post-irradiation. Les macrophages interstitiels, eux, ne montrent pas d'augmentation significative par rapport aux contrôles mais une diminution à 12 mois post-irradiation. Pourtant, Meziani *et al.* observent, avec leur modèle d'irradiation du thorax entier chez la souris, une augmentation des macrophages interstitiels après irradiation (76). Après irradiation à 80 Gy, nous avons

observé une augmentation significative des macrophages alvéolaires par rapport aux contrôles à 1 et 6 mois post-irradiation, et une augmentation significative des macrophages interstitiels 1 et 3 mois post-irradiation. L'irradiation à 80 Gy semble avoir plus d'impact sur le nombre de macrophages présents à la lésion focale, qu'ils soient alvéolaires ou interstitiels.

Dans de nombreuses études utilisant des modèles d'irradiation en thorax entier chez la souris, une déplétion des macrophages alvéolaires est observée 3 semaines après irradiation, avec une repopulation à partir de 8 semaines après irradiation (76, 308, 364). Nous n'observons pas cette déplétion des macrophages alvéolaires dans les temps précoces post-irradiation. En effet, les analyses des coupes histologiques des poumons irradiés à 60 et 80 Gy ne semblent pas montrer de déplétion des macrophages à 3 jours et 1 semaine post-irradiation. Cependant, dans notre modèle nous n'irradiions qu'un petit volume du poumon gauche de la souris. Les macrophages irradiés, et potentiellement déplétés, ne sont présents que dans le volume cible, soit 4% du volume pulmonaire total, et sont entourés de macrophages non irradiés. Pour ne pas noyer l'information émise par le volume irradié nous avons choisi de ne prélever que l'équivalent du patch irradié pour la réalisation des expériences de cytométrie en flux. Pour autant, l'absence de déplétion observée dans nos résultats peut éventuellement être due à la difficulté de ne prélever que la zone irradiée, et nos résultats sont peut-être « pollués » par des macrophages présents en dehors du volume cible.

L'irradiation pulmonaire focale au SARRP permet donc de se rapprocher des standards cliniques en termes de volume, mais complique parfois l'analyse des données. En effet, le volume de tissu et donc le nombre de cellules irradiées étant limité par rapport au nombre total de cellules présentes dans les poumons, les effets spécifiques d'un certain type cellulaire peuvent être difficiles à détecter. C'est le cas dans notre projet pour les macrophages. Lorsque nous avons réalisé le séquençage des ARN sur cellules uniques à 1 mois post-irradiation à 60 et 80 Gy, nous n'avons pas observé de différence entre les doses d'irradiation quant aux profils d'expression génique des macrophages. Dans notre étude, nous n'observons donc pas de différence entre la fibrose rapide et la fibrose progressive, ni dans la cinétique d'apparition des macrophages ni dans leur phénotype d'activation après irradiation stéréotaxique.

Le modèle mis au point au laboratoire montre de nombreux avantages, se rapprochant mieux des conditions de radiothérapie cliniques que les modèles d'irradiation en thorax entier. La réduction du volume irradié est le principal avantage mais également la distribution hétérogène de la dose dans l'organe ou l'évitement de certains organes à risque, comme le cœur. Ce modèle n'est évidemment pas parfait. L'utilisation de la basse énergie notamment peut avoir un impact sur les lésions radio-

induites. Des études au laboratoire sont d'ailleurs en cours sur l'impact de l'énergie et du type de rayonnement utilisé dans le développement des lésions radio-induites pulmonaires. De plus, bien qu'il soit intéressant d'étudier le développement d'une fibrose progressive, avec la dose unique de 60 Gy, et le développement d'une fibrose rapide, avec la dose de 80 Gy, il ne semble pas que la cinétique du développement de la fibrose ait un impact sur les sous-populations de macrophages pulmonaires. Ces observations ont permis d'affiner le choix de l'utilisation d'une seule dose d'irradiation dans le projet de thèse de Sarmini Bavanathan. Son projet de thèse consiste à étudier l'impact des cellules club dans le développement des lésions radio-induites pulmonaires. Les premières observations au laboratoire ont montré une déplétion radio-induite des cellules club dans le volume cible après irradiation à 60 et 80 Gy (293). Mes observations sur l'absence d'impact significatif de la cinétique d'apparition de la fibrose ont permis de choisir la dose de 80 Gy, générant une fibrose rapide, pour ce nouveau projet.

Comment différencier les macrophages présents à la lésion pulmonaire après irradiation stéréotaxique ?

Les macrophages pulmonaires sont une population cellulaire hétérogène composée de macrophages alvéolaires, présents dans les alvéoles, de macrophages interstitiels, présents dans le parenchyme pulmonaire en dehors des alvéoles, et de macrophages recrutés, issus de la différenciation monocyttaire et capables de devenir alvéolaires ou interstitiels. Les macrophages pulmonaires sont des cellules polarisées, activables en un phénotype plutôt pro-inflammatoire, M1-like, ou anti-inflammatoire, M2-like. Pour caractériser les macrophages, leur phénotype d'activation M1 ou M2 est souvent utilisé dans la littérature (100, 112, 154, 313, 325). Dans notre stratégie de gating en cytométrie en flux, nous avons donc voulu intégrer des marqueurs permettant d'observer la polarisation des macrophages. Nous avons choisi les marqueurs CD80 et MHC II comme marqueurs des macrophages M1-like, et CD206 comme marqueur des macrophages M2-like. Nos résultats semblent montrer une tendance à l'orientation M1-like des macrophages alvéolaires, et une tendance à l'orientation M2-like des macrophages interstitiels. Les macrophages alvéolaires ont souvent été décrits comme ayant un phénotype pro-inflammatoire, lié notamment à leurs fonctions bactéricides dans les cas d'infections pulmonaires par exemple (365, 366). Après irradiation du thorax entier à 12.5 Gy chez les souris C57BL/6J et C3H, Grove *et al.* observent également une orientation M1-like des macrophages alvéolaires et M2-like des macrophages interstitiels (364), tout comme Meziani *et al.* (76). Globalement après irradiation du thorax entier, de nombreuses études observent la

polarisation des macrophages vers un phénotype M2, parfois sans préciser s'il s'agit de macrophages alvéolaires ou interstitiels (367, 368).

Toutefois, comme cela a été détaillé longuement dans l'introduction, aujourd'hui le paradigme de la polarisation des macrophages semblent être remis en question. En effet, dans de nombreuses pathologies pulmonaires les macrophages ne montrent pas un phénotype clairement M1 ou M2, semblant indiquer que cette dichotomie est insuffisante pour décrire les multiples phénotypes d'activation des macrophages. D'ailleurs, lorsque nous avons souhaité utiliser les marqueurs CD80 et CD206 pour des analyses histologiques, les macrophages présents dans les poumons après irradiation étaient tous doublement marqués. L'idée selon laquelle les phénotypes M1 et M2 ne seraient finalement que des points extrêmes d'un continuum de phénotypes d'activation dépendants de l'environnement biologique dans lequel se trouvent les macrophages se développe de plus en plus dans la littérature. L'analyse à haute résolution du génome de macrophages humains activés par 28 types de stimuli différents a montré que la distinction entre les macrophages M1 et M2 ne permettait pas d'expliquer les différents phénotypes observés (369). De plus, la comparaison, chez la souris, des données génétiques et épigénétiques des macrophages résidents, issus de 7 tissus différents, a montré l'impact du microenvironnement tissulaire dans les phénotypes d'activation des macrophages (Figure 25) (370). L'utilisation de techniques qui permettent d'accéder à l'intégralité des profils génétique et épigénétique des cellules ouvre la voie à l'amélioration de la caractérisation de la plupart des phénomènes biologiques sensibles, dont fait partie l'activation des macrophages.

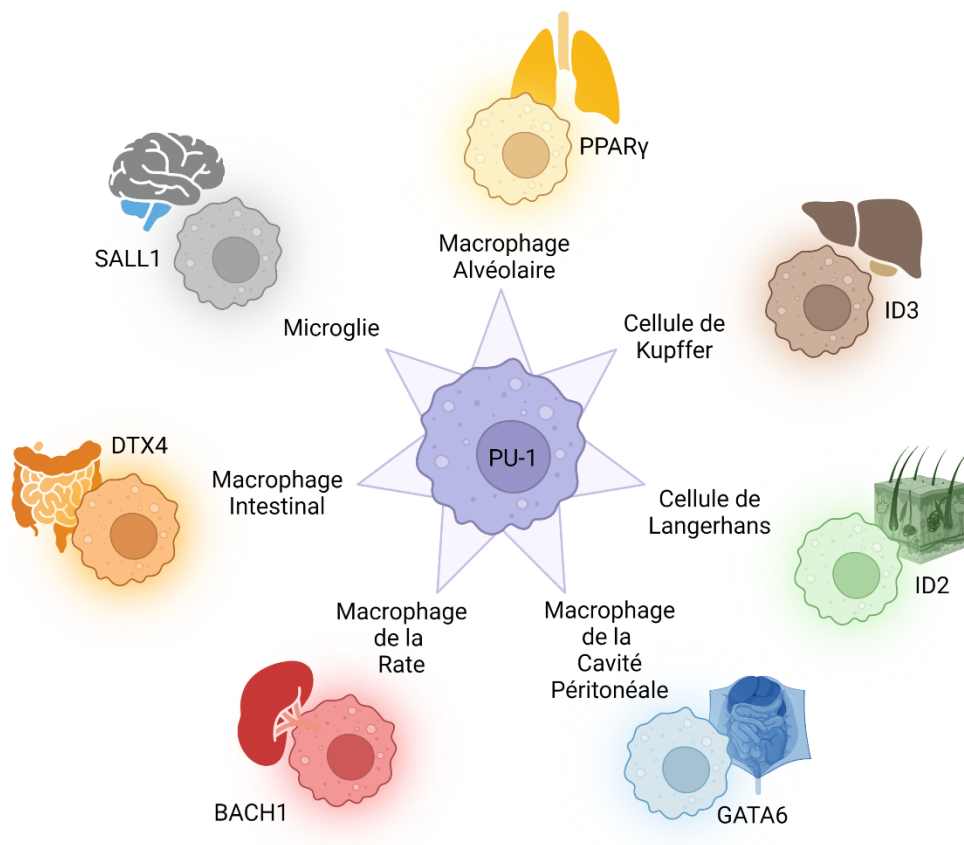


Figure 25 : Les différents phénotypes d'activation des macrophages résidents.

Chaque macrophage résident possède des « activateurs » uniques relatifs à sa localisation tissulaire. Les marqueurs d'activation des différents macrophages résidents sont identifiés sur la figure en fonction de l'organe d'intérêt (adapté de Blériot *et al.* (371)).

L'avènement des techniques de séquençage permet aujourd'hui d'utiliser l'intégralité du génome cellulaire pour caractériser les sous-populations macrophagiques, et de ne pas se restreindre aux marqueurs connus de leur polarisation. Nous avons donc réalisé des expériences de séquençage de l'ARN sur cellule unique 1 mois post-irradiation à 60 et 80 Gy, et 6 mois post-irradiation à 60 Gy. Pour réaliser le point 6 mois post-irradiation à 80 Gy, les souris ont été irradiées mais sont encore en cours. Les digestions afin de réaliser le séquençage ont été effectuées sur des prélèvements du patch lésionnel quand celui-ci était visible ou d'un morceau de poumon gauche équivalent dans le cas contraire. Nous avons fait le choix de trier les cellules via le marqueur pan-immunitaire CD45. Après nous être focalisés sur les cellules myéloïdes puis sur les macrophages, nous avons pu observer que l'application de scores de gènes connus pour les phénotypes M1 ou M2 ne permettait pas de caractériser les macrophages présents à la lésion radio-induite, ni par rapport à la condition non irradiée, ni par rapport à la dose d'irradiation, ni en fonction du temps post-irradiation. L'exploration des gènes discriminant les clusters présents après 1 et 6 mois post-irradiation nous a permis de mettre en évidence des phénotypes métaboliques différentiels des macrophages présents à la lésion entre les réactions précoce et tardive.

Nous avons observé dans les tissus irradiés la présence de macrophages présentant un métabolisme énergétique lipidique augmenté, 1 mois post-irradiation à 60 et 80 Gy, par rapport aux tissus non irradiés. Les macrophages alvéolaires, impliqués dans le catabolisme du surfactant principalement composé de phospholipides et de lipoprotéines, ont un métabolisme énergétique de base orienté vers l'utilisation des lipides (58). Bien que les mécanismes associés ne soit pas encore élucidés, l'exposition corps entier à des rayons X chez le lapin (8 Gy) ou à des rayons mixtes neutrons/gamma chez le rat (3.33 Gy neutrons/0.66 Gy gamma) augmentent les taux plasmatiques de lipides (372, 373). Le lien n'a encore pas été démontré, mais la possible présence augmentée de ces lipides dans les poumons après irradiation pourrait induire un flux important de lipides dans les macrophages alvéolaires et pousser à la suractivation de la voie énergétique des lipides en réponse précoce à l'irradiation stéréotaxique. Nous aurions d'ailleurs pu mesurer la présence de lipides dans les lavages bronchoalvéolaires des souris afin d'observer une éventuelle augmentation des lipides dans les poumons après irradiation. Les voies de reprogrammation métabolique des macrophages sont de plus en plus étudiées dans plusieurs pathologies pulmonaires, afin de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques. Par exemple, la reprogrammation métabolique en faveur de l'utilisation des acides gras dans les macrophages alvéolaires, observée dans le modèle de fibrose induite par la bléomycine chez la souris, a été démontrée comme étant médiée par le stress oxydatif mitochondrial, un contexte que l'on retrouve dans

les tissus irradiés et qui pourrait également être à l'origine de la reprogrammation métabolique (374).

L'apparition d'un cluster de macrophages, spécifique à l'effet tardif, montrant la surexpression des gènes de la voie de biosynthèse du cholestérol a également été observée. Lorsque les lipides libres sont phagocytés par les macrophages alvéolaires, ils sont estérifiés dans le cytoplasme avant leur utilisation dans la mitochondrie. Le flux de lipides après irradiation dans les macrophages étant très important, il y aurait une augmentation significative de l'estérification en cholestérol de ces lipides. Cette accumulation incontrôlée induirait la transformation des macrophages en macrophages spumeux. Ces résultats sont soutenus par l'observation, sur nos coupes de poumons après irradiation stéréotaxique, de la présence de macrophages spumeux en clusters autour de la lésion. Bien que les macrophages spumeux aient surtout été décrits dans la pathogénèse de l'athérosclérose, ils ont également été observés dans d'autres pathologies pulmonaires, notamment fibreuses (337, 375, 376). D'ailleurs, dans des modèles murins de fibrose idiopathique pulmonaire par instillation de bléomycine, l'inhibition des macrophages spumeux a permis de réduire la fibrose pulmonaire (336).

L'utilisation énergétique des lipides est décrite comme une caractéristique du phénotype d'activation M2-like. Pour autant, les macrophages alvéolaires possèdent un métabolisme lipidique augmenté par rapport à d'autres macrophages résidents, mais sont souvent considérés comme étant des macrophages de type M1 pro-inflammatoires. De plus, après irradiation, les macrophages pulmonaires ont été décrits dans de nombreuses études comme étant des macrophages de type M2 (377). Les macrophages spumeux sont caractéristiques de l'irradiation pulmonaire et ont une activité pro-inflammatoire importante (331). La lipotoxicité des macrophages génère une réponse inflammatoire chronique induisant de l'apoptose cellulaire et du stress oxydatif, processus décrits comme associés au phénotype M1-like (378). Toutes ces observations, parfois contradictoires, montrent la difficulté de caractériser simplement les macrophages pulmonaires après irradiation. Bien que les phénotypes d'activation et de polarisation des macrophages aient permis pendant des années l'étude des macrophages dans divers contextes pathologiques, le défi actuel serait d'étendre la classification phénotypique des macrophages en dehors de ce paradigme afin de refléter leurs fonctions à un moment donné et dans un contexte environnemental donné. L'étude des voies du métabolisme des macrophages, de leur microenvironnement tissulaire et de leur origine offrent des angles de caractérisation intéressantes pour l'avenir.

Quel est l'impact de l'origine des macrophages dans les lésions pulmonaires induites par irradiation stéréotaxique ?

Finalement, l'utilisation des phénotypes de polarisation des macrophages échoue à caractériser les sous-populations macrophagiques présentes à la lésion. De nombreuses études se sont donc attelées à différencier autrement les sous-populations de macrophages présentes après irradiation pulmonaire. L'origine des macrophages est apparue comme une approche intéressante. Les macrophages pulmonaires se distinguent en deux catégories : les macrophages recrutés issus de la différenciation monocyttaire, et les macrophages résidents, issus de la vie embryonnaire, se subdivisant en deux catégories distinctes, les macrophages alvéolaires et les macrophages interstitiels. Il a été montré par Grove *et al.* que le recrutement des macrophages, après irradiation pulmonaire en thorax entier chez la souris, était dépendant de l'axe de signalisation CCR2/CCL2 (252). Le récepteur CCR2 est présent à la surface des monocytes et permet leur chimioattraction sur les sites inflammatoires via CCL2. Le CCL2 a été montré comme étant sécrété par de nombreux types cellulaires comme les macrophages résidents, les cellules tumorales, les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses (379-381). L'importance de cet axe de recrutement a été confirmée dans de nombreuses pathologies pulmonaires (382-384).

L'utilisation des souris déficientes pour le récepteur CCR2 est un outil de choix pour comprendre l'implication du recrutement monocyttaire dans développement de la fibrose pulmonaire (252, 385). Nous avons donc fait le choix d'utiliser les souris CCR2 KO pour appréhender l'implication des macrophages recrutés dans le développement des lésions pulmonaires induites par irradiation stéréotaxique. Le même modèle d'irradiation stéréotaxique en arc thérapie, à 60 et 80 Gy, du poumon gauche, utilisé sur les souris sauvages, a été utilisé sur les souris CCR2 KO.

Dans un premier temps, il a fallu caractériser la lésion radio-induite pulmonaire chez cette souche de souris. En effet, les souris CCR2 KO ont montré une diminution de la sévérité de la fibrose pulmonaire après instillation de bléomycine par rapport à leurs homologues sauvages (384). Notre hypothèse était donc que les souris CCR2 KO présenteraient une réduction de la sévérité de la fibrose pulmonaire radio-induite. Cette hypothèse n'a pas été confirmée. Nous avons dans un premier temps comparé les lésions pulmonaires radio-induites des souris CCR2 KO et des souris sauvages, à l'aide de l'imagerie scanner de haute résolution (μ CT). Le logiciel AnalysePro® a ensuite été utilisé pour réaliser la segmentation des volumes pulmonaires d'intérêt : les bronches, les poumons sains et le patch fibreux. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les deux souches de souris concernant le volume du patch fibreux radio-induit et la cinétique d'apparition de la fibrose pulmonaire. En effet, sur

les courbes d'intensité HU, indicateur de la densification tissulaire, le décalage vers la droite, reflétant l'apparition de la fibrose pulmonaire, intervient au même moment entre les souris sauvages et les souris CCR2 KO, et apparait de même intensité.

Pour la construction des courbes d'intensité HU, lorsqu'aucun patch dense n'était observé sur les images scanner, nous avons utilisé les valeurs pour le poumon gauche dans son ensemble, et les valeurs spécifiques du patch fibreux lorsqu'il était présent, détecté à l'œil par la personne réalisant la segmentation. En effet, la zone irradiée ne correspondant qu'à 4% du volume pulmonaire total des souris, l'utilisation des valeurs de la totalité du poumon gauche risquait de diluer l'impact de l'opacification tissulaire sur les courbes HU globales. L'analyse des images scanner, avec la détermination de la présence ou non du patch fibreux, était donc subjective car soumise à l'expérience de l'expérimentateur. Nous avons donc voulu utiliser une méthode d'analyse pouvant être plus objective. Mecozzi *et al.* ont proposé un modèle de standardisation de l'analyse des images scanner thoraciques chez la souris que nous avons choisi d'appliquer sur nos données (386). Cette méthode permet d'appliquer un seuil de -435 HU, au-dessus duquel les voxels seront considérés comme pauvrement aérés, et en dessous duquel les voxels seront considérés comme normalement aérés. Cette méthode nous a permis d'observer la présence d'un œdème précoce, après irradiation à 60 et 80 Gy, chez les souris CCR2 KO (avec des pourcentages de volumes normalement aérés significativement plus importants que les souris non irradiées, et que les souris sauvages irradiées). L'hypothèse émise après ces observations était que les souris CCR2 KO développaient de l'emphysème précoce après irradiation. L'emphysème pulmonaire se caractérise par des valeurs de densité inférieures à -900 HU. Nous avons donc calculé le nombre de voxels en-dessous de -900 HU, mais nous n'avons pas observé de différence significative avec les souris sauvages, indiquant l'absence d'emphysème. Nous avons également mesuré les voxels avec des valeurs de HU supérieures à -100, afin de quantifier les volumes non aérés. Et, loin d'observer l'amélioration du phénotype fibreux chez les souris CCR2 KO, cette méthode nous a permis de montrer que ces souris présentaient une opacification pulmonaire au moins équivalente à celle des souris sauvages, voire plus importante aux temps 1 mois et 3 mois post-irradiation à 80 Gy.

Le patch est plus important aux temps plus précoces car il est plus inflammatoire. Il se consolide ensuite en devenant plus fibreux, et se restreint au point de développer une ligne ressemblant à une scission lobaire dans le poumon gauche des souris, qui ne possèdent pourtant qu'un lobe. Les lésions pulmonaires des souris CCR2 KO mettent plus de temps à se consolider et montrent donc un patch inflammatoire plus gros à 1 mois post-irradiation. Cette observation pourrait être le reflet du dérèglement immunitaire chez les souris CCR2 KO.

L'utilisation de l'imagerie scanner présente de nombreux avantages éthiques et techniques. En effet, l'imagerie est une technique peu invasive qui permet de conserver les animaux en vie pendant la durée complète de l'expérimentation. De plus, les scanners thoraciques des souris nous permettent d'accéder à de nombreuses informations, comme le volume total du patch fibreux, information inaccessible avec seulement l'analyse histologique en 2 dimensions. Cependant, la taille des poumons de souris ne permet pas toujours d'utiliser les mêmes paramètres que ceux utilisés en routine en clinique afin de qualifier les lésions pulmonaires, fibreuses ou inflammatoires. En effet, les lésions en rayons de miel, par exemple, ne sont pas observables, alors qu'elles font partie du tableau de scores lésionnels classiquement utilisé pour qualifier la fibrose en clinique. Lors de l'analyse clinique de scanners thoraciques, la résolution permet de réaliser une analyse de chaque compartiment pulmonaire : alvéolaire, interstitiel et bronchiolaire (387). Chaque compartiment apporte des informations qui permettent de scorer au mieux la lésion pulmonaire. L'utilisation du μ CT chez la souris permet l'observation et la segmentation des volumes pulmonaires macroscopiques mais ne permet pas cette analyse par compartiment. Les lésions très précoces sont donc compliquées à observer chez la souris sur les images scanner, et il est impossible de distinguer la composante inflammatoire de la composante fibreuse. Pour pallier ces problématiques, l'une des possibilités serait de diminuer la taille du champ de détection afin de scanner chaque portion des poumons spécifiquement et ainsi d'augmenter la résolution. Cela serait néanmoins compliqué à mettre en place car nous réalisons un gating respiratoire qui nécessite d'avoir le diaphragme dans le champ du détecteur. De plus, cela demanderait de multiplier les scanners thoraciques pour chaque souris par le nombre de zones pulmonaires à acquérir. Les souris recevraient une dose de 0.9 Gy pour chaque acquisition de 4 min, ce qui finalement induirait une dose supplémentaire non négligeable. Aux vues de nos thématiques de recherches, centrées sur l'effet des rayonnements ionisants, augmenter la dose reçue par la souris pendant l'acquisition des images scanner induirait un biais trop important. En revanche, l'injection de produit de contraste, afin d'avoir accès à la vascularisation pulmonaire, permettrait peut-être d'apporter des éléments de caractérisation précoces de la lésion pulmonaire. L'étude sur la possibilité de réaliser chez la souris des analyses plus poussées des images scanner est en cours au laboratoire.

L'analyse des résultats issus des images scanner nous a permis de conclure que l'abrogation du recrutement monocyttaire chez les souris invalidées pour le récepteur CCR2 ne réduisait pas la sévérité de la fibrose pulmonaire radio-induite dans notre modèle. L'absence d'effet a été confirmée par les analyses en histologie de routine. Le recrutement des macrophages dans le développement des lésions pulmonaires induites par irradiation stéréotaxique pourrait être indépendant de ce récepteur et passer par d'autres axes de recrutement monocyttaire. En effet, bien que le recrutement via CCR2 soit abrogé chez les souris CCR2 KO, elles présentent une augmentation du nombre de macrophages à la lésion similaire à leurs homologues sauvages, observée sur les coupes histologiques, mais également sur nos analyses en cytométrie en flux et sur les analyses transcriptomiques sur cellules uniques. Une autre hypothèse serait la mobilisation vers le patch lésionnel des macrophages résidents depuis les zones tissulaires non irradiées. En effet, l'irradiation stéréotaxique, contrairement à l'irradiation en thorax entier, épargne une grande partie des macrophages pulmonaires, du fait de la focalisation de l'irradiation. De plus, il a déjà été observé chez la souris, grâce à une technique d'imagerie intra vitale associée à un marquage spécifique des macrophages alvéolaires, que les macrophages alvéolaires étaient capables de se déplacer d'alvéole en alvéole si nécessaire (54). Ainsi, si les macrophages présents à la lésion focale viennent du tissu avoisinant, cela pourrait expliquer l'absence d'impact de l'inactivation du CCR2 et donc de l'abrogation du recrutement monocyttaire dans notre modèle. Resterait alors à comprendre pourquoi autant de macrophages présentent un profil recruté, y compris chez les souris CCR2 KO. En plus de considérer l'hypothèse du recrutement via d'autres voies que la voie CCR2/CCL2, il serait intéressant de savoir si les macrophages sont susceptibles de migrer d'une alvéole à l'autre dans notre modèle, et si le phénotype de ces macrophages « mobiles » pourrait se confondre avec celui des macrophages recrutés.

Afin d'explorer la possibilité d'un recrutement monocyttaire qui serait indépendant de la voie CCR2/CCL2 dans notre modèle, nous avons réalisé des expériences de parabiose. La parabiose est une méthode utilisée depuis de nombreuses années mais très lourde pour les animaux et les expérimentateurs. En effet, la parabiose consiste à connecter par le flanc deux souris, en créant une plaie cutanée et en les suturant réciproquement, afin d'induire de l'angiogenèse entre les souris et que celles-ci partagent un même système sanguin. Dans notre cas nous avons utilisé une souris sauvage et une souris dont toutes les cellules expriment la GFP (souris UBC-GFP). Une fois les souris connectées, la souris WT du couple est irradiée grâce à notre modèle d'irradiation stéréotaxique pulmonaire en arc thérapie. L'observation de macrophages pulmonaires GFP⁺ aurait pu permettre de conclure, sur le principe, à l'existence d'un processus de recrutement des macrophages depuis la circulation sanguine après irradiation stéréotaxique pulmonaire. La complexité de cette

expérience nous a obligés à choisir la dose de 80 Gy afin d'obtenir rapidement une fibrose pulmonaire et de ne réaliser qu'un point de cinétique 1 mois post-irradiation. Nous avons, avant de mettre en place le modèle de parabiose, envisagé d'utiliser la méthode de greffe de moelle osseuse GFP⁺ chez les souris sauvages, utilisée notamment par Grove *et al.* (252). Cependant il a été observé au laboratoire que l'irradiation préalable corps entier nécessaire à cette greffe induit un appel des cellules immunitaires aux poumons, parmi lesquelles des cellules GFP⁺. L'observation de macrophages pulmonaires GFP⁺ après irradiation stéréotaxique n'aurait pas pu être attribuée à l'irradiation pulmonaire avec certitude. Durant le stage de master 2 qui a précédé ma thèse, j'avais mis au point la technique et le suivi post-opératoire des animaux, et obtenu un bon chimérisme sanguin. Nous avons d'ailleurs observé la présence de macrophages recrutés GFP⁺ au sein de la lésion focale pulmonaire. Pour autant, lors de la réalisation des expériences de parabiose pendant ma thèse, nous avons rencontré de nombreux problèmes techniques. En effet, sur 40 couples de parabiose réalisés, nous n'avons pu irradier que 5 souris sauvages (trop de mortalité parmi les couples réalisés). De plus, les trop nombreuses infections parabiologiques observées nous ont obligés à séparer les souris sauvages des souris GFP⁺ dès le chimérisme sanguin atteint et avant irradiation. L'infection parabiologique est caractérisée lorsqu'une des souris du couple faiblit, parfois jusqu'au décès, alors que l'autre prend le dessus. L'une des raisons possibles du taux important d'infection parabiologique dans nos expériences, serait d'ordre génétique. Les souris sauvages étaient issues d'un fournisseur, alors que les souris GFP⁺, bien qu'issues du même fond génétique que les souris achetées, étaient issues de notre élevage propre (animalerie de l'IRSN). Après analyse histologique des coupes de poumons issus des souris sauvages, nous n'avons pas pu observer de macrophages pulmonaires GFP⁺ à 1 mois post-irradiation à 80 Gy. Nous avons donc conclu en l'absence de recrutement macrophagique après irradiation stéréotaxique pulmonaire. Cependant, bien que les monocytes circulants chez la souris aient une demi-vie de 17h, ce qui est relativement long pour une cellule sanguine, la séparation des paires sauvage/GFP⁺ avant irradiation pourrait expliquer l'absence de recrutement observé par simplement une disparition des monocytes circulants GFP⁺. Pourtant, avant d'irradier les souris sauvages, séparées des souris GFP⁺, nous avons vérifié la présence de cellules GFP⁺ circulantes par cytométrie en flux, mais sans utilisation de marqueur spécifique des monocytes. Nous n'avons donc pas pu conclure sur la base des résultats observés avec ces expériences de parabiose. Enfin, pour observer le recrutement des monocytes, nos temps post-irradiation sont peut-être trop longs. Bien que les macrophages soient des cellules avec une durée de vie très longue en condition homéostasique, 8 mois minimum chez la souris, leur renouvellement est bien plus important et rapide en conditions inflammatoires (388-390). Le recrutement des monocytes lors d'une lésion est un

phénomène rapide qui pourrait intervenir dans les premières heures après irradiation, bien avant 1 mois post-irradiation. Le laboratoire n'exclut pas la possibilité de poursuivre ce genre d'expérimentations mais les problèmes rencontrés mettent probablement en évidence la nécessité de se former à ce genre de chirurgie auprès d'équipes rompues à ces techniques.

Un autre moyen d'interroger l'origine des macrophages a été l'analyse génétique des macrophages présents à la lésion via le séquençage d'ARN sur cellule unique. Sur la base de la littérature, nous avons appliqué un score regroupant des gènes considérés comme typiques des macrophages recrutés (391). Après utilisation de ce score, nous avons observé, parmi les macrophages alvéolaires mais également interstitiels, la présence de macrophages répondant à ce score de macrophages recrutés. Les macrophages recrutés montrent une augmentation de l'expression génique de molécules de surface également utilisées pour différencier les macrophages interstitiels. Comme décrit dans le chapitre 2 de mon introduction, les macrophages interstitiels primitifs issus de la vie embryonnaire sont remplacés à la naissance par des macrophages issus de la différenciation monocyttaire, alors que les macrophages alvéolaires sont issus du foie foetal pendant la vie embryonnaire. À la suite d'une lésion pulmonaire, il y a des preuves que les macrophages interstitiels peuvent se différencier en macrophages alvéolaires, qui seraient finalement le stade le plus différencié des macrophages pulmonaires (72).

Les macrophages recrutés adoptent le phénotype des macrophages résidents des tissus dans lesquels ils s'infiltrent. Ils sont donc très compliqués à différencier des macrophages résidents. A ma connaissance, il n'existe pas de marqueurs spécifiques des macrophages recrutés, contrairement aux macrophages alvéolaires, avec les marqueurs SiglecF ou PPAR γ par exemple, et aux macrophages interstitiels, avec Csf1r par exemple. L'utilisation de scores regroupant plusieurs gènes potentiellement exprimés par les macrophages recrutés prend tout son sens. Le risque avec ce genre de score est d'inclure d'autres types cellulaires, comme les macrophages interstitiels, dans le décompte des macrophages recrutés (392, 393). Toutefois, les macrophages pulmonaires recrutés ont montré des différences métaboliques persistantes dans le temps avec les macrophages pulmonaires résidents. En effet, ils ne semblent pas augmenter leur métabolisme lipidique comme les macrophages alvéolaires résidents, mais leur métabolisme énergétique dépendraient plutôt du métabolisme de la créatine (394, 395). Ils semblent comme suractivés, et produisent d'ailleurs de plus grandes quantités d'interleukine-6 que les macrophages pulmonaires résidents en réponse aux infections à *Streptococcus pneumoniae* et *Mycobacterium tuberculosis* (394, 396). Ils expriment également plus d'arginase-1, responsable de leur résistance aux infections par helminthes (397), et inhibent l'inflammation de type 2 dans l'asthme allergique

induit par les acariens (398). Cette suractivation des macrophages recrutés peut parfois s'avérer plus délétère que bénéfique. Un exemple d'actualité est le cas de l'infection par le SARS-CoV-2 (responsable de la COVID-19), au cours de laquelle la production massive de cytokines (IL-1, IL-6, TNF α) et de chimiokines par les macrophages recrutés peut contribuer aux lésions pulmonaires (399, 400).

Toujours grâce à l'analyse transcriptomique sur cellules uniques, nous avons décidé d'explorer la possibilité que les macrophages présents à la lésion puissent proliférer. En effet, il a déjà été montré dans le cadre de la fibrose idiopathique pulmonaire la présence d'une population de macrophages pulmonaires proliférants (401). Nous avons donc utilisé un score regroupant des gènes typiques de la prolifération comme MKi67 ou PCNA. Nous avons pu observer la présence d'une population de macrophages alvéolaires proliférants après irradiation. Cette population existe chez les souris non irradiées et augmente après irradiation. Néanmoins, les populations macrophagiques proliférantes que nous avons observées après irradiation sont des populations assez réduites. Prenant cela en compte, ainsi que la présence de macrophages alvéolaires proliférants en condition homéostasique, notre hypothèse est que cette population de macrophages prolifèrerait en continu, avec un pic de prolifération très précoce. En effet, nous avons pu confirmer la présence de ces macrophages proliférants avec des analyses histologiques et l'utilisation d'un anticorps anti-Ki67 mais également avec des expériences de cytométrie en flux après injection et marquage du BrdU. Après irradiation à 80 Gy, nous avons pu observer une augmentation significative de la prolifération des macrophages alvéolaires dans les tissus irradiés à partir de 1 semaine post-irradiation. Ces résultats suggèrent que la prolifération des macrophages en réaction à l'irradiation interviendrait à des temps précoces. Un fois de plus, l'analyse de temps plus précoces encore que ceux que nous avons étudiés serait utile afin de mieux comprendre la cinétique de prolifération des macrophages et leur recrutement.

Lors de la réalisation de l'analyse de trajectoire en pseudotime, nous avons choisi la population des macrophages alvéolaires proliférants comme point d'origine. Ce choix nous a paru le plus pertinent pour deux raisons. D'une part, dans le sens commun, il est considéré que la prolifération intervient en amont de la différenciation cellulaire. Il nous aurait paru étrange de choisir comme point de départ de la pseudotime les macrophages les plus différenciés. D'autre part, le cluster de macrophages alvéolaires ayant un métabolisme de synthèse du cholestérol exacerbé n'apparaît que tardivement, 6 mois post-irradiation. C'est pour cela que ce cluster devait se retrouver en position tardive sur la trajectoire de la pseudotime. Cela n'a été possible qu'en choisissant les macrophages proliférants comme point de départ. Nous aurions pu également choisir les macrophages issus des poumons de souris non

irradiées comme origine de la pseudotime. Cependant, ces macrophages ne forment pas un cluster unique, bien différencié des autres, mais sont dispersés entre plusieurs clusters. Sur la base de cette pseudotime, notre hypothèse serait que les macrophages, issus de cette prolifération, entrent dans une voie d'activation dans les temps précoces post-irradiation, se traduisant par une suractivation de leur métabolisme lipidique, puis dériveraient dans les temps tardifs vers un phénotype de macrophages spumeux. Cette activation en macrophages spumeux serait un des phénomènes prédominants de la pathogénèse de la fibrose radio-induite. Afin de pouvoir confirmer cette hypothèse, l'utilisation de la transcriptomique spatiale serait une option intéressante. En effet, l'association du transcriptome total d'une cellule et de sa localisation sur une lame histologique permettrait de mieux comprendre les interactions entre les clusters de macrophages identifiés dans notre étude (402). Ce type de méthode va être mis en place au laboratoire.

Nous avons tenté de dépléter les macrophages alvéolaires avec du liposome-clodronate en instillation nasale sur des souris sauvages afin d'empêcher les macrophages alvéolaires de proliférer et de générer des macrophages spumeux potentiellement délétères. Nous n'avons pas pu conclure car l'instillation de liposome-clodronate n'a pas déplété de manière satisfaisante les macrophages alvéolaires. Pourtant, cette technique de déplétion spécifique des macrophages alvéolaires a déjà permis d'observer l'absence d'implication des macrophages alvéolaires dans les lésions radio-induites pulmonaire après irradiation en thorax entier chez la souris (76). De plus, les instillations ont semblé induire des infiltrations leucocytaires dans les poumons, que nous avons pu observer en histologie de routine. A ma connaissance, les études utilisant le liposome-clodronate pour dépléter les macrophages alvéolaires ne relatent pas ce type d'infiltration. La piste de la déplétion des macrophages alvéolaires, afin de comprendre leur rôle dans les lésions induites par irradiation stéréotaxique mériterait d'être explorée. Pour cela, plutôt que l'instillation nasale qui peut induire des biais et une administration incomplète du liposome-clodronate, l'administration intratrachéale du liposome-clodronate serait à envisager.

Quel est l'impact de l'environnement tumoral dans les lésions radio-induites aux tissus sains ?

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM, *Tumor Associated Macrophages*) sont le type cellulaire immunitaire le plus abondant dans les tumeurs. Les TAM montrent un phénotype de polarisation orienté M2 et la présence de M2-TAM est corrélée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer du poumon (178). Comme décrit précédemment, les macrophages sont des cellules très plastiques dont le phénotype d'activation dépend de l'environnement tissulaire. Ainsi, il est possible de supposer que les TAM pourraient être impactés par l'irradiation tumorale, au même titre que les macrophages du tissu sain environnant la tumeur. Développer des moyens d'étudier conjointement l'effet de l'irradiation sur un tissu sain portant une tumeur est un défi important. En effet, il faudrait développer un modèle d'irradiation qui contrôlerait complètement la tumeur et permettrait de prélever les tissus sains à différents temps post-irradiation.

Dans notre modèle d'irradiation stéréotaxique, l'isocentre est placé au centre du poumon gauche. En clinique, l'irradiation thérapeutique vise toujours un volume tumoral. C'est la tumeur qui reçoit la dose prescrite. Cependant, la plupart des connaissances obtenues en radiobiologie sont issues de modèles d'irradiation du tissu sain ne portant pas de tumeur. Ainsi, les observations sur la réponse des tissus sains pulmonaires pourraient être différentes en présence de cellules tumorales dans le volume d'irradiation.

Du *et al.* ont déjà mis au point un modèle d'irradiation stéréotaxique tumorale à l'aide d'un SARRP (403). Pour obtenir des tumeurs, ils utilisent un modèle de souris transgéniques, mutées sur le gène *Kras*. Ces souris développent spontanément des tumeurs pulmonaires. La présence de ces tumeurs réduit leur espérance de vie à seulement 28 semaines (contre en moyenne 2 ans pour des souris sauvages). Ils ont irradié une tumeur pulmonaire périphérique avec 7 à 10 faisceaux de 5x5 mm², avec une dose de 60 Gy en 3 fractions, à raison d'une fraction par semaine. Ce schéma d'irradiation leur a permis de diminuer la croissance tumorale. Ils ont choisi d'utiliser une dose totale et un schéma de fractionnement de la dose ressemblant à ceux utilisés en clinique mais cette dose n'a pas permis d'éradiquer la tumeur, et vu notre recul, est probablement peu susceptible de générer des dommages tardifs sur le poumon sain. Il faudrait donc augmenter la dose pour atteindre un contrôle tumoral total et générer des lésions pulmonaires, à condition également que le volume de tissus sains dans le champ soit suffisamment important. D'autre part, ils n'irradient qu'une des tumeurs générées spontanément dans les poumons des souris *Kras*, donc les « autres » tumeurs continuent de croître et d'impacter la survie des animaux. Ce modèle ne permet donc

pas en l'état actuel d'étudier la réponse tardive des tissus sains après irradiation.

L'utilisation de modèles d'injection orthotopique d'une tumeur au sein du poumon semble être une meilleure option afin d'étudier à la fois la tumeur et les tissus sains. Cependant, avant d'irradier la tumeur, il est nécessaire d'attendre que celle-ci ait une taille suffisante pour être visible à l'imagerie (pour pouvoir être ciblée au SARRP) et qu'elle ait également eu le temps de s'intégrer dans le tissu pulmonaire et d'établir des relations avec l'hôte. Cela induit des tailles de tumeurs nécessitant l'utilisation de collimateurs d'au minimum 5x5 mm². Dans l'optique de modèles mixtes tumeur/tissus sains, il faut inclure un volume suffisant de poumon sain dans le volume cible, obligeant l'utilisation de collimateurs de taille supérieure à 5x5 mm². L'augmentation du volume pulmonaire irradié, chez les souris, a un impact sur leur survie. En effet, les souris irradiées, par Bertho *et al.* avec un collimateur de 7x7 mm² n'ont survécu que 8 semaines post-irradiation à 90 Gy (293). Si les tumeurs injectées étaient capables d'être supprimées par des doses tolérées en champ large, il serait envisageable d'utiliser une irradiation en thorax entier ou en hémithorax, permettant ainsi l'irradiation de la tumeur et de suffisamment de tissu sain. Le volume pulmonaire irradié s'éloignerait alors de ceux irradiés en clinique et ceci pourrait induire des réponses tissulaires différentes. De plus, si la croissance tumorale est trop rapide cela impactera également la survie des souris. La création de tels modèles nécessite une tumeur de taille significative, un volume cible incluant la tumeur et un volume de poumon sain suffisant pour générer des lésions, le tout irradié à une dose ou avec un schéma de fractionnement pouvant à la fois contrôler la tumeur et générer des lésions tardives pulmonaires sans compromettre la survie des souris. Tout cela complique encore aujourd'hui l'étude des effets tardifs de l'irradiation sur le poumon sain dans des modèles de souris porteuses de tumeurs.

Tous ces éléments sont pris en considération dans le développement du modèle « idéal », mixte tumeur/tissus sains, au laboratoire, en collaboration avec l'unité INSERM 1030 de Gustave Roussy. La planification du traitement reste un défi conséquent. En effet, le schéma d'irradiation permettant de contrôler la tumeur tout en irradiant suffisamment de tissus sains pour qu'ils développent des séquelles sans compromettre la survie des animaux n'a pas encore été trouvé.

Afin de contrôler de manière satisfaisante les tumeurs dans le tissu sain et ainsi étudier le tissu sain après irradiation chez les souris, la combinaison avec des molécules d'immunothérapie pourrait être une solution. Wennerberg *et al.* ont utilisé un modèle d'induction de tumeurs sous cutanée chez des souris, via l'injection de cellules de carcinome mammaire (404). Ils ont montré que le blocage de CD73, une protéine présente sur les membranes des cellules tumorales impliquée dans la conversion de

l'ATP en adénosine, en combinaison à l'irradiation stéréotaxique des tumeurs en dose unique à 20 Gy, permettait la diminution de la croissance tumorale et la survie des souris, allant même jusqu'à la régression tumorale complète pour 2 souris sur 7. L'ajout d'anticorps anti-CTLA-4 induit l'effet abscopal sur les sites tumoraux non irradiés. Ce type de combinaison thérapeutique permettrait peut-être d'étudier le tissu sain dans un modèle de tumeur pulmonaire, sur des temps tardifs après irradiation.

Les macrophages pourraient-ils interagir avec d'autres types cellulaires dans les lésions radio-induites ?

Les macrophages sont des cellules effectrices via la phagocytose ou l'efférocytose mais elles sont également un lien entre les réponses immunitaires innée et adaptative. En effet, ce sont des cellules présentatrices d'antigènes qui peuvent activer d'autres types cellulaires immunitaires comme les lymphocytes T et les cellules NK. Les macrophages sont également capables d'activer des cellules non immunitaires, comme les fibroblastes ou les cellules épithéliales.

Les macrophages s'orientent vers un phénotype M2, sécrétant du TGF- β , en réponse à l'irradiation. Le TGF- β induit l'activation fibroblastique caractéristique de la fibrose radio-induite pulmonaire. Il a également été montré que le TGF- β , produit par les macrophages après irradiation, était capable d'induire la transition épithélio-mésenchymateuse, processus connu pour participer à différents types de fibrose tissulaire (367).

Les TAM sont décrits comme des cellules pro-tumorales favorisant la croissance et l'échappement immunitaire des cellules tumorales. De nombreuses études tentent de comprendre comment inhiber ces macrophages afin de limiter leur action pro-tumorale. Dans l'étude de thérapies combinant la radiothérapie et l'immunothérapie avec anti-PD1, Ban *et al.* se sont intéressés à l'impact des sécrétions des cellules club dans l'effet de cette combinaison thérapeutique (405). Pour rappel, les cellules club sont des cellules épithéliales présentes principalement dans les bronchioles terminales. Elles participent au renouvellement épithélial et ont un rôle détoxifiant important par leur synthèse de grandes quantités de cytochrome P450. Les cellules club peuvent être déplétées par injection intra-péritonéale de naphtalène. Le naphtalène est un hydrocarbure toxique pour les cellules qui synthétisent beaucoup de P450, donc pour les cellules club. Ban *et al.* ont montré qu'une déplétion chimique des cellules club (par le naphtalène) ou génétique (souris exprimant le récepteur à la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur de l'utéroglobine) dans un modèle de tumeur CBNPC

orthotopique chez la souris, annule l'effet anti-tumoral de la combinaison d'une irradiation à 4 Gy et de l'anti-PD1 (405). Grâce à des analyses du transcriptome sur cellules uniques, ils ont pu observer une augmentation de la proportion des cellules de l'immunité pro-tumorale, dont les TAM, en l'absence de cellules club. Leurs conclusions sont que les cellules club, ou plus exactement leurs sécrétions, seraient capables de contrebalancer l'effet de l'immunité pro-tumorale et de favoriser l'immunité adaptative antitumorale (405). Les interactions entre les cellules club et les TAM offrent donc de nouvelles perspectives thérapeutiques dans la potentialisation des associations radiothérapie/immunothérapie.

Vu leur impact sur l'immunité tumorale, les cellules club pourraient également avoir un effet sur l'activation, pro- ou anti-inflammatoire, des macrophages présents après irradiation. L'étude de l'impact des cellules club dans le développement des pneumopathies radique induites par irradiation stéréotaxique pourrait apporter des pistes thérapeutiques intéressantes. C'est le sujet de la thèse de Sarmini Bavanathan qui a débuté au laboratoire en Octobre 2022. La cinétique de déplétion par le naphthalène des cellules club, ainsi que la cinétique de repopulation, a d'abord été étudiée. Le nadir des cellules club intervient 3 jours après l'injection de naphthalène et leur retour intervient 14 jours après injection de naphthalène. Il a donc été choisi de réaliser les irradiations pulmonaires par arc thérapie au SARRP avec une dose de 80 Gy à ces temps post-injection de naphthalène. La caractérisation des lésions radio-induites après injection de naphthalène semble déjà suggérer le rôle protecteur des cellules club. Des analyses en cytométrie en flux et transcriptomique sur cellules uniques sont prévues pour comprendre les phénomènes de phénoconversion des cellules club impliqués dans les lésions radio-induites pulmonaires. Des expériences *in vitro* de milieux conditionnés sont également prévues pour appréhender si l'effet protecteur des cellules club peut être lié à leurs sécrétions. Les futurs résultats de Sarmini Bavanathan, ainsi que ceux observés pendant ma thèse, permettront sûrement de mieux comprendre les interactions entre les cellules club et les macrophages, et d'ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques intéressantes dans la prise en charge des pneumopathies radiques.

Conclusion générale

La radiothérapie stéréotaxique est une alternative thérapeutique intéressante pour le traitement des cancers bronchiques non à petites cellules de stade T1/T2, de moins de 7 cm dans leur plus grande dimension, sans invasion des nœuds lymphatiques et sans métastases. Sa modélisation chez le rongeur permet l'étude spécifique des effets de la radiothérapie stéréotaxique pulmonaire et des pathologies associées. Ce projet de thèse a permis d'apporter de nouvelles connaissances sur la caractérisation des macrophages pulmonaires dans un modèle innovant d'irradiation d'un petit volume pulmonaire chez la souris.

L'étude de l'impact de l'irradiation stéréotaxique sur les macrophages pulmonaires nous a permis d'observer un infiltrat macrophagique présent au niveau du volume irradié en amont de la lésion focale observable sur les images μ CT et sur les coupes histologiques, et cela dans le cas d'une fibrose progressive comme dans celui d'une fibrose rapide. Ces macrophages forment des clusters autour de la lésion. Certains de ces macrophages présentent des gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme, ce sont des macrophages spumeux. Les macrophages présents à la lésion sont difficilement différenciables sur la base des connaissances sur les phénotypes d'activation macrophagique. Nous avons cependant observé une reprogrammation métabolique des macrophages alvéolaires après irradiation grâce à l'analyse transcriptomique sur cellules uniques. Les macrophages alvéolaires montrent une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la voie métabolique de l'utilisation des acides gras à 1 mois post-irradiation à 60 et 80 Gy, et une augmentation d'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol à 6 mois post-irradiation à 60 Gy. Ce cholestérol participerait à la formation des gouttelettes lipidiques présentes dans les macrophages spumeux. La formation de macrophages spumeux après irradiation pourrait être un phénomène central dans la pathogenèse des pneumopathies radiques. Comprendre la mise en place de cette reprogrammation métabolique après irradiation permettrait d'ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques intéressantes pour la prise en charge de ces pneumopathies.

L'étude de l'origine de l'infiltrat macrophagique observé après irradiation stéréotaxique nous a permis de montrer la présence d'un recrutement monocytaire qui pourrait être indépendant de l'axe CCL2/CCR2, et également la présence de macrophages alvéolaires proliférants *in situ*. En effet, l'abrogation du recrutement monocytaire via CCR2 par l'utilisation de souris CCR2 KO n'influence pas la sévérité des lésions radiques pulmonaires, d'après les analyses d'images scanner et les études histologiques. Lors de l'analyse transcriptomique sur cellule unique, la présence de macrophages identifiés grâce au score de gènes typiques des macrophages recrutés laisse penser qu'un recrutement a bien lieu, mais probablement indépendamment de la voie CCR2. Nous avons en effet observé chez les souris CCR2 KO les mêmes sous-

populations de macrophages alvéolaires que chez les souris sauvages, l'une mobilisant la voie métabolique des acides gras et l'autre synthétisant du cholestérol, aux mêmes temps après irradiation, respectivement 1 mois post-60 et 80 Gy et 6 mois post-60 Gy. L'injection de BrdU 24h avant euthanasie à 1 et 2 semaines post-irradiation à 80 Gy nous a permis d'observer la présence de macrophages proliférants sur les coupes histologiques de poumons, suggérant que d'autres mécanismes que le recrutement monocytaire pourraient participer à l'augmentation du nombre de macrophages à la lésion focale. L'analyse transcriptomique sur cellules uniques a confirmé la présence de macrophages alvéolaires proliférants en conditions homéostatiques chez les animaux non irradiés et en réponse aux rayonnements ionisants dans les poumons des souris sauvages et CCR2 KO.

Finalemment, nos résultats sur les populations macrophagiques pulmonaires ne sont pas alignés avec les résultats issus des modèles d'irradiation chez la souris utilisant des volumes irradiés plus importants. En effet, après irradiation hémithoracique ou de l'ensemble du thorax, il a été montré un recrutement monocytaire dépendant de l'axe CCL2/CCR2. Toujours avec ce type de modélisation, les macrophages interstitiels, et non les alvéolaires, ont été démontrés comme participant au développement des lésions radio-induites pulmonaires, alors que nos résultats montrent une reprogrammation métabolique pouvant favoriser le développement lésionnel seulement chez macrophages alvéolaires. Cela suggère que l'implication des macrophages pulmonaires pourrait être dépendante du type de modélisation et probablement en particulier du volume pulmonaire irradié. Dans notre modèle d'irradiation stéréotaxique chez la souris, seulement un petit nombre de macrophages se trouve dans le volume irradié, laissant l'opportunité aux macrophages situés en dehors du champ d'irradiation de participer à l'infiltrat macrophagique observé, ce qui n'est pas possible lors d'une irradiation en thorax entier. Nos résultats soulignent l'importance de continuer à acquérir des connaissances sur des modèles précliniques implémentés plus proches de la clinique et plus pertinents en termes de volume irradié que le modèle d'irradiation en thorax entier. Utiliser ces nouveaux modèles pourrait améliorer les connaissances déjà acquises sur des modèles plus anciens, à ouvrir de nouvelles voies de recherche et pourquoi pas à découvrir de nouvelles opportunités thérapeutiques pour lutter contre les séquelles pulmonaires des radiothérapies thoraciques.

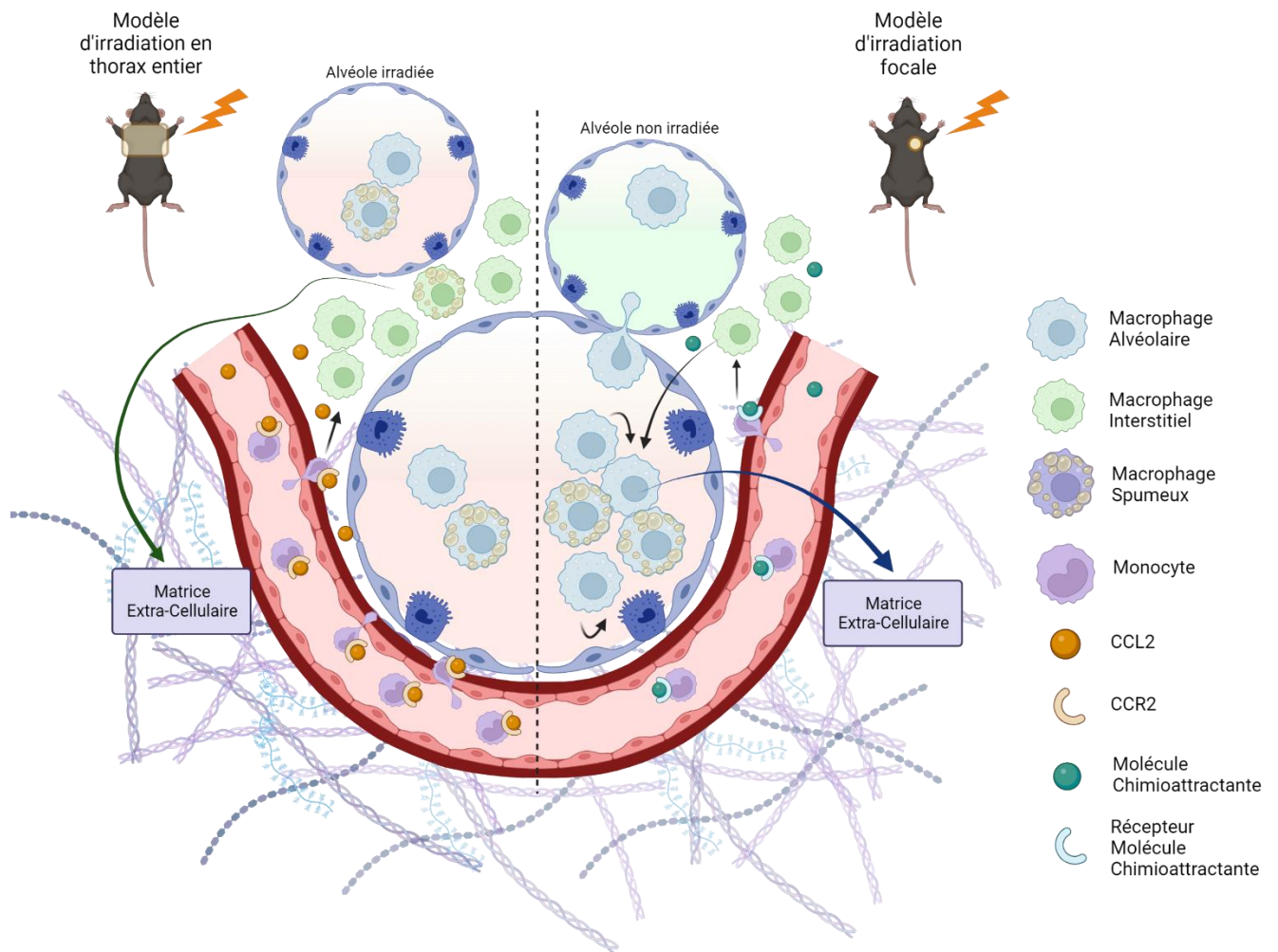


Figure 35 : Schéma bilan de l'impact du modèle d'irradiation sur l'implication des macrophages dans les lésions pulmonaires radio-induites

Le modèle d'irradiation en thorax entier chez la souris (à gauche sur le schéma) induit le recrutement via l'axe CCR2/CCL2 des monocytes circulants, se différenciant en macrophages interstitiels. Ce sont les macrophages interstitiels qui participent principalement au développement de la fibrose et au dépôt de matrice extra-cellulaire dans ce modèle. Les alvéoles environnantes sont également irradiées. Le modèle d'irradiation focale chez la souris (à droite sur le schéma) induit du recrutement indépendant de l'axe CCR2/CCL2. Les macrophages alvéolaires des alvéoles saines environnantes sont capables d'alimenter le pool de macrophages alvéolaires présents au niveau de la lésion radio-induite. Ce modèle induit également la prolifération des macrophages alvéolaires et leur reprogrammation métabolique aboutissant à un phénotype spumeux. Dans ce modèle, ce sont les macrophages alvéolaires qui semblent participer principalement au développement de la fibrose et au dépôt de matrice extra-cellulaire.

Annexes



Preclinical Model of Stereotactic Ablative Lung Irradiation Using Arc Delivery in the Mouse: Is Fractionation Worthwhile?

Annaïg Bertho¹, Morgane Dos Santos², Sarah Braga-Cohen¹, Valérie Buard¹, Vincent Paget¹, Olivier Guipaud¹, Georges Tarlet¹, Fabien Milliat¹ and Agnès François^{1*}

¹ Laboratory of Radiobiology of Medical Exposures, Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN), Research Department in Radiobiology and Regenerative Medicine, Fontenay-aux-Roses, France, ² Laboratory of Radiobiology of Accidental Exposures, Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN), Research Department in Radiobiology and Regenerative Medicine, Fontenay-aux-Roses, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Marta Bueno,
University of Pittsburgh, United States

Reviewed by:

Bradley T. Scroggins,
National Cancer Institute (NCI),
United States
Charles Fouillade,
Institut Curie, France

*Correspondence:

Agnès François
agnes.francois@irsn.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Pulmonary Medicine,
a section of the journal
Frontiers in Medicine

Received: 13 October 2021

Accepted: 07 December 2021

Published: 24 December 2021

Citation:

Bertho A, Dos Santos M, Braga-Cohen S, Buard V, Paget V, Guipaud O, Tarlet G, Milliat F and François A (2021) Preclinical Model of Stereotactic Ablative Lung Irradiation Using Arc Delivery in the Mouse: Is Fractionation Worthwhile? *Front. Med.* 8:794324. doi: 10.3389/fmed.2021.794324

Lung stereotactic body radiation therapy is characterized by a reduction in target volumes and the use of severely hypofractionated schedules. Preclinical modeling became possible thanks to rodent-dedicated irradiation devices allowing accurate beam collimation and focal lung exposure. Given that a great majority of publications use single dose exposures, the question we asked in this study was as follows: in incremented preclinical models, is it worth using fractionated protocols or should we continue focusing solely on volume limitation? The left lungs of C57BL/6JRj mice were exposed to ionizing radiation using arc therapy and 3 × 3 mm beam collimation. Three-fraction schedules delivered over a period of 1 week were used with 20, 28, 40, and 50 Gy doses per fraction. Lung tissue opacification, global histological damage and the numbers of type II pneumocytes and club cells were assessed 6 months post-exposure, together with the gene expression of several lung cells and inflammation markers. Only the administration of 3 × 40 Gy or 3 × 50 Gy generated focal lung fibrosis after 6 months, with tissue opacification visible by cone beam computed tomography, tissue scarring and consolidation, decreased club cell numbers and a reactive increase in the number of type II pneumocytes. A fractionation schedule using an arc-therapy-delivered three fractions/1 week regimen with 3 × 3 mm beam requires 40 Gy per fraction for lung fibrosis to develop within 6 months, a reasonable time lapse given the mouse lifespan. A comparison with previously published laboratory data suggests that, in this focal lung irradiation configuration, administering a Biological Effective Dose ≥ 1000 Gy should be recommended to obtain lung fibrosis within 6 months. The need for such a high dose per fraction challenges the appropriateness of using preclinical highly focused fractionation schedules in mice.

Keywords: radiation, lung, stereotactic body radiation therapy, fibrosis, mouse, fractionation

INTRODUCTION

Thoracic radiation therapy exposes healthy lung tissue to ionizing radiation, responsible for the development of radiotherapy-associated side effects such as radiation-induced pneumonitis and fibrosis (1–3). Historical preclinical models of conventional radiotherapy-associated toxicity include whole thorax and hemithoracic irradiation in mice and rats. Since the pioneering studies by Travis et al. (4, 5), these models have paved the way for significant advances in the understanding of tissular, cellular and molecular mechanisms of radiation pneumonitis and fibrosis (6).

Therapeutic management of early stage lung tumors has radically changed in recent years, with the use of stereotactic body radiation therapy (SBRT) for the treatment of early stage non-small cell lung cancer [NSCLC (7)]. SBRT includes changes in two main parameters in radiation therapy schedules compared to conventional radiotherapy: significantly reduced irradiated target volume and severe hypofractionation. Thanks to adapted or dedicated small animal irradiation devices generating image-guided highly focused beams with submillimetric precision (8), several studies have been published describing the consequences of radiation exposure of limited lung volumes in mice. Previously reported data used different collimated beams, ranging from 1 mm diameter to 10×10 mm and a broad range of single doses from 10 to 120 Gy. The lung has a large reserve capacity and the volume exposed to ionizing radiation is a strong determinant of its functional tolerance (9). Unsurprisingly, the larger the exposed volume is, the lower the possible dose that can be delivered without generating high animal mortality (10–12). Using 3×3 mm beam collimation, which seems to be the most suitable for modeling SBRT in mice (11, 13–16), the dose delivered in one single fraction can be as high as 120 Gy (and possibly higher) without associated animal mortality (12), providing that the delivery methods include multiple beam entries to avoid life-threatening thoracic skin/muscle lesions. This highlights the strong volume impact when considering lung response to radiation exposure. Moreover, several authors argue in favor of considering that specificities exist in the response to limited lung volume exposure, such as different patterns of serum cytokine changes (16) or specific gene and protein expression following small field exposure compared to large field (17).

In addition to changes in lung target volume, SBRT is characterized by the use of severe hypofractionation. With its parallel organization, the lung is known to be a good candidate for such changes in fractionation schedules (18). However, the impact of such severe hypofractionation associated with reduced exposed volume on the normal lung merits further investigation. All previously published data on limited lung volume exposure has used single doses, except for three studies. The work of Du et al. (19) demonstrated the effective targeting of spontaneous lung tumors in a genetically-engineered mouse model using 3 weekly fractions of 20 Gy with 5×5 mm beam collimation. The authors did not report any normal tissue damage in this configuration, while pointing out that experiments stopped 8 weeks post-exposure, probably too short a time for fibrosis to develop. Delivering 3×6.67 Gy to the mouse lung using

5×5 mm beam collimation induced changes in lung tissue density but no change in the Ashcroft score within 26 weeks post-exposure (20). Finally, the study by Soysouvanh et al. showed that no lung fibrosis occurred following 5 fractions of 20 Gy using 3×3 mm collimated beam even 15 months post-exposure (21).

With a view to opening up the possibilities for future research, the question we addressed in this study work was as follows: in incremented models of preclinical SBRT exposure with reduced target volumes, is it worth using fractionated protocols or should we continue focusing solely on volume limitation? In this study, we show that using a 3 fractions/1 week regimen, a dose per fraction of at least 40 Gy is necessary for the development of lung fibrosis within 6 months, a reasonable time lapse given the mouse lifespan. No dose-effect was seen for the parameters measured, suggesting a threshold effect for lung fibrosis development. The need for such a high dose per fraction challenges the appropriateness of using preclinical highly focused fractionation schedules in mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Irradiation Procedure

Male C57BL/6J mice from Janvier Labs (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 the 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).

Irradiation was performed on the SARRP (Small Animal Radiation Research Platform, XSTRAHL Ltd., UK) using arc therapy. The muriplan treatment planning system was calibrated by Xstrahl during the commission of the SARRP platform. For that, the reference dose rate was measured in dose to water with a cylindrical ionization chamber and depth doses using EBT3 radiochromic films for each collimator were performed. After this calibration carried out by the company, we have completed the characterization of the SARRP by making Half Value Layer measurements (HVL) and reference dosimetry measurements with ionization chamber following the AAPM TG61 protocol (22). Moreover, dose profiles using EBT3 films were also performed at different depths for each collimator. For the 3×3 mm irradiation field at 1 cm depth, the dose rate is about 2.3 Gy/min in dose to water. Daily, to ensure the proper functioning of the platform and the proper delivery of the beam, reference dose rate measurements (AAPM TG61 protocol) are performed with an ionization chamber. A maximal deviation of 1% from the reference value is accepted. Each month, quality controls concerning positioning and targeting are also carried out.

For irradiation, mice were anesthetized using 100 mg/kg ketamine (Imalgene 1000) and 10 mg/kg xylazine (Rompun[®])

2%, Bayer Healthcare, France) to create profound anesthesia and limit respiratory motion as far as possible. Anesthetized mice were immobilized on a restraint treatment bed and the isocenter was placed on the left lung on the CBCT image using the treatment planning system Muriplan[®], by taking anatomical landmarks for reference. CBCT images were obtained using an uncollimated beam (20 × 20 cm), a high voltage of 60 kV, an intensity of 0.8 mA with an inherent and additional filtration of 0.8 and 1 mm of beryllium and aluminum respectively, with continuous beam on and 360° (horizontal) stage rotation between the x-ray source and the digital flat panel detector. A total of 236 projections were obtained and a 3D reconstruction image of the mouse was transferred to the Muriplan[®] dose planning, verification and delivery system. After image segmentation into air, lung, fat, tissue and bone, we then placed the isocenter within the left lung. 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.

The left lung was exposed to 3-fraction irradiation schedules (Monday, Wednesday and Friday), with different doses per fraction, i.e., 20, 28, 40 or 50 Gy, delivering total doses of 60, 84, 120 or 150 Gy respectively. The fractionation schedules were chosen based on the results obtained by Lavigne et al. (23). Indeed, following arc-delivered 3 × 3 mm collimated beam of 90 Gy to the mouse lung, Lavigne et al. observed that decreased lung capacity was significantly impacted by lung volumes receiving 30 Gy or more, i.e., 30% of the prescribed dose. Regarding the strong volume impact on lung damage, we decided, for the purposes of our fractionation strategy, to track the Biological Effective Dose (BED) received at the 30% isodose. BED was calculated as follows: $D[1+(d/\alpha/\beta)]$; with D as total dose, d as dose per fraction and α/β as alpha/beta ratio. We thus applied an α/β ratio of 3 Gy for normal lung and constructed four fractionation schedules focused on a BED at the 30% isodose close to 100 Gy (108 Gy, 3 × 28 Gy), corresponding to the limit generally accepted for normal tissue in clinical practice, a BED <100 Gy (61 Gy, 3 × 20 Gy) and two BED values higher than 100 Gy, i.e., 208 and 304 Gy for 3 × 40 and 3 × 50 Gy, respectively. These fractionation protocols gave BED values to the isocenter of 460, 868, 1720, and 2650 Gy for 20, 28, 40, and 50 Gy per fraction, respectively.

An arc therapy treatment using a 3 × 3 mm collimator with immobile stage and 220° gantry rotation from -110 to 110° was planned for each fraction. To be able to irradiate the same region on the left lung, CBCT images of the first fraction were co-recorded and manually superimposed over the day's CBCT images.

MicroCT Imaging

Mice were anesthetized by inhalation of 1.5% isoflurane. Mouse lung imaging was performed using two micro-CT scanners (Quantum FX and Quantum GX2, PerkinElmer) with respiratory gating. On the Quantum FX, images (performed at the *Plateforme d'imagerie du vivant, Université Paris Descartes, Faculté de Chirurgie Dentaire*) were acquired at 90 kV, 160 μ A, no additional

filtration and with a field of view of about 20 × 20 × 20 mm for a resolution of 40 μ m. The estimated shooting time was about 4 min and 30 s and 512 slices were acquired. The mean dose absorbed by the mice was about 1653 mGy. On the Quantum GX2 (IRSN), images were acquired at 90 kV, 88 μ A, with an additional filtration of 0.06 mm of copper + 0.5 mm of aluminum and with a field of view of about 36 mm with a reconstruction of 25 mm allowing for a resolution of 50 μ m. The estimated shooting time was about 4 min and 512 slices were acquired. The mean dose absorbed by the mice was about 900 mGy of dose to water.

The images were analyzed using AnalyzePro Software, which allows for semi-automatic and manual segmentation. The main bronchi and right and left lungs were segmented using the semi-automatic option with the same threshold range for each mouse in order to be able to compare them. Lesions induced by irradiation—the injury patch—were manually contoured by the same operator. From these segmentations, volumes were computed and, for each volume, Hounsfield Unit (HU) histograms were extracted using a bin width of 1-HU. For density distribution representation, smoothing curves were constructed using PRISM software applying second-order smoothing with 60 neighbors.

Lung Tissue Treatment

Studies were performed 6 months post-exposure. Given the small size of the irradiated area, different animals were dedicated to histological analyses and mRNA preparations. For histology, the right and left lungs were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Five-micrometer paraffin tissue sections were used for HES and Masson's trichrome staining and for immunohistological studies. For the purposes of mRNA preparation, the irradiated area, ipsilateral and contralateral lung tissues were frozen in an RNAlater[™] RNA Stabilization Reagent (Qiagen, CA) pending analysis. To avoid variations in the structural/cellular constitution of different areas of the lung, age-matched control/unirradiated mice were included for lung imaging and histological analyses and measurements were performed in matched areas between irradiated and non-irradiated mice.

Histopathology and Immunohistochemistry

HES and Masson's trichrome-stained tissue sections were used to assess overall lesion severity. The thickness of the alveolar septa was measured using the Visiol@b[™]2000 image analysis software (Biocom SA, France). Immunostaining of club cells (uteroglobin, UGB) and type II pneumocytes (prosurfactant protein C, SFTPC) was used to monitor parenchymal and epithelial lung damage.

UGB-positive cells were counted on the bronchiolar epithelium both inside and far from the injured area, taking into consideration at least three different bronchioles. UGB-positive cells were expressed as a percentage of total cells. The total number of cell nuclei per 100 μ m was also tracked in order to monitor radiation-induced variations in total epithelial cell density. SFTPC-positive cells were counted both inside and far

from the injured area with between 3 and 5 different fields (X 400 magnification).

Tissue RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR

Total RNA was prepared using the mirVana isolation kit (Thermo Fisher Scientific, France). After quantification on a NanoDrop ND-1000 apparatus (NanoDrop Technologies, DE), reverse transcription was performed with 1 μ g of RNA using a reverse transcription kit from Applied Biosystems (France). Relative mRNA was quantified using the $\Delta\Delta$ CT method with 18S as the housekeeping gene. Genes were chosen as lung cell markers or according to their proven role in lung tissue inflammatory response to radiation exposure.

Statistics

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

RESULTS

Lung Fibrosis at 6 Months Is Obtained for 3 \times 40 Gy or More

Focal fractionated irradiation can be achieved successfully using the scanner image performed for the first fraction as a repositioning standard before each next fraction (Figure 1A). At 6 months post-irradiation, a well-defined injury patch was detectable on the CBCT imaging using 40 and 50 Gy per fraction only (Figure 1B, upper line). Three-dimensional reconstruction confirmed well-defined severe tissue damage at these doses per fraction (Figure 1B, lower line, in red on the image). Lung tissue opacification was confirmed by mean smoothed HU curves showing an increased intensity of the patch (Figure 1C, left panel, mauve and orange curves). After 28 Gy per fraction, three mice showed slight opacification and two mice showed no injury patch when observing the CBCT images. Three-dimensional reconstruction gives an example of slight tissue damage when observable (Figure 1B, lower line). The HU curve for this schedule (dark blue) showed two peaks: the left peak corresponding to mice with no detectable opacification and the right peak to those developing detectable opacification. No sign of tissue damage was ever observable using CBCT or 3D reconstruction following 20 Gy per fraction. The patch volume calculation confirmed significant patch development after 40 and 50 Gy per fraction (Figure 1C, right panel). Conversely, no significant difference was observed between 20 and 28 Gy per fraction, confirming the small size of patches developed in the three mice concerned after 28 Gy per fraction. Note that the patches are smaller than the theoretical exposed volume due to tissue stricture and consolidation. Macroscopic observation showed white stricture across the left lung indicative of severe radiation-induced tissue scarring for 40 and 50 Gy per fraction (Figure 1D, arrows). No such tissue consolidation was observed following 20 and 28 Gy per fraction schedules.

Both 40 and 50 Gy per fraction schedules generated tissue fibrosis, as observed on left lung histological sections (Figure 2A, asterisk), showing dense radiation-induced tissue damage. For 3 \times 28 Gy, a cartography of a mouse displaying slight opacification on CBCT is given as an example, but there is no well-defined injury patch compared to 40 and 50 Gy per fraction. Note the stricture visible on the top right of the 3 \times 50 Gy cartography (arrows). Focal fibrosis was obtained only following the 40 and 50 Gy per fraction schedules, but all protocols generated significant parenchymal injury (Figure 2B) with a reactive increase in the thickness of the alveolar septa (Figure 2C).

Lung Fibrosis Is Associated With Loss of Club Cells and Increased Type II Pneumocyte Numbers

All fractionation schedules were associated with a significantly decreased number of cells per 100 μ m of bronchiolar epithelium measured in the injury patch or matched area, with a lesser effect following 20 Gy per fraction (Figure 3A, left-hand graph). No effect was seen in the right lung. Schedules with doses per fraction of 28, 40, and 50 Gy induced a loss of club cells, with repercussions in the right lung for 40 and 50 Gy per fraction (Figure 3A, middle graph). Interestingly, the 3 mice exposed to 3 \times 28 Gy displaying a slight injury patch showed a tendency to a lower number of club cells than those having no patch at all, bearing in mind that, with only two or three animals, this cannot be statistically tested (Figure 3A, right-hand graph).

Both the 40 and 50 Gy per fraction schedules induced increased type II pneumocyte numbers, with decreased numbers in the pleural area for all schedules (Figure 3B, left-hand graph). No significant change was observed in the right lung. The three mice displaying an injury patch after 3 \times 28 Gy exposure showed a tendency to have fewer SFTPC-positive cells than those displaying no patch (with reservations given that statistical analyses are not possible for club cell numbers), but all mice remained similar to the control mice, as indicated in the previous graph (Figure 3B, right-hand graph).

Figure 3C shows images as examples of club cells and type II pneumocytes immunostainings in control and 3 \times 40 Gy exposed lungs.

Gene Expression Levels Are Not Influenced by Fraction Size

Overall, lung cell markers were not strongly affected by irradiation at this time point and followed the club cell and type II pneumocyte numbers shown in Figure 3. *Ccsp* and *Cyp2f2* (club cell markers) were reduced after fractions of 50 Gy only, and 20, 28, and 50 Gy respectively (Figure 4A). SFTPC remained at control levels in the patch, ipsilateral and contralateral lungs. *Foxj1* (ciliated cell marker) increased in the patch following radiation exposure to 3 \times 28, 40, and 50 Gy. Gene expressions of classic inflammatory markers (*Cxcl2*, *Emr1*, *Il6*, and *Il1*) were very slightly influenced by fraction size (except *Emr1*). Note several repercussions on the ipsilateral and contralateral lungs. The profiles are shown in Figure 4B.

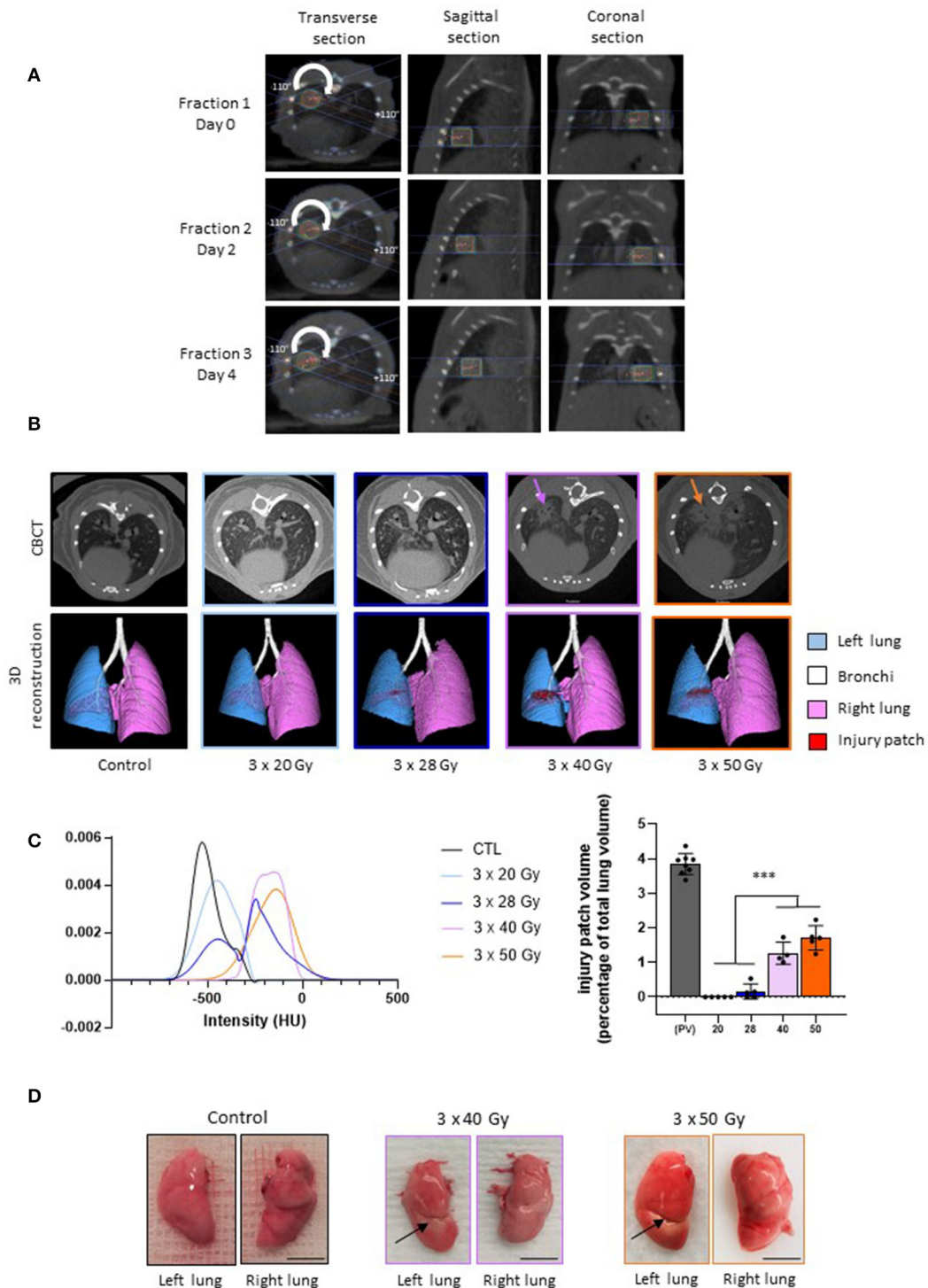


FIGURE 1 | Lung fractionated stereotactic arc therapy generates long-term lung fibrosis. **(A)** Treatment planning and repositioning for fractionated dose to the left lung in mice. Representative dose distribution of each fraction performed at Days 0, 2, and 4, with Day 0 as the day of the first fraction. Arc-therapy was applied from -110° to $+110^{\circ}$ (arrow). Images are given for the 3×40 Gy schedule. **(B)** Micro-computed tomography and 3-dimensional reconstructions performed in control mice and 6 months post-exposure to three fractions of 20, 28, 40, and 50 Gy irradiation. Arrows indicate focal radiation-induced lung opacification. **(C)** Left panel: smoothed mean intensity representation, in Hounsfield Units (HUs), in the patch (or in the corresponding area) from groups of mice exposed to 3×20 , 28, 40 or 50 Gy compared to control values; right panel: volume of the injury patch and expressed as a percentage of the total lung volume compared to the calculated planned volume (PV) exposed to ionizing radiation. For irradiated tissues, colors are the same as in the left panel. **(D)** Example of macroscopic observation of left and right lungs in control mice and 6 months following 3×40 and 3×50 Gy. Arrows indicate radiation-induced stricture. $n = 4-8$ per group. Scale bar represents 5 mm.

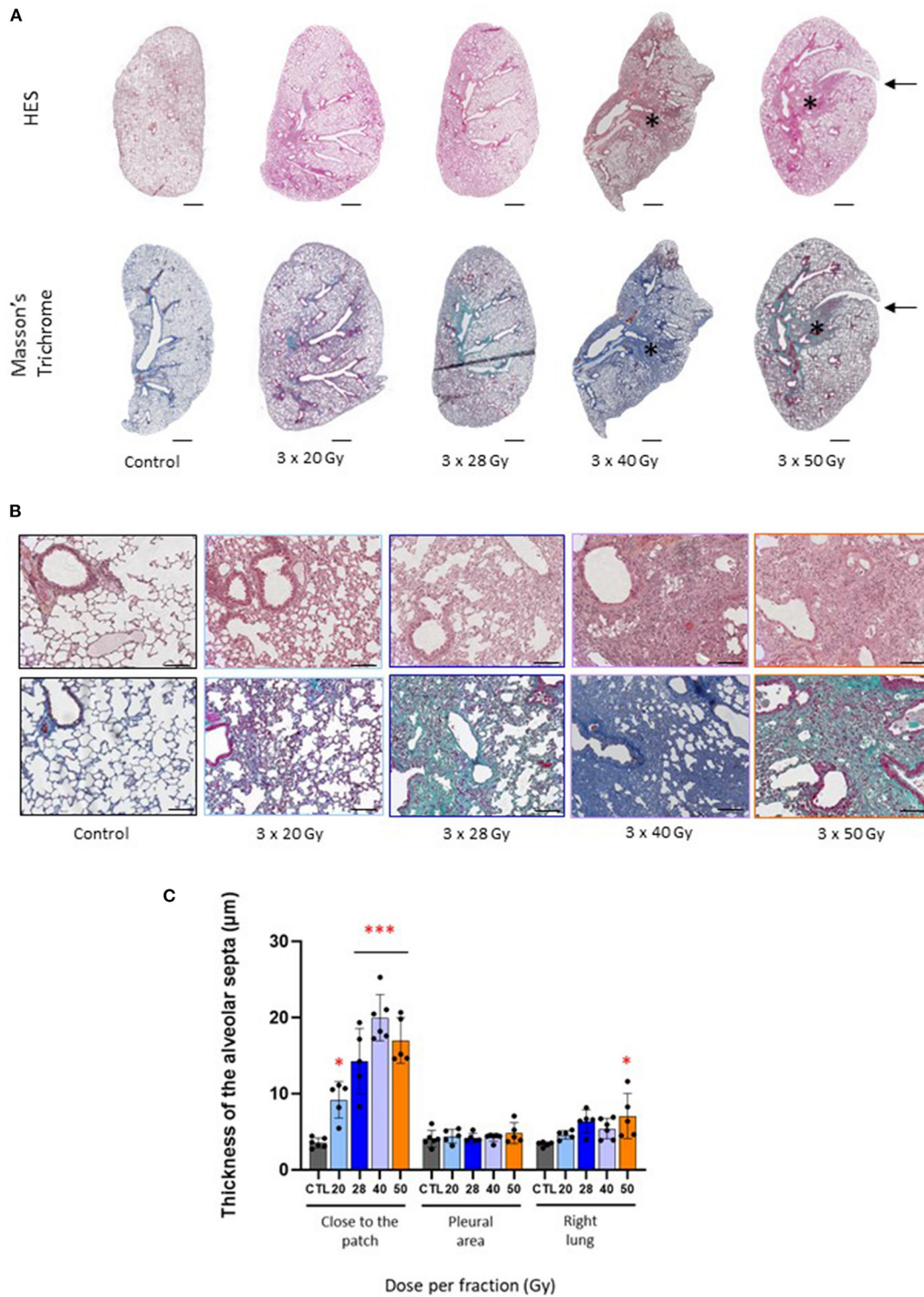


FIGURE 2 | Fraction size of 40 Gy or higher generates lung tissue fibrosis after 6 months. **(A)** Images of HES and Masson's trichrome stained control and focally irradiated left lungs 6 months following 3 × 20, 28, 40 or 50 Gy. Asterisk and arrows indicate radiation-induced fibrosis and stricture, respectively. Scale bar represents 1 mm. **(B)** Details of lung parenchymal damage induced by 3 × 20, 28, 40, and 50 Gy either following HES (upper line) or Masson's Trichrome staining (lower line). Scale bar represents 200 μm . **(C)** Thickness of the alveolar septa was measured close to the injury patch, far from the patch (near the pleura) and in the right lung 6 months following focal exposure to 3 × 20, 28, 40 or 50 Gy. Measurements were performed in corresponding areas for control tissues. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ compared to control group. $n = 5$ or 6 per group.

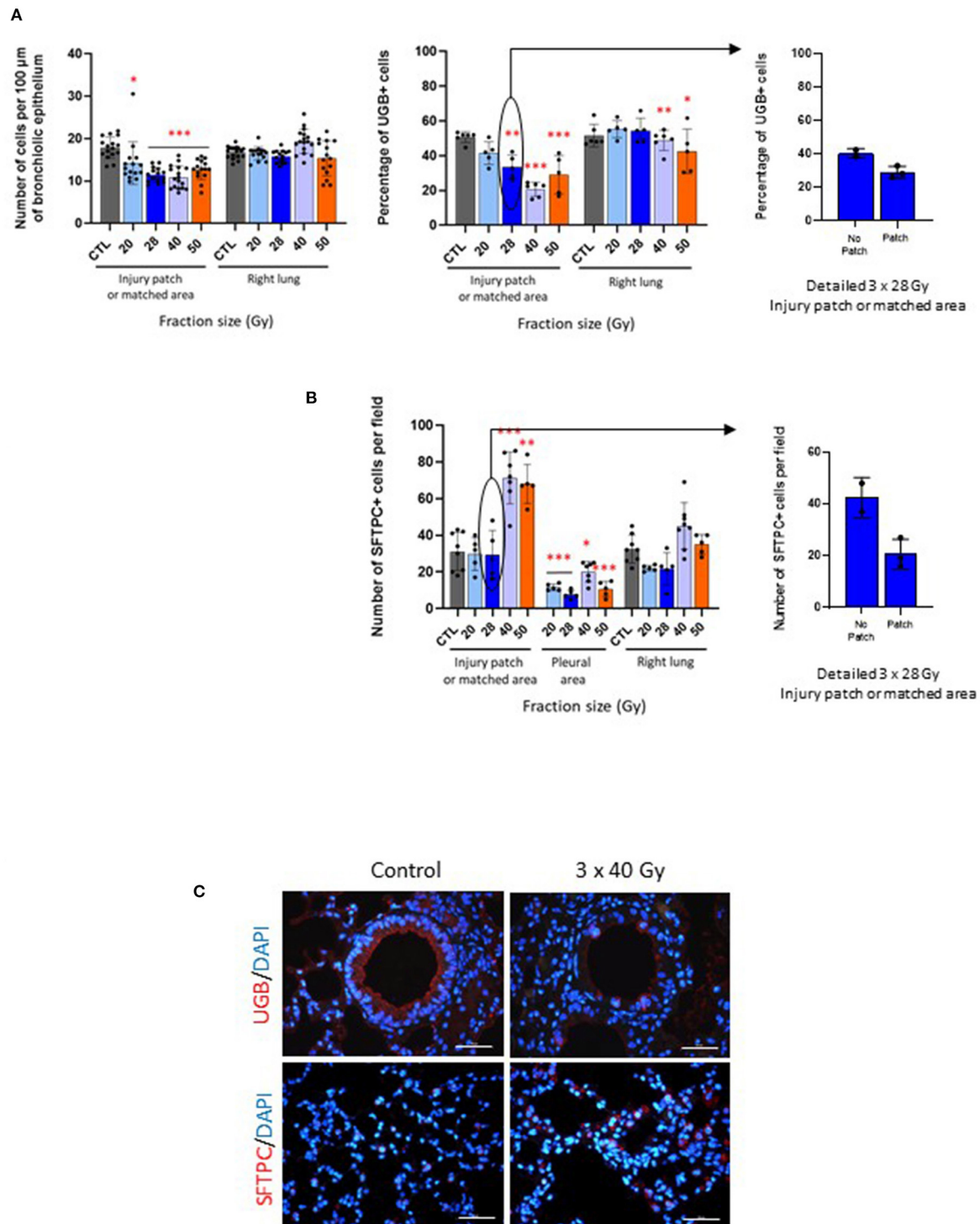


FIGURE 3 | Fibrosing schedules induce club cell loss and increased numbers of type II pneumocytes. **(A)** Number of cells per 100 μm of bronchiole epithelium (left-hand graph) and percentage of UGB-positive cells (middle graph) measured in the injury patch or matched area and right lungs in control and focally irradiated tissues 6 months after 3 \times 20, 28, 40 or 50 Gy. Right-hand graph shows detailed data for 3 \times 28 Gy-exposed mice with or without visible patch. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to respective control groups. $n = 5$ or 6 per group, except for number of cells: 1 point = 1 bronchiole. **(B)** Number of SFTPC-positive cells per field counted in the injury patch or matched area, far from the patch near the pleural area and in the right lung 6 months after 3 \times 20, 28, 40 or 50 Gy and in control tissue (left-hand graph). Right-hand graph shows detailed data for 3 \times 28 Gy-exposed mice with or without visible patch. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to respective control groups. $n = 5$ –8 per group. **(C)** Images of uteroglobin and pro-surfactant protein C immunostainings (UGB, marker of club cells and SFTPC, marker of type II pneumocytes, respectively) in control tissues and after 3 \times 40 Gy schedule as an example. Scale bar represents 100 μm .

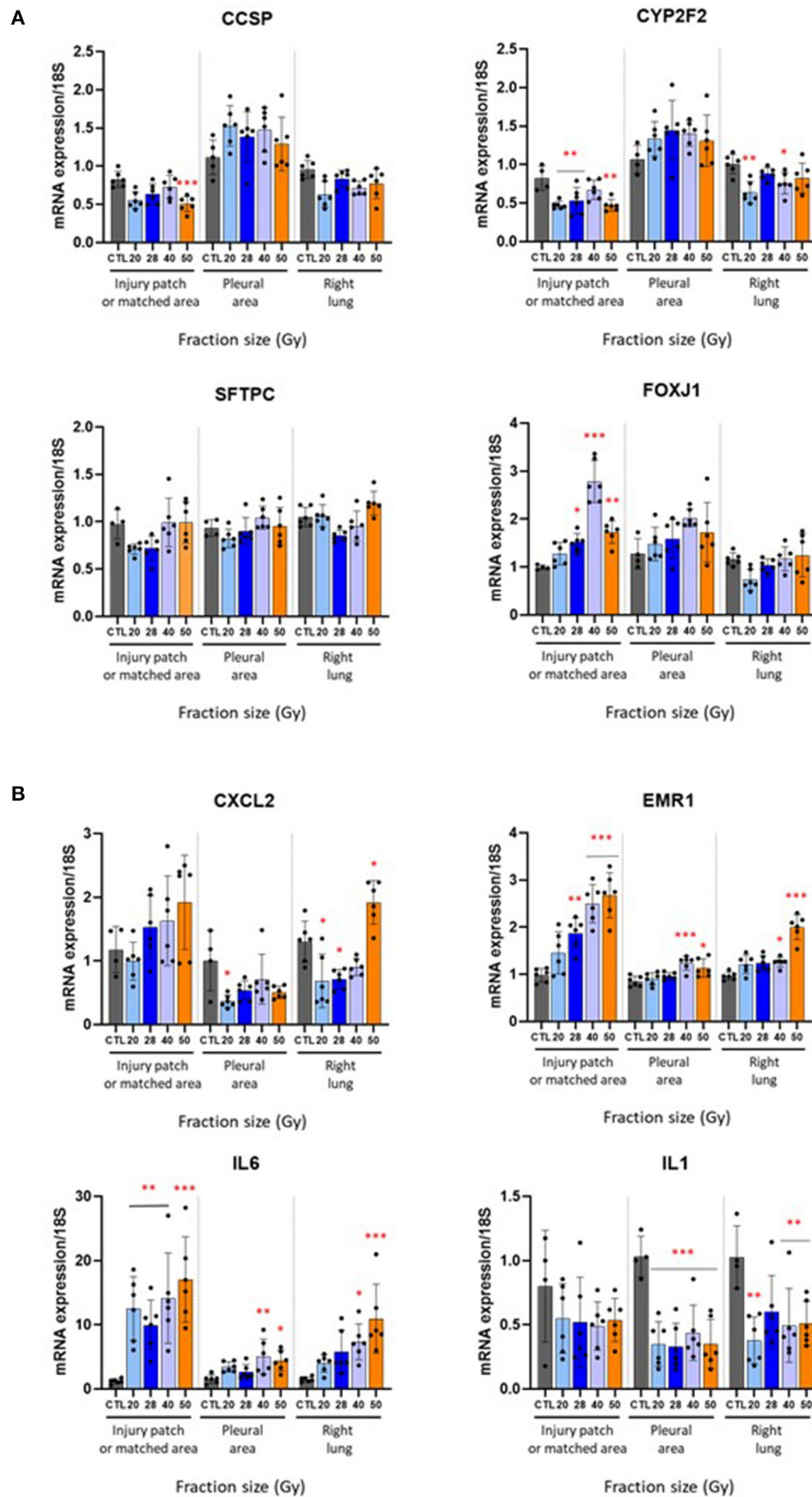


FIGURE 4 | Effect of different fractionation schedules on mRNA expression. Changes in gene expression levels in the injury patch or matched area, pleural area, and right lung 6 months after radiation exposure to 3×20 , 28, 40 or 50 Gy. **(A)** Club cell (CCSP, CYP2F2), type II pneumocytes (SFTPC), and ciliated cell (FOXJ1) markers. **(B)** Inflammatory mediators CXCL2, EMR1, IL6, and IL1. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to respective control groups. $n = 4-6$ per group.

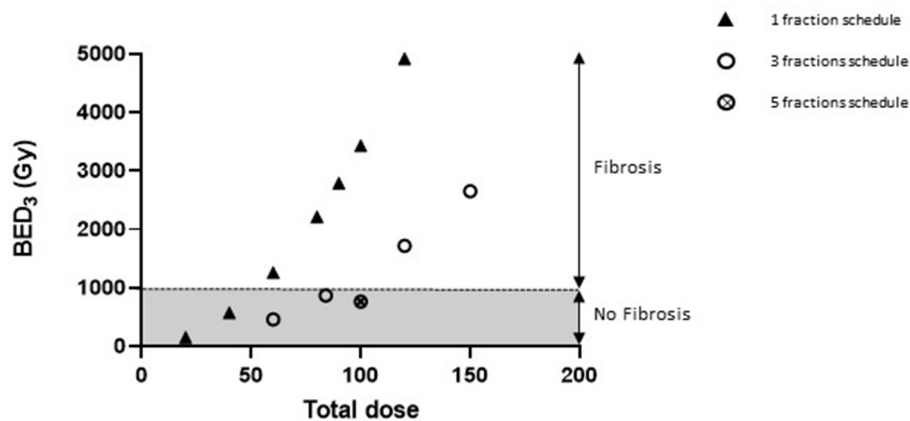


FIGURE 5 | A BED of 1000 Gy would be necessary for focal lung fibrosis development. Graphic representing the association between BED values (considering α/β ratio = 3 Gy for healthy lung tissue) and lung fibrosis development or otherwise within 6 months of irradiation. Data were obtained after arc therapy using 3×3 mm beam collimation from this study (three fractions schedules), from Lavigne et al. (23) (90 Gy single dose), Soysouvanh et al. (21) (90 Gy single dose and 5×20 Gy schedule), and Bertho et al. (12) (20–120 Gy single doses).

A Biological Effective Dose (BED_{3Gy}) of 1000 Gy May Be Considered as a Threshold for Focal Lung Fibrosis Development Within 6 Months in Our Irradiation Configuration

The association of the BED value with different total doses delivered following various schedules used in this study, as well as for previous publications from our laboratory, shows that a BED_{3Gy} of 1000 Gy (considering α/β ratio = 3 Gy for a healthy lung) seems to be a threshold for focal lung fibrosis development within 6 months (Figure 5).

DISCUSSION

The aim of this study was to determine whether or not it is worth using fractionated schedules in the context of SBRT preclinical modeling, compared, where possible, to what has previously been published in the literature relative to single doses.

The first challenge involved the choice of fractionation schedules. We based our choice on previous observations. To begin with, schedules with three fractions were chosen to limit uncertainties of animal repositioning during multiple fractions. Delivering five fractions generates diffuse injured areas and difficulties in damage contouring on CBCT images (21). A single study time-point at 6 months post-exposure was kept as a representative and relatively long period for lung fibrosis to develop, while remaining reasonable given mouse lifespan, and thus avoiding mouse aging and spontaneous lung tumor development. Before this time-point of 6 months and during the inflammatory period, injury is difficult to evaluate and contour using CBCT, resulting in imaging which is not particularly informative given the objective of this study. It should be borne in mind that the results of our study are valuable if we consider this time period of 6 months, but that it cannot be excluded that waiting longer may allow fibrosis to be observed. Finally,

following arc-delivered/ 3×3 mm beam collimation of 90 Gy to the mouse lung, Lavigne et al. observed that decreased lung capacity was significantly impacted by lung volumes receiving 30 Gy or more, i.e., 30% of the prescribed dose (23). We thus decided to construct fractionation schedules giving BEDs to the 30% isodose close to 100 Gy (108 Gy for 3×28 Gy), corresponding to the limit generally admitted for normal tissue in the clinic, a BED <100 Gy (61 Gy for 3×20 Gy) and two BED values higher than 100 Gy, i.e., 208 and 304 Gy for 3×40 and 3×50 Gy, respectively. We are aware that the choice of α/β ratio and BED calculation using the linear quadratic model (LQM) is controversial (24–26). It has been suggested that LQM is not appropriate for small dose (<1 Gy) and high dose (>10 Gy) exposures (25). Although some publications do show that LQM may be used in the range of 15–20 Gy (26), studies are still needed to confirm the relevance of using LQM in SBRT or to construct another model that can be used in the clinic, taking into account not only radiation-induced cell killing but also damage to the vascular and stromal systems (27). Last, it should be noted that Klement et al. recently concluded that it might be possible for clinical practitioners to use LQM to compare different fractionation schedules in SBRT for NSCLC, even if the α/β ratio for tumors may be greater than is generally accepted (28, 29). Nevertheless, and insofar as regards our study, conscious of the limitations of the model, we decided to use LQM anyway, knowing that our objective was to compare high doses per fraction and single dose schedules only, rather than make a comparison with conventional fractionation schedules. Hopefully, the future will tell us if such decisions were appropriate or not.

In this study, we show that administering 3×20 Gy does not lead to lung fibrosis when considering a period of 6 months. This schedule may be representative of some fractionation strategies used in clinical practice (30). This may be surprising considering that historical and ongoing publications on radiation-induced lung fibrosis demonstrate that doses of 15/20 Gy on the whole

thorax are sufficient to induce lung fibrosis (6, 31–33). This illustrates the strong volume impact encountered in parallel-organized organs such as the lung. Several studies used a single dose of 20 Gy, leading to fibrosis or not, depending on the volume exposed: using 7-mm-diameter field induced collagen deposition within 6 months (13), 5-mm circular parallel-opposed fields showed radiation-induced lung fibrosis at 39 weeks (34) and parallel opposed/5 × 5 mm-collimated beams generated lung fibrosis within 6 months (35). Interestingly, the Ashcroft score (26 weeks) following 20 Gy/5 × 5 mm-beam irradiation (20) was lower than following 15 Gy whole thorax exposure [20 weeks (36)]. Using the same 5 × 5 mm-beam collimation and 7 to 10 non-overlapping and non-opposing beams to target spontaneous lung tumors with 3 weekly fractions of 20 Gy, Du et al. did not observe any effect on normal tissue (19). In addition to the probably too early time point (8 weeks) mentioned by the authors, a smaller irradiated volume (beams target the tumor) may explain the lack of effects on normal tissue. We previously observed that using smaller beams (3 × 3 mm-collimated) did not induce lung fibrosis following a single dose of 20 Gy (12). In this study, and even delivering 3 × 20 Gy, a reduced irradiated volume and a probably lower mean lung dose (35) are responsible for the lack of lung fibrosis development, as observed by Soysouvanh et al., using the same beam arrangements and delivering 5 × 20 Gy (21).

A clinically relevant fractionation schedule of 3 × 20 Gy, exposing around 4% of the total mouse lung volume, is not sufficient to generate lung fibrosis in 6 months. When dose per fraction was increased, we obtained what we may call “not convincing” results regarding 3 × 28 Gy, which could appear as a threshold fractionation schedule, leading to lung fibrosis in some mice only. This needs to be confirmed, probably using a greater number of animals, for any definite conclusions to be drawn. Schedules using 40 and 50 Gy per fraction induced lung fibrosis in 6 months. The absence of dose-response effect relative to the parameters measured in this study (morphometrical measures, cell counting and gene expression levels) may suggest the notion of threshold. Only fibrosing schemes were associated with significant club cell depletion, as previously observed following single dose focal lung exposure (12). Club cells play an important role in lung epithelial homeostasis and repair (37). The absence of club cells compromises epithelial repair and favors peribronchiolar fibrosis (38), and chronic club cell depletion can be used as a model of lung fibrosis (39). Club cell depletion is also associated with 15 or 17 Gy radiation exposure to the whole thorax (32, 40) and plasma CCSP (club cell secretory protein) can be used as a marker for adverse radiation outcome and, especially, for fibrosis development in fibrosis-prone C57 mice [5 Gy total body + 10 Gy to the whole lung (41)], suggesting in this and in previously published work that loss of club cells may signal fibrosis development (12). Type II pneumocytes also show stem cell properties and participate in lung alveolar space in the case of injury (42, 43) and targeted injury of type II pneumocytes is sufficient to induce pulmonary fibrosis (44). Senescence, apoptosis and epithelial to mesenchymal transition (EMT) of type II pneumocytes may play a role in fibrosis development (45, 46). However, the data remains controversial,

with both decreased (45, 47) or increased numbers following both single or fractionated doses (32, 48, 49). In general, less is known about club cells and type II pneumocyte numbers following focal radiation exposure. Does the need for much higher doses to obtain significant club cell depletion and fibrosis reflect the possibility that surviving club cells will colonize damaged tissue from the margins? Is the increased number of type II pneumocytes beneficial to the lung or does this favor EMT? This merits further investigation.

As mentioned above, we are aware that BED calculation remains controversial for very high doses per fraction or single doses (25, 50). However, it may be observed that, in this study, protocols giving rise to tissue fibrosis within 6 months present similar BEDs to previously published studies using 3 × 3 mm collimation and arc therapy, i.e., probably above 1000 Gy (taking an α/β ratio of 3 Gy for a healthy lung) (12, 21, 23). In this case, however, we had to use very high doses per fraction to induce tissue fibrosis. The range of doses seems to be as dissimilar to clinical practice as the single doses used in previous publications mentioned above, raising questions as to the translational relevance of such models. Moreover, we observed some repercussions outside the irradiation field, as reported by Ghita et al. (35) and Lavigne et al. (23), describing acute ipsilateral red hepatization following 90 Gy focal exposure. This was particularly illustrated in the present study by changes in gene expression levels in the pleural area and ipsilateral lung, mainly occurring at higher doses per fraction. This suggests that there may be non-targeted effects but also an unintended dose received by neighboring tissue. This implies that the ipsilateral lung may not be considered as unirradiated, and thus justifies the use of independent control mice.

CONCLUSION

If we consider a reasonable number of fractions and overall treatment time, the fractionation schedules that can be used in preclinical models of SBRT with the objective of inducing tissue fibrosis within a reasonable time lapse cannot be more representative of clinical practice than previously published single doses. Considering that whole and hemi-thorax exposures already used doses in the ablative range, these new models of focal radiation exposure will influence tissue response more by volume reduction than by changes in the doses delivered and/or the schedule applied. We will probably have to accept being far from the schedules/doses used in a clinical setting and will probably have to consider volume-related clinical relevance rather than dose/schedule-related relevance. The remaining questions tend toward tumor-bearing models. Does a schedule exist that could be used to target a lung tumor while irradiating a sufficient volume of normal tissue, allowing enough time for side effects to develop? This warrants further exciting study.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary materials, further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Ethics Committee #81 and French Ministry of Research under the reference APAFIS#13021-2018011217442982 v1.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AF and FM contributed to the conception and design of the study. MD constructed the model. AB, MD, SB-C, VB, GT, and AF collected and interpreted the data. AF and AB wrote the first manuscript draft. FM, MD, VP, and OG realized critical review of the manuscript. All authors

contributed to manuscript revision, read, and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the ROSIRIS program, with funding from IRSN, Cancéropôle d'Île de France and INCA, Institut National du Cancer (INCa 2018-1-PL BIO-06-).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Groupe de Soutien à l'Experimentation Animale (GSEA) for their excellent animal care support.

REFERENCES

- Giuranno L, Ient J, De Ruyscher D, Vooijs MA. Radiation-Induced Lung Injury (RILI). *Front Oncol.* (2019) 9:877. doi: 10.3389/fonc.2019.00877
- De Ruyscher D, Niedermann G, Burnet NG, Siva S, Lee AWM, Hegi-Johnson F. Radiotherapy toxicity. *Nat Rev Dis Primers.* (2019) 5:13. doi: 10.1038/s41572-019-0064-5
- Hanania AN, Mainwaring W, Ghebre YT, Hanania NA, Ludwig M. Radiation-induced lung injury: assessment and management. *Chest.* (2019) 156:150–62. doi: 10.1016/j.chest.2019.03.033
- Travis EL, Harley RA, Fenn JO, Klobukowski CJ, Hargrove HB. Pathologic changes in the lung following single and multi-fraction irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* (1977) 2:475–90. doi: 10.1016/0360-3016(77)90159-6
- Travis EL. Early indicators of radiation injury in the lung: are they useful predictors for late changes? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* (1980) 6:1267–9. doi: 10.1016/0360-3016(80)90183-2
- Beach TA, Groves AM, Williams JP, Finkelstein JN. Modeling radiation-induced lung injury: lessons learned from whole thorax irradiation. *Int J Radiat Biol.* (2020) 96:129–44. doi: 10.1080/09553002.2018.1532619
- Rico M, Martinez M, Rodriguez M, Rosas L, Barco A, Martinez E. Hypofractionation and stereotactic body radiation therapy in inoperable locally advanced non-small cell lung cancer. *J Clin Transl Res.* (2021) 7:199–208. doi: 10.18053/jctres.07.202102.017
- Ghita M, Dunne V, Hanna GG, Prise KM, Williams JP, Butterworth KT. Preclinical models of radiation-induced lung damage: challenges and opportunities for small animal radiotherapy. *Br J Radiol.* (2019) 92:20180473. doi: 10.1259/bjr.20180473
- Hopewell JW, Trott KR. Volume effects in radiobiology as applied to radiotherapy. *Radiother Oncol.* (2000) 56:283–8. doi: 10.1016/S0167-8140(00)00236-X
- Cho J, Kodym R, Seliounine S, Richardson JA, Solberg TD, Story MD. High dose-per-fraction irradiation of limited lung volumes using an image-guided, highly focused irradiator: simulating stereotactic body radiotherapy regimens in a small-animal model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* (2010) 77:895–902. doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.12.074
- Hong ZY, Lee CG, Shim HS, Lee EJ, Song KH, Choi BW, et al. Time, dose, and volume responses in a mouse pulmonary injury model following ablative irradiation. *Lung.* (2016) 194:81–90. doi: 10.1007/s00408-015-9825-4
- Bertho A, Dos Santos M, Buard V, Paget V, Guipaud O, Tarlet G, et al. Preclinical model of stereotactic ablative lung irradiation using arc delivery in the mouse: effect of beam size changes and dose effect at constant collimation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* (2020) 107:548–62. doi: 10.1016/j.ijrobp.2020.03.011
- Choi SH, Hong ZY, Nam JK, Lee HJ, Jang J, Yoo RJ, et al. A hypoxia-induced vascular endothelial-to-mesenchymal transition in development of radiation-induced pulmonary fibrosis. *Clin Cancer Res.* (2015) 21:3716–26. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3193
- Kwon OS, Kim KT, Lee E, Kim M, Choi SH Li H, et al. Induction of MiR-21 by stereotactic body radiotherapy contributes to the pulmonary fibrotic response. *PLoS ONE.* (2016) 11:e0154942. doi: 10.1371/journal.pone.0154942
- Hong ZY, Eun SH, Park K, Choi WH, Lee JI, Lee EJ, et al. Development of a small animal model to simulate clinical stereotactic body radiotherapy-induced central and peripheral lung injuries. *J Radiat Res.* (2014) 55:648–57. doi: 10.1093/jrr/rrt234
- Hong ZY, Song KH, Yoon JH, Cho J, Story MD. An experimental model-based exploration of cytokines in ablative radiation-induced lung injury *in vivo* and *in vitro*. *Lung.* (2015) 193:409–19. doi: 10.1007/s00408-015-9705-y
- Jin H, Jeon S, Kang GY, Lee HJ, Cho J, Lee YS. Identification of radiation response genes and proteins from mouse pulmonary tissues after high-dose per fraction irradiation of limited lung volumes. *Int J Radiat Biol.* (2017) 93:184–93. doi: 10.1080/09553002.2017.1235297
- Nahum AE. The radiobiology of hypofractionation. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* (2015) 27:260–9. doi: 10.1016/j.clon.2015.02.001
- Du S, Lockamy V, Zhou L, Xue C, LeBlanc J, Glenn S, et al. Stereotactic body radiation therapy delivery in a genetically engineered mouse model of lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* (2016) 96:529–37. doi: 10.1016/j.ijrobp.2016.07.008
- Dunne V, Ghita M, Small DM, Coffey CBM, Weldon S, Taggart CC, 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.* (2017) 124:475–81. doi: 10.1016/j.radonc.2017.06.025
- Soysouvanh F, Benadjaoud MA, Dos Santos M, Mondini M, Lavigne J, Bertho A, et al. Stereotactic lung irradiation in mice promotes long-term senescence and lung injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* (2020) 106:1017–27. doi: 10.1016/j.ijrobp.2019.12.039
- Ma CM, Coffey CW, DeWerd LA, Liu C, Nath R, Seltzer SM, et al. AAPM protocol for 40-300 kV x-ray beam dosimetry in radiotherapy and radiobiology. *Med Phys.* (2001) 28:868–93. doi: 10.1118/1.1374247
- Lavigne J, Suissa A, Verger N, Dos Santos M, Benadjaoud M, Mille-Hamard L, et al. Lung stereotactic arc therapy in mice: development of radiation pneumopathy and influence of HIF-1alpha endothelial deletion. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* (2019) 104:279–90. doi: 10.1016/j.ijrobp.2019.01.081
- Brown JM, Carlson DJ, Brenner DJ. The tumor radiobiology of SRS and SBRT: are more than the 5 Rs involved? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* (2014) 88:254–62. doi: 10.1016/j.ijrobp.2013.07.022
- Kirkpatrick JP, Meyer JJ, Marks LB. The linear-quadratic model is inappropriate to model high dose per fraction effects in radiosurgery. *Semin Radiat Oncol.* (2008) 18:240–3. doi: 10.1016/j.semradonc.2008.04.005
- Brenner DJ. The linear-quadratic model is an appropriate methodology for determining isoeffective doses at large doses per fraction. *Semin Radiat Oncol.* (2008) 18:234–9. doi: 10.1016/j.semradonc.2008.04.004
- Song CW, Lee YJ, Griffin RJ, Park I, Koonce NA, Hui S, 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.* (2015) 93:166–72. doi: 10.1016/j.ijrobp.2015.05.016

28. Klement RJ, Sonke JJ, Allgauer M, Andratschke N, Appold S, Belderbos J, et al. Estimation of the alpha/beta ratio of non-small cell lung cancer treated with stereotactic body radiotherapy. *Radiother Oncol.* (2020) 142:210–6. doi: 10.1016/j.radonc.2019.07.008
29. Guckenberger M, Klement RJ, Allgauer M, Appold S, Dieckmann K, Ernst I, et al. Applicability of the linear-quadratic formalism for modeling local tumor control probability in high dose per fraction stereotactic body radiotherapy for early stage non-small cell lung cancer. *Radiother Oncol.* (2013) 109:13–20. doi: 10.1016/j.radonc.2013.09.005
30. Timmerman RD, Park C, Kavanagh BD. The North American experience with stereotactic body radiation therapy in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* (2007) 2(7 Suppl. 3):S101–12. doi: 10.1097/JTO.0b013e318074e4fa
31. Travis EL, Down JD, Holmes SJ, Hobson B. Radiation pneumonitis and fibrosis in mouse lung assayed by respiratory frequency and histology. *Radiat Res.* (1980) 84:133–43. doi: 10.2307/3575224
32. Lavigne J, Soysouvanh F, Buard V, Tarlet G, Guipaud O, Paget V, 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.* (2017) 99:972–82. doi: 10.1016/j.ijrobp.2017.07.007
33. Zhou C, Jones B, Moustafa M, Schwager C, Bauer J, Yang B, et al. Quantitative assessment of radiation dose and fractionation effects on normal tissue by utilizing a novel lung fibrosis index model. *Radiat Oncol.* (2017) 12:172. doi: 10.1186/s13014-017-0912-y
34. Granton PV, Dubois L, van Elmt W, van Hoof SJ, Lieuwe NG, De Ruysscher D, 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.* (2014) 90:696–704. doi: 10.1016/j.ijrobp.2014.07.004
35. Ghita M, Dunne VL, McMahon SJ, Osman SO, Small DM, Weldon S, et al. Preclinical evaluation of dose-volume effects and lung toxicity occurring in and out-of-field. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* (2019) 103:1231–40. doi: 10.1016/j.ijrobp.2018.12.010
36. Li X, Duan L, Yuan S, Zhuang X, Qiao T, He J. Ferroptosis inhibitor alleviates Radiation-induced lung fibrosis (RILF) via down-regulation of TGF-beta1. *J Inflamm (Lond).* (2019) 16:11. doi: 10.1186/s12950-019-0216-0
37. Rokicki W, Rokicki M, Wojtacha J, Dzeljijli A. The role and importance of club cells (Clara cells) in the pathogenesis of some respiratory diseases. *Polish J Cardio Thorac Surg.* (2016) 13:26–30. doi: 10.5114/kitp.2016.58961
38. Perl AK, Riethmacher D, Whitsett JA. Conditional depletion of airway progenitor cells induces peribronchiolar fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* (2011) 183:511–21. doi: 10.1164/rccm.201005-0744OC
39. Aoshiba K, Tsuji T, Itoh M, Semba S, Yamaguchi K, Nakamura H, et al. A murine model of airway fibrosis induced by repeated naphthalene exposure. *Exp Toxicol Pathol.* (2014) 66:169–77. doi: 10.1016/j.etp.2014.01.001
40. Manning CM, Johnston CJ, Hernady E, Miller JN, Reed CK, Lawrence BP, et al. Exacerbation of lung radiation injury by viral infection: the role of Clara cells and Clara cell secretory protein. *Radiat Res.* (2013) 179:617–29. doi: 10.1667/RR3279.1
41. Groves AM, Williams JP, Hernady E, Reed C, Fenton B, Love T, et al. A potential biomarker for predicting the risk of radiation-induced fibrosis in the lung. *Radiat Res.* (2018) 190:513–25. doi: 10.1667/RR15122.1
42. Barkauskas CE, Counce MJ, Rackley CR, Bowie EJ, Keene DR, Stripp BR, et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest.* (2013) 123:3025–36. doi: 10.1172/JCI68782
43. Jansing NL, McClendon J, Henson PM, Tuder RM, Hyde DM, Zemans RL. Unbiased quantitation of alveolar type II to alveolar type I cell transdifferentiation during Repair after lung injury in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (2017) 57:519–26. doi: 10.1165/rmb.2017-0037MA
44. Sisson TH, Mendez M, Choi K, Subbotina N, Courey A, Cunningham A, et al. Targeted injury of type II alveolar epithelial cells induces pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* (2010) 181:254–63. doi: 10.1164/rccm.200810-1615OC
45. Citrin DE, Shankavaram U, Horton JA, Shield W. 3rd, Zhao S, Asano H, et al. Role of type II pneumocyte senescence in radiation-induced lung fibrosis. *J Natl Cancer Inst.* (2013) 105:1474–84. doi: 10.1093/jnci/djt212
46. Xiong S, Pan X, Xu L, Yang Z, Guo R, Gu Y, et al. Regulatory T cells promote beta-catenin-mediated epithelium-to-mesenchyme transition during radiation-induced pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* (2015) 93:425–35. doi: 10.1016/j.ijrobp.2015.05.043
47. Osterreicher J, Pejchal J, Skopek J, Mokry J, Vilasova Z, Psutka J, et al. Role of type II pneumocytes in pathogenesis of radiation pneumonitis: dose response of radiation-induced lung changes in the transient high vascular permeability period. *Exp Toxicol Pathol.* (2004) 56:181–7. doi: 10.1016/j.etp.2004.08.003
48. Coggle JE. Proliferation of type II pneumonocytes after X-irradiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* (1987) 51:393–9. doi: 10.1080/09553008714550891
49. Almeida C, Nagarajan D, Tian J, Leal SW, Wheeler K, Munley M, et al. The role of alveolar epithelium in radiation-induced lung injury. *PLoS ONE.* (2013) 8:e53628. doi: 10.1371/journal.pone.0053628
50. Macia IGM. Radiobiology of stereotactic body radiation therapy (SBRT). *Rep Pract Oncol Radiother.* (2017) 22:86–95. doi: 10.1016/j.rpor.2017.02.010

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Bertho, Dos Santos, Braga-Cohen, Buard, Paget, Guipaud, Tarlet, Milliat and François. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Bibliographie

Les figures de ce manuscrit de thèse ont été réalisées avec BioRender.com, grâce à une licence du laboratoire.

1. Dahl R, Mygind N. Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease. *Advanced drug delivery reviews*. 1998;29(1-2):3-12. Epub 2000/06/06.
2. Bryche B, St Albin A, Murri S, Lacote S, Pulido C, Ar Gouilh M, et al. Massive transient damage of the olfactory epithelium associated with infection of sustentacular cells by SARS-CoV-2 in golden Syrian hamsters. *Brain, behavior, and immunity*. 2020;89:579-86. Epub 2020/07/07.
3. Harkema JR, Carey SA, Wagner JG. The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicologic pathology*. 2006;34(3):252-69. Epub 2006/05/16.
4. Cappello ZJ, Tang DM, Roxbury CR, Lobo BC, Borghei-Razavi H, Woodard TD, et al. Utility of the Nasoseptal "Rescue" Flap Approach: Analysis of 125 Consecutive Patients and Implications for Routine Transsphenoidal Surgery. *American journal of rhinology & allergy*. 2020;34(2):269-75. Epub 2019/12/05.
5. Pan H, Deutsch GH, Wert SE. Comprehensive anatomic ontologies for lung development: A comparison of alveolar formation and maturation within mouse and human lung. *Journal of biomedical semantics*. 2019;10(1):18. Epub 2019/10/28.
6. Hox V, Gohy S, Hupin C, Ladjemi MZ, Pilette C. Le rôle clé de l'épithélium dans les affections inflammatoires chroniques des voies respiratoires supérieures. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*. 2020;25:37.
7. Rogers DF. Airway goblet cells: responsive and adaptable front-line defenders. *The European respiratory journal*. 1994;7(9):1690-706. Epub 1994/09/01.
8. Degan S, Lopez GY, Kevill K, Sunday ME. Gastrin-releasing peptide, immune responses, and lung disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1144:136-47. Epub 2008/12/17.
9. Boers JE, den Brok JL, Koudstaal J, Arends JW, Thunnissen FB. Number and proliferation of neuroendocrine cells in normal human airway epithelium. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996;154(3 Pt 1):758-63. Epub 1996/09/01.
10. Plasschaert LW, Zilionis R, Choo-Wing R, Savova V, Knehr J, Roma G, et al. A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature*. 2018;560(7718):377-81. Epub 2018/08/03.
11. Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *The American journal of pathology*. 2004;164(2):577-88. Epub 2004/01/27.
12. Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(31):12771-5. Epub 2009/07/25.
13. Rokicki W, Rokicki M, Wojtacha J, Dzeljijli A. The role and importance of club cells (Clara cells) in the pathogenesis of some respiratory diseases. *Kardiochirurgia i torakochirurgia polska = Polish journal of cardio-thoracic surgery*. 2016;13(1):26-30. Epub 2016/05/24.
14. Treuting PM, Dintzis S, Montine KS. *Comparative anatomy and histology: a mouse, rat, and human atlas*: Academic Press; 2017.

15. Chen F, Fine A. Stem Cells in Lung Injury and Repair. *The American journal of pathology*. 2016;186(10):2544-50. Epub 2016/08/16.
16. Rawlins EL, Hogan BL. Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? *Development*. 2006;133(13):2455-65. Epub 2006/06/01.
17. Salwig I, Spitznagel B, Vazquez-Armendariz AI, Khalooghi K, Guenther S, Herold S, et al. Bronchioalveolar stem cells are a main source for regeneration of distal lung epithelia in vivo. *The EMBO journal*. 2019;38(12). Epub 2019/04/28.
18. Jones-Freeman B, Starkey MR. Bronchioalveolar stem cells in lung repair, regeneration and disease. *The Journal of pathology*. 2020;252(3):219-26. Epub 2020/08/02.
19. Soutiere SE, Tankersley CG, Mitzner W. Differences in alveolar size in inbred mouse strains. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2004;140(3):283-91. Epub 2004/06/10.
20. Cope LA, Henry RW, Reed RB, Jr. Microscopic anatomy of the lower respiratory tract of the grey short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Anatomia, histologia, embryologia*. 2012;41(2):96-105. Epub 2011/09/17.
21. Knudsen L, Ochs M. The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components. *Histochemistry and cell biology*. 2018;150(6):661-76. Epub 2018/11/06.
22. Thorley AJ, Grandolfo D, Lim E, Goldstraw P, Young A, Tetley TD. Innate immune responses to bacterial ligands in the peripheral human lung--role of alveolar epithelial TLR expression and signalling. *PloS one*. 2011;6(7):e21827. Epub 2011/07/27.
23. Pouwels SD, Burgess JK, Verschuuren E, Slebos DJ. The cellular composition of the lung lining fluid gradually changes from bronchus to alveolus. *Respiratory research*. 2021;22(1):285. Epub 2021/11/06.
24. Moliva JI, Rajaram MV, Sidiki S, Sasindran SJ, Guirado E, Pan XJ, et al. Molecular composition of the alveolar lining fluid in the aging lung. *Age (Dordr)*. 2014;36(3):9633. Epub 2014/03/04.
25. Castranova V, Rabovsky J, Tucker JH, Miles PR. The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte. *Toxicology and applied pharmacology*. 1988;93(3):472-83. Epub 1988/05/01.
26. Canadas O, Olmeda B, Alonso A, Perez-Gil J. Lipid-Protein and Protein-Protein Interactions in the Pulmonary Surfactant System and Their Role in Lung Homeostasis. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(10). Epub 2020/05/30.
27. Riley L, Wang T, Ataya A. Pulmonary alveolar proteinosis (PAP). *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2019;200(8):P16-P7.
28. Mason RJ. Biology of alveolar type II cells. *Respirology*. 2006;11 Suppl:S12-5. Epub 2006/01/21.
29. Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, Shrive AK, Ghai R, Kamran MF, et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Molecular immunology*. 2006;43(9):1293-315. Epub 2005/10/11.
30. Sato K, Tomioka H, Shimizu T, Gonda T, Ota F, Sano C. Type II alveolar cells play roles in macrophage-mediated host innate resistance to pulmonary mycobacterial infections by producing proinflammatory cytokines. *The Journal of infectious diseases*. 2002;185(8):1139-47. Epub 2002/04/04.

31. Aspal M, Zemans RL. Mechanisms of ATII-to-ATI Cell Differentiation during Lung Regeneration. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(9). Epub 2020/05/06.
32. Guillot L, Nathan N, Tabary O, Thouvenin G, Le Rouzic P, Corvol H, et al. Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013;45(11):2568-73. Epub 2013/08/31.
33. Schupp JC, Adams TS, Cosme C, Jr., Raredon MSB, Yuan Y, Omote N, et al. Integrated Single-Cell Atlas of Endothelial Cells of the Human Lung. *Circulation*. 2021;144(4):286-302. Epub 2021/05/26.
34. Hsia CC, Hyde DM, Weibel ER. Lung Structure and the Intrinsic Challenges of Gas Exchange. *Comprehensive Physiology*. 2016;6(2):827-95. Epub 2016/04/12.
35. Probst CK, Montesi SB, Medoff BD, Shea BS, Knipe RS. Vascular permeability in the fibrotic lung. *The European respiratory journal*. 2020;56(1). Epub 2020/04/09.
36. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2002;34(12):1508-12. Epub 2002/10/16.
37. Watt SM, Gschmeissner SE, Bates PA. PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leukemia & lymphoma*. 1995;17(3-4):229-44. Epub 1995/04/01.
38. Barron L, Gharib SA, Duffield JS. Lung Pericytes and Resident Fibroblasts: Busy Multitaskers. *The American journal of pathology*. 2016;186(10):2519-31. Epub 2016/08/25.
39. Habel DM, Hogaboam CM. Heterogeneity of Fibroblasts and Myofibroblasts in Pulmonary Fibrosis. *Current pathobiology reports*. 2017;5(2):101-10. Epub 2017/10/31.
40. Xie T, Wang Y, Deng N, Huang G, Taghavifar F, Geng Y, et al. Single-Cell Deconvolution of Fibroblast Heterogeneity in Mouse Pulmonary Fibrosis. *Cell reports*. 2018;22(13):3625-40. Epub 2018/03/29.
41. Ahlbrecht K, McGowan SE. In search of the elusive lipofibroblast in human lungs. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2014;307(8):L605-8. Epub 2014/09/07.
42. Mei Q, Liu Z, Zuo H, Yang Z, Qu J. Idiopathic pulmonary fibrosis: an update on pathogenesis. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;12:4138.
43. Judge JL, Owens KM, Pollock SJ, Woeller CF, Thatcher TH, Williams JP, et al. Ionizing radiation induces myofibroblast differentiation via lactate dehydrogenase. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2015;309(8):L879-87. Epub 2015/08/09.
44. van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1968;128(3):415-35. Epub 1968/09/01.
45. Takahashi K, Yamamura F, Naito M. Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *Journal of leukocyte biology*. 1989;45(2):87-96. Epub 1989/02/01.
46. Higashi K, Naito M, Takeya M, Ando M, Araki S, Takahashi K. Ontogenetic development, differentiation, and phenotypic expression of macrophages in fetal rat lungs. *Journal of leukocyte biology*. 1992;51(5):444-54. Epub 1992/05/01.

47. Sebring RJ, Lehnert BE. Morphometric comparisons of rat alveolar macrophages, pulmonary interstitial macrophages, and blood monocytes. *Experimental lung research*. 1992;18(4):479-96. Epub 1992/07/01.
48. Cai Y, Sugimoto C, Arainga M, Alvarez X, Didier ES, Kuroda MJ. In vivo characterization of alveolar and interstitial lung macrophages in rhesus macaques: implications for understanding lung disease in humans. *J Immunol*. 2014;192(6):2821-9. Epub 2014/02/19.
49. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013;38(4):792-804. Epub 2013/04/23.
50. Guilliams M, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, De Prijck S, et al. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *The Journal of experimental medicine*. 2013;210(10):1977-92. Epub 2013/09/18.
51. Tan SY, Krasnow MA. Developmental origin of lung macrophage diversity. *Development*. 2016;143(8):1318-27. Epub 2016/03/10.
52. Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*. 2016;44(3):439-49. Epub 2016/03/18.
53. Shibata Y, Berclaz P-Y, Chroneos ZC, Yoshida M, Whitsett JA, Trapnell BC. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU. 1. *Immunity*. 2001;15(4):557-67.
54. Neupane AS, Willson M, Chojnacki AK, Vargas ESCF, Morehouse C, Carestia A, et al. Patrolling Alveolar Macrophages Conceal Bacteria from the Immune System to Maintain Homeostasis. *Cell*. 2020;183(1):110-25 e11. Epub 2020/09/06.
55. Liang Z, Zhang Q, Thomas CM, Chana KK, Gibeon D, Barnes PJ, et al. Impaired macrophage phagocytosis of bacteria in severe asthma. *Respiratory research*. 2014;15(1):1-11.
56. Fitzpatrick AM, Teague WG, Burwell L, Brown MS, Brown LAS. Glutathione oxidation is associated with airway macrophage functional impairment in children with severe asthma. *Pediatric research*. 2011;69(2):154-9.
57. Ding N-H, Jian Li J, Sun L-Q. Molecular mechanisms and treatment of radiation-induced lung fibrosis. *Current drug targets*. 2013;14(11):1347-56.
58. Woods PS, Kimmig LM, Meliton AY, Sun KA, Tian Y, O'Leary EM, et al. Tissue-Resident Alveolar Macrophages Do Not Rely on Glycolysis for LPS-induced Inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2020;62(2):243-55. Epub 2019/08/31.
59. Remmerie A, Scott CL. Macrophages and lipid metabolism. *Cellular immunology*. 2018;330:27-42. Epub 2018/02/13.
60. Baker EH, Clark N, Brennan AL, Fisher DA, Gyi KM, Hodson ME, et al. Hyperglycemia and cystic fibrosis alter respiratory fluid glucose concentrations estimated by breath condensate analysis. *J Appl Physiol* (1985). 2007;102(5):1969-75. Epub 2007/02/17.
61. Salvaterra E, Campo I. Pulmonary alveolar proteinosis: from classification to therapy. *Breathe (Sheff)*. 2020;16(2):200018. Epub 2020/07/21.

62. Stanley E, Lieschke GJ, Grail D, Metcalf D, Hodgson G, Gall J, et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(12):5592-6.
63. Schneider C, Nobs SP, Kurrer M, Rehrauer H, Thiele C, Kopf M. Induction of the nuclear receptor PPAR- γ by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages. *Nature immunology*. 2014;15(11):1026-37.
64. Baker AD, Malur A, Barna BP, Ghosh S, Kavuru MS, Malur AG, et al. Targeted PPAR γ deficiency in alveolar macrophages disrupts surfactant catabolism. *Journal of lipid research*. 2010;51(6):1325-31.
65. McCarthy C, Lee E, Bridges JP, Sallese A, Suzuki T, Woods JC, et al. Statin as a novel pharmacotherapy of pulmonary alveolar proteinosis. *Nature communications*. 2018;9(1):3127. Epub 2018/08/09.
66. Blagov AV, Markin AM, Bogatyreva AI, Tolstik TV, Sukhorukov VN, Orekhov AN. The Role of Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Cells*. 2023;12(4). Epub 2023/02/26.
67. Fessler MB. A New Frontier in Immunometabolism. Cholesterol in Lung Health and Disease. *Annals of the American Thoracic Society*. 2017;14(Supplement_5):S399-S405. Epub 2017/11/22.
68. Gibbings SL, Thomas SM, Atif SM, McCubbrey AL, Desch AN, Danhorn T, et al. Three Unique Interstitial Macrophages in the Murine Lung at Steady State. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2017;57(1):66-76. Epub 2017/03/04.
69. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Mutlu GM, Budinger GR, Perlman H. Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2013;49(4):503-10. Epub 2013/05/16.
70. Schyns J, Bureau F, Marichal T. Lung Interstitial Macrophages: Past, Present, and Future. *Journal of immunology research*. 2018;2018:5160794. Epub 2018/06/02.
71. Sabatel C, Radermecker C, Fievez L, Paulissen G, Chakarov S, Fernandes C, et al. Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages. *Immunity*. 2017;46(3):457-73. Epub 2017/03/23.
72. Landsman L, Jung S. Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol*. 2007;179(6):3488-94. Epub 2007/09/06.
73. Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol*. 2012;13(11):1118-28. Epub 2012/10/02.
74. Chakarov S, Lim HY, Tan L, Lim SY, See P, Lum J, et al. Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches. *Science*. 2019;363(6432). Epub 2019/03/16.
75. Dick SA, Wong A, Hamidzada H, Nejat S, Nechanitzky R, Vohra S, et al. Three tissue resident macrophage subsets coexist across organs with conserved origins and life cycles. *Science immunology*. 2022;7(67):eabf7777. Epub 2022/01/08.

76. Meziani L, Mondini M, Petit B, Boissonnas A, Thomas de Montpreville V, Mercier O, et al. CSF1R inhibition prevents radiation pulmonary fibrosis by depletion of interstitial macrophages. *The European respiratory journal*. 2018;51(3). Epub 2018/03/03.
77. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(11):762-74. Epub 2011/10/11.
78. Palframan RT, Jung S, Cheng G, Weninger W, Luo Y, Dorf M, et al. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(9):1361-73. Epub 2001/11/07.
79. Jia T, Serbina NV, Brandl K, Zhong MX, Leiner IM, Charo IF, et al. Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*. 2008;180(10):6846-53. Epub 2008/05/06.
80. van de Laar L, Saelens W, De Prijck S, Martens L, Scott CL, Van Isterdael G, et al. Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. *Immunity*. 2016;44(4):755-68. Epub 2016/03/20.
81. Mackaness G. Cellular resistance to infection. *The Journal of experimental medicine*. 1962;116(3):381-406.
82. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *The Journal of experimental medicine*. 1983;158(3):670-89.
83. Celada A, Gray PW, Rinderknecht E, Schreiber RD. Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. *The Journal of experimental medicine*. 1984;160(1):55-74.
84. Doyle AG, Herbein G, Montaner LJ, Minty AJ, Caput D, Ferrara P, et al. Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: Comparison with interleukin-4 and interferon- γ . *European journal of immunology*. 1994;24(6):1441-5.
85. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000;164(12):6166-73. Epub 2000/06/08.
86. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012;122(3):787-95.
87. Eapen MS, Hansbro PM, McAlinden K, Kim RY, Ward C, Hackett TL, et al. Abnormal M1/M2 macrophage phenotype profiles in the small airway wall and lumen in smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Scientific reports*. 2017;7(1):13392. Epub 2017/10/19.
88. Wu MF, Lin CA, Yuan TH, Yeh HY, Su SF, Guo CL, et al. The M1/M2 spectrum and plasticity of malignant pleural effusion-macrophage in advanced lung cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2021;70(5):1435-50. Epub 2020/11/12.
89. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*. 2004;25(12):677-86.
90. Weigel E, Smith C, Liu P, Robison R, O'Neill K. Macrophage polarization and its role in cancer. *J Clin Cell Immunol*. 2015;6(4):338.

91. Ni S, Yuan Y, Kuang Y, Li X. Iron Metabolism and Immune Regulation. *Front Immunol.* 2022;13:816282. Epub 2022/04/12.
92. PANIZO A, DE E, PARDO F. HISTOLOGICAL CHANGES IN THE LUNG AFTER SUCCESSFUL TREATMENT OF PRIMARY LUNG CARCINOMAS. *ARQ PATOL.* 1993;25:17-22.
93. Lavigne J, Suissa A, Verger N, Dos Santos M, Benadjaoud M, Mille-Hamard L, 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(2):279-90. Epub 2019/02/01.
94. Odegaard JI, Chawla A. Alternative macrophage activation and metabolism. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* 2011;6:275-97.
95. Biswas SK, Chittechath M, Shalova IN, Lim JY. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunologic research.* 2012;53(1-3):11-24. Epub 2012/03/16.
96. Shaughnessy LM, Swanson JA. The role of the activated macrophage in clearing *Listeria monocytogenes* infection. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library.* 2007;12:2683.
97. Melgert BN, ten Hacken NH, Rutgers B, Timens W, Postma DS, Hylkema MN. More alternative activation of macrophages in lungs of asthmatic patients. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2011;127(3):831-3. Epub 2010/12/21.
98. Quatromoni JG, Eruslanov E. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *American journal of translational research.* 2012;4(4):376.
99. Almatroodi SA, McDonald CF, Pouniotis DS. Alveolar Macrophage Polarisation in Lung Cancer. *Lung cancer international.* 2014;2014:721087. Epub 2014/01/01.
100. Gunassekaran GR, Poongkavithai Vadevoo SM, Baek MC, Lee B. M1 macrophage exosomes engineered to foster M1 polarization and target the IL-4 receptor inhibit tumor growth by reprogramming tumor-associated macrophages into M1-like macrophages. *Biomaterials.* 2021;278:121137. Epub 2021/09/25.
101. Society ER. The burden of lung disease. *The ERS European Lung White Book 2013.*
102. Ostridge K, Wilkinson TM. Present and future utility of computed tomography scanning in the assessment and management of COPD. *European Respiratory Journal.* 2016;48(1):216-28.
103. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2016;138(1):16-27.
104. Singh S, Verma S, Kumar S, Ahmad M, Nischal A, Singh S, et al. Evaluation of oxidative stress and antioxidant status in chronic obstructive pulmonary disease. *Scandinavian Journal of Immunology.* 2017;85(2):130-7.
105. Szilasi M, Dolinay T, Nemes Z, Strausz J. Pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Pathology & Oncology Research.* 2006;12:52-60.
106. Berg K, Wright JL. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease: progress in the 20th and 21st centuries. *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2016;140(12):1423-8.

107. Wang Y, Xu J, Meng Y, Adcock IM, Yao X. Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2018;3341-8.
108. Hirota N, Martin JG. Mechanisms of airway remodeling. *Chest*. 2013;144(3):1026-32.
109. Bhat TA, Panzica L, Kalathil SG, Thanavala Y. Immune dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Annals of the American Thoracic Society*. 2015;12(Supplement 2):S169-S75.
110. Arora S, Dev K, Agarwal B, Das P, Syed MA. Macrophages: their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology*. 2018;223(4-5):383-96.
111. He S, Xie L, Lu J, Sun S. Characteristics and potential role of M2 macrophages in COPD. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2017:3029-39.
112. Eapen MS, Hansbro PM, McAlinden K, Kim RY, Ward C, Hackett T-L, et al. Abnormal M1/M2 macrophage phenotype profiles in the small airway wall and lumen in smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Scientific reports*. 2017;7(1):1-12.
113. Bazzan E, Turato G, Tinè M, Radu CM, Balestro E, Rigobello C, et al. Dual polarization of human alveolar macrophages progressively increases with smoking and COPD severity. *Respiratory research*. 2017;18(1):1-8.
114. Chana KK, Fenwick PS, Nicholson AG, Barnes PJ, Donnelly LE. Identification of a distinct glucocorticosteroid-insensitive pulmonary macrophage phenotype in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2014;133(1):207-16. e11.
115. Hodge S, Hodge G, Ahern J, Jersmann H, Holmes M, Reynolds PN. Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability: implications in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2007;37(6):748-55.
116. Berenson CS, Kruzel RL, Eberhardt E, Sethi S. Phagocytic dysfunction of human alveolar macrophages and severity of chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of infectious diseases*. 2013;208(12):2036-45.
117. Taylor A, Finney-Hayward T, Quint J, Thomas C, Tudhope S, Wedzicha J, et al. Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *European Respiratory Journal*. 2010;35(5):1039-47.
118. Traves S, Culpitt S, Russell R, Barnes P, Donnelly L. Increased levels of the chemokines GRO α and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. *Thorax*. 2002;57(7):590-5.
119. Mukaro VR, Bylund J, Hodge G, Holmes M, Jersmann H, Reynolds PN, et al. Lectins offer new perspectives in the development of macrophage-targeted therapies for COPD/emphysema. *PLoS one*. 2013;8(2):e56147.
120. Wu J, Zhao X, Xiao C, Xiong G, Ye X, Li L, et al. The role of lung macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Medicine*. 2022:107035.
121. Huang H-Q, Li N, Li D-Y, Jing D, Liu Z-Y, Xu X-C, et al. Autophagy promotes cigarette smoke-initiated and elastin-driven bronchitis-like airway inflammation in mice. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:594330.

122. Bewley MA, Preston JA, Mohasin M, Marriott HM, Budd RC, Swales J, et al. Impaired mitochondrial microbicidal responses in chronic obstructive pulmonary disease macrophages. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2017;196(7):845-55.
123. Philippot Q, Deslee G, Adair-Kirk TL, Woods JC, Byers D, Conradi S, et al. Increased iron sequestration in alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS one*. 2014;9(5):e96285.
124. O'Beirne SL, Kikkers SA, Oromendia C, Salit J, Rostmai MR, Ballman KV, et al. Alveolar macrophage immunometabolism and lung function impairment in smoking and chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2020;201(6):735-9.
125. Mendy A, Forno E, Niyonsenga T, Gasana J. Blood biomarkers as predictors of long-term mortality in COPD. *The clinical respiratory journal*. 2018;12(5):1891-9.
126. Singh D, Edwards L, Tal-Singer R, Rennard S. Sputum neutrophils as a biomarker in COPD: findings from the ECLIPSE study. *Respiratory research*. 2010;11:1-12.
127. Erjefalt JS. Mast cells in human airways: the culprit? *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*. 2014;23(133):299-307. Epub 2014/09/02.
128. Cruse G, Bradding P. Mast cells in airway diseases and interstitial lung disease. *European journal of pharmacology*. 2016;778:125-38.
129. Ballarin A, Bazzan E, Zenteno RH, Turato G, Baraldo S, Zanovello D, et al. Mast cell infiltration discriminates between histopathological phenotypes of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2012;186(3):233-9. Epub 2012/06/09.
130. Roos AB, Mori M, Gura HK, Lorentz A, Bjermer L, Hoffmann HJ, et al. Increased IL-17RA and IL-17RC in end-stage COPD and the contribution to mast cell secretion of FGF-2 and VEGF. *Respiratory research*. 2017;18(1):1-4.
131. Tan H-L, Rosenthal M. IL-17 in lung disease: friend or foe? *Thorax*. 2013;68(8):788-90.
132. Shaykhiev R, Crystal RG. Innate immunity and chronic obstructive pulmonary disease: a mini-review. *Gerontology*. 2013;59(6):481-9.
133. Mikko M, Forsslund H, Cui L, Grunewald J, Wheelock Å, Wahlström J, et al. Increased intraepithelial (CD103+) CD8+ T cells in the airways of smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Immunobiology*. 2013;218(2):225-31.
134. Gadgil A, Duncan SR. Role of T-lymphocytes and pro-inflammatory mediators in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2008;3(4):531-41.
135. Barczyk A, Pierzchala W, Kon OM, Cosio B, Adcock IM, Barnes PJ. Cytokine production by bronchoalveolar lavage T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;117(6):1484-92. Epub 2006/06/06.
136. Araya J, Cambier S, Markovics JA, Wolters P, Jablons D, Hill A, et al. Squamous metaplasia amplifies pathologic epithelial-mesenchymal interactions in COPD patients. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(11):3551-62.

137. Vaes AW, De Boever P, Franssen FM, Uszko-Lencer NH, Vanfleteren LE, Spruit MA. Endothelial function in patients with COPD: An updated systematic review of studies using flow-mediated dilatation. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2023(just-accepted).
138. Polverino F, Celli BR, Owen CA. COPD as an endothelial disorder: endothelial injury linking lesions in the lungs and other organs?(2017 Grover Conference Series). *Pulmonary Circulation*. 2018;8(1):2045894018758528.
139. Borgas D, Chambers E, Newton J, Ko J, Rivera S, Rounds S, et al. Cigarette Smoke Disrupted Lung Endothelial Barrier Integrity and Increased Susceptibility to Acute Lung Injury via Histone Deacetylase 6. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2016;54(5):683-96. Epub 2015/10/10.
140. Yan F, Gao H, Zhao H, Bhatia M, Zeng Y. Roles of airway smooth muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of translational medicine*. 2018;16(1):262. Epub 2018/09/28.
141. Gea J, Casadevall C, Pascual S, Orozco-Levi M, Barreiro E. Respiratory diseases and muscle dysfunction. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2012;6(1):75-90.
142. Hopkinson NS, Tennant RC, Dayer MJ, Swallow EB, Hansel TT, Moxham J, et al. A prospective study of decline in fat free mass and skeletal muscle strength in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory research*. 2007;8(1):25. Epub 2007/03/16.
143. Baratella E, Ruaro B, Giudici F, Wade B, Santagiuliana M, Salton F, et al. Evaluation of correlations between genetic variants and high-resolution computed tomography patterns in idiopathic pulmonary fibrosis. *Diagnostics*. 2021;11(5):762.
144. Michalski JE, Schwartz DA. Genetic risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis: insights into immunopathogenesis. *Journal of Inflammation Research*. 2021:1305-18.
145. Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, McElwee MM, Evans SE, Boerner RM, et al. Muc5b is required for airway defence. *Nature*. 2014;505(7483):412-6. Epub 2013/12/10.
146. Hancock LA, Hennessy CE, Solomon GM, Dobrinskikh E, Estrella A, Hara N, et al. Muc5b overexpression causes mucociliary dysfunction and enhances lung fibrosis in mice. *Nature communications*. 2018;9(1):5363. Epub 2018/12/19.
147. Phan THG, Paliogiannis P, Nasrallah GK, Giordo R, Eid AH, Fois AG, et al. Emerging cellular and molecular determinants of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2021;78(5):2031-57. Epub 2020/11/18.
148. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity*. 2016;44(3):450-62.
149. Zhang L, Wang Y, Wu G, Xiong W, Gu W, Wang CY. Macrophages: friend or foe in idiopathic pulmonary fibrosis? *Respiratory research*. 2018;19(1):170. Epub 2018/09/08.
150. Prasse A, Pechkovsky DV, Toews GB, Jungraithmayr W, Kollert F, Goldmann T, et al. A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;173(7):781-92.
151. Sun L, Louie MC, Vannella KM, Wilke CA, LeVine AM, Moore BB, et al. New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2011;300(3):L341-L53.

152. Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJ, John S, Taams LS. CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2007;104(49):19446-51.
153. Morrison TJ, Jackson MV, Cunningham EK, Kissenpfennig A, McAuley DF, O’Kane CM, et al. Mesenchymal stromal cells modulate macrophages in clinically relevant lung injury models by extracellular vesicle mitochondrial transfer. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2017;196(10):1275-86.
154. Grabarz F, Aguiar CF, Correa-Costa M, Braga TT, Hyane MI, Andrade-Oliveira V, et al. Protective role of NKT cells and macrophage M2-driven phenotype in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Inflammopharmacology*. 2018;26:491-504.
155. Karmouty-Quintana H, Philip K, Acero LF, Chen N-Y, Weng T, Molina JG, et al. Deletion of ADORA2B from myeloid cells dampens lung fibrosis and pulmonary hypertension. *The FASEB Journal*. 2015;29(1):50.
156. Philip K, Mills TW, Davies J, Chen N-Y, Karmouty-Quintana H, Luo F, et al. HIF1A up-regulates the ADORA2B receptor on alternatively activated macrophages and contributes to pulmonary fibrosis. *The FASEB Journal*. 2017;31(11):4745.
157. Ayaub E, Poli S, Ng J, Adams T, Schupp J, Quesada-Arias L, et al. Single cell RNA-seq and mass cytometry reveals a novel and a targetable population of macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. *BioRxiv*. 2021:2021.01. 04.425268.
158. Morse C, Tabib T, Sembrat J, Buschur KL, Bittar HT, Valenzi E, et al. Proliferating SPP1/MERTK-expressing macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. *The European respiratory journal*. 2019;54(2). Epub 2019/06/22.
159. Gu L, Casey JLL, Andrabi SA, Lee JH, Meza-Perez S, Randall TD, et al. Mitochondrial calcium uniporter regulates PGC-1 α expression to mediate metabolic reprogramming in pulmonary fibrosis. *Redox biology*. 2019;26:101307.
160. Xie N, Cui H, Ge J, Banerjee S, Guo S, Dubey S, et al. Metabolic characterization and RNA profiling reveal glycolytic dependence of profibrotic phenotype of alveolar macrophages in lung fibrosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2017;313(5):L834-L44.
161. El-Chemaly S, Malide D, Yao J, Nathan SD, Rosas IO, Gahl WA, et al. Glucose transporter-1 distribution in fibrotic lung disease: association with [18F]-2-fluoro-2-deoxyglucose-PET scan uptake, inflammation, and neovascularization. *Chest*. 2013;143(6):1685-91.
162. Ogger PP, Albers GJ, Hewitt RJ, O’Sullivan BJ, Powell JE, Calamita E, et al. Itaconate controls the severity of pulmonary fibrosis. *Science immunology*. 2020;5(52):eabc1884.
163. Selman M, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respiratory research*. 2002;3(1):3. Epub 2002/01/25.
164. Katzenstein AL, Fiorelli RF. Nonspecific interstitial pneumonia/fibrosis. Histologic features and clinical significance. *The American journal of surgical pathology*. 1994;18(2):136-47.
165. Hewlett JC, Kropski JA, Blackwell TS. Idiopathic pulmonary fibrosis: Epithelial-mesenchymal interactions and emerging therapeutic targets. *Matrix biology*. 2018;71:112-27.
166. (INCa) Indc. Panorama des cancers en France. 2022.

167. Bockel S, Antoni D, Deutsch E, Mornex F. [Immunotherapy and radiotherapy]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique*. 2017;21(3):244-55. Epub 2017/05/20. Immunotherapie et radiotherapie.
168. Sedighzadeh SS, Khoshbin AP, Razi S, Keshavarz-Fathi M, Rezaei N. A narrative review of tumor-associated macrophages in lung cancer: regulation of macrophage polarization and therapeutic implications. *Translational Lung Cancer Research*. 2021;10(4):1889.
169. Franklin RA, Liao W, Sarkar A, Kim MV, Bivona MR, Liu K, et al. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science*. 2014;344(6186):921-5.
170. Wang Z, Zhao Y, Xu H, Liang F, Zou Q, Wang C, et al. CtBP1 promotes tumour-associated macrophage infiltration and progression in non-small-cell lung cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2020;24(19):11445-56. Epub 2020/09/11.
171. Cortez-Retamozo V, Etzrodt M, Newton A, Rauch PJ, Chudnovskiy A, Berger C, et al. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(7):2491-6. Epub 2012/02/07.
172. Zhu Y, Herndon JM, Sojka DK, Kim K-W, Knolhoff BL, Zuo C, et al. Tissue-resident macrophages in pancreatic ductal adenocarcinoma originate from embryonic hematopoiesis and promote tumor progression. *Immunity*. 2017;47(2):323-38. e6.
173. Bowman RL, Klemm F, Akkari L, Pyonteck SM, Sevenich L, Quail DF, et al. Macrophage ontogeny underlies differences in tumor-specific education in brain malignancies. *Cell reports*. 2016;17(9):2445-59.
174. Loyher P-L, Hamon P, Laviron M, Meghraoui-Kheddar A, Goncalves E, Deng Z, et al. Macrophages of distinct origins contribute to tumor development in the lung. *Journal of Experimental Medicine*. 2018;215(10):2536-53.
175. Xu F, Wei Y, Tang Z, Liu B, Dong J. Tumor-associated macrophages in lung cancer: Friend or foe? *Molecular Medicine Reports*. 2020;22(5):4107-15.
176. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*. 2006;42(6):717-27. Epub 2006/03/08.
177. Zhang S, Che D, Yang F, Chi C, Meng H, Shen J, et al. Tumor-associated macrophages promote tumor metastasis via the TGF- β /SOX9 axis in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2017;8(59):99801.
178. Cao L, Che X, Qiu X, Li Z, Yang B, Wang S, et al. M2 macrophage infiltration into tumor islets leads to poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *Cancer management and research*. 2019;11:6125.
179. Ma J, Liu L, Che G, Yu N, Dai F, You Z. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC cancer*. 2010;10(1):1-9.
180. Ohri CM, Shikotra A, Green RH, Waller DA, Bradding P. Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *The European respiratory journal*. 2009;33(1):118-26. Epub 2009/01/02.
181. Penny HL, Sieow JL, Adriani G, Yeap WH, See Chi Ee P, San Luis B, et al. Warburg metabolism in tumor-conditioned macrophages promotes metastasis in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncoimmunology*. 2016;5(8):e1191731. Epub 2016/09/14.

182. Hoppstadter J, Dembek A, Horing M, Schymik HS, Dahlem C, Sultan A, et al. Dysregulation of cholesterol homeostasis in human lung cancer tissue and tumour-associated macrophages. *EBioMedicine*. 2021;72:103578. Epub 2021/09/28.
183. Eruslanov EB, Bhojnagarwala PS, Quatromoni JG, Stephen TL, Ranganathan A, Deshpande C, et al. Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(12):5466-80.
184. Stankovic B, Bjørhovde HAK, Skarshaug R, Aamodt H, Frafjord A, Müller E, et al. Immune cell composition in human non-small cell lung cancer. *Frontiers in Immunology*. 2019;9:3101.
185. Tao H, Mimura Y, Aoe K, Kobayashi S, Yamamoto H, Matsuda E, et al. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung cancer*. 2012;75(1):95-101.
186. Al-Shibli KI, Donnem T, Al-Saad S, Persson M, Bremnes RM, Busund L-T. Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research*. 2008;14(16):5220-7.
187. Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, Hutter G, George BM, McCracken MN, et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature*. 2017;545(7655):495-9. Epub 2017/05/18.
188. Chen X, Gao A, Zhang F, Yang Z, Wang S, Fang Y, et al. ILT4 inhibition prevents TAM- and dysfunctional T cell-mediated immunosuppression and enhances the efficacy of anti-PD-L1 therapy in NSCLC with EGFR activation. *Theranostics*. 2021;11(7):3392-416. Epub 2021/02/05.
189. Solberg TD, Siddon, R.L., Kavanagh, B. *Stereotactic Body Radiation Therapy*: Springer, Berlin, Heidelberg; 2012.
190. Cosset JM. [Side effects of ionizing radiation on healthy tissues and organs at risk]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique*. 2010;14(4-5):228-31. Epub 2010/07/06. Effets secondaires des rayonnements sur les tissus sains et organes a risque.
191. Aspal M, Zemans RL. Mechanisms of ATII-to-ATI cell differentiation during lung regeneration. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(9):3188.
192. Rokicki W, Rokicki M, Wojtacha J, Dželjijli A. The role and importance of club cells (Clara cells) in the pathogenesis of some respiratory diseases. *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska/Polish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2016;13(1):26-30.
193. Blais E, Pichon B, Mampuya A, Antoine M, Lagarde P, Kantor G, et al. [Lung dose constraints for normo-fractionated radiotherapy and for stereotactic body radiation therapy]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique*. 2017;21(6-7):584-96. Epub 2017/09/10. Doses aux organes a risque en radiotherapie conformationnelle et en radiotherapie stereotaxique : les poumons.
194. Kellerer AM, and Rossi, H D. The theory of dual radiation action. *CurrTopRadiationRes*. 1972:85-158.
195. Chadwick KH, Leenhouts HP. A molecular theory of cell survival. *Physics in medicine and biology*. 1973;18(1):78-87. Epub 1973/01/01.

196. Cosset JM, Mornex F, Eschwege F. [Hypofractionation and radiotherapy: "the eternal return"]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique*. 2013;17(5-6):355-62. Epub 2013/08/24. Hypofractionnement en radiotherapie : l'eternel retour.
197. Michael C. Joiner AvdK. *Basic Clinical Radiobiology*. 4th Edition ed. London2009.
198. Fowler JF, Ritter MA, Chappell RJ, Brenner DJ. What hypofractionated protocols should be tested for prostate cancer? *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2003;56(4):1093-104. Epub 2003/06/28.
199. van Leeuwen CM, Oei AL, Crezee J, Bel A, Franken NAP, Stalpers LJA, et al. The alfa and beta of tumours: a review of parameters of the linear-quadratic model, derived from clinical radiotherapy studies. *Radiat Oncol*. 2018;13(1):96. Epub 2018/05/18.
200. Klement RJ, Sonke JJ, Allgauer M, Andratschke N, Appold S, Belderbos J, et al. Estimation of the alpha/beta ratio of non-small cell lung cancer treated with stereotactic body radiotherapy. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2020;142:210-6. Epub 2019/08/23.
201. Joiner MC, Lambin P, Malaise EP, Robson T, Arrand JE, Skov KA, et al. Hypersensitivity to very-low single radiation doses: its relationship to the adaptive response and induced radioresistance. *Mutation research*. 1996;358(2):171-83. Epub 1996/11/04.
202. Kirkpatrick JP, Meyer JJ, Marks LB. The linear-quadratic model is inappropriate to model high dose per fraction effects in radiosurgery. *Seminars in radiation oncology*. 2008;18(4):240-3. Epub 2008/08/30.
203. Kirkpatrick JP, Brenner DJ, Orton CG. Point/Counterpoint. The linear-quadratic model is inappropriate to model high dose per fraction effects in radiosurgery. *Medical physics*. 2009;36(8):3381-4. Epub 2009/09/15.
204. Wang JZ, Huang Z, Lo SS, Yuh WT, Mayr NA. A generalized linear-quadratic model for radiosurgery, stereotactic body radiation therapy, and high-dose rate brachytherapy. *Science translational medicine*. 2010;2(39):39ra48. Epub 2010/07/09.
205. Liu F, Tai A, Lee P, Biswas T, Ding GX, El Naqa I, et al. Tumor control probability modeling for stereotactic body radiation therapy of early-stage lung cancer using multiple bio-physical models. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2017;122(2):286-94. Epub 2016/11/23.
206. Guerrero M, Li XA. Extending the linear-quadratic model for large fraction doses pertinent to stereotactic radiotherapy. *Physics in medicine and biology*. 2004;49(20):4825-35. Epub 2004/11/30.
207. Park C, Papiez L, Zhang S, Story M, Timmerman RD. Universal survival curve and single fraction equivalent dose: useful tools in understanding potency of ablative radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2008;70(3):847-52. Epub 2008/02/12.
208. Astrahan M. Some implications of linear-quadratic-linear radiation dose-response with regard to hypofractionation. *Medical physics*. 2008;35(9):4161-72. Epub 2008/10/10.
209. Lefebvre L, Dore M, Giraud P. [New techniques and potential benefits for radiotherapy of lung cancer]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique*. 2014;18(5-

6):473-9. Epub 2014/09/13. Nouvelles techniques et benefices attendus pour la radiotherapie du cancer du poumon.

210. De Ruysscher D, Faivre-Finn C, Moeller D, Nestle U, Hurkmans CW, Le Pechoux C, 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. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2017;124(1):1-10. Epub 2017/07/02.

211. Doyen J, Giraud P, Belkacemi Y. [Normal tissue tolerance to external beam radiation therapy: cardiac structures]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique*. 2010;14(4-5):319-26. Epub 2010/06/16. Dose de tolerance des tissus sains : le coeur.

212. De Rose F, Franceschini D, Reggiori G, Stravato A, Navarra P, Ascolese AM, et al. Organs at risk in lung SBRT. *Phys Med*. 2017;44:131-8. Epub 2017/04/24.

213. Chang JY, Bezjak A, Mornex F. Stereotactic ablative radiotherapy for centrally located early stage non-small-cell lung cancer: what we have learned. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2015;10(4):577-85. Epub 2014/12/17.

214. Timmerman R, McGarry R, Yiannoutsos C, Papiez L, Tudor K, DeLuca J, 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(30):4833-9. Epub 2006/10/20.

215. Kaiss H, Mornex F. [Stereotactic radiotherapy of stage I non-small cell lung cancer. State of the art in 2019 and recommendations: Stereotaxy as an alternative to surgery?]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique*. 2019;23(6-7):720-31. Epub 2019/09/01. Radiotherapie stereotaxique du cancer bronchique non a petites cellules de stade I. Etat de l'art en 2019 et recommandations : la stereotaxie comme alternative a la chirurgie ?

216. Koto M, Takai Y, Ogawa Y, Matsushita H, Takeda K, Takahashi C, et al. A phase II study on stereotactic body radiotherapy for stage I non-small cell lung cancer. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2007;85(3):429-34. Epub 2007/11/21.

217. Menoux I, Le Fevre C, Noel G, Antoni D. [Radiation-induced lung toxicity predictors after stereotactic radiation therapy for non-small cell lung carcinoma stage I]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique*. 2018;22(8):826-38. Epub 2018/10/20. Facteurs predictifs de toxicite pulmonaire apres irradiation en conditions stereotaxiques des carcinomes bronchopulmonaires non a petites cellules de stade I.

218. Wilke L, Andratschke N, Blanck O, Brunner TB, Combs SE, Grosu AL, et al. ICRU report 91 on prescribing, recording, and reporting of stereotactic treatments with small photon beams : Statement from the DEGRO/DGMP working group stereotactic radiotherapy and radiosurgery. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft [et al]*. 2019;195(3):193-8. Epub 2019/01/17. ICRU-Bericht 91 uber die Verschreibung, Aufzeichnung und Dokumentation von stereotaktischen Behandlungen mit kleinen Photonenfeldern : Stellungnahme der DEGRO/DGMP-Arbeitsgruppe Stereotaktische Strahlentherapie und Radiochirurgie.

219. Yang M, Timmerman R. Stereotactic Ablative Radiotherapy Uncertainties: Delineation, Setup and Motion. *Seminars in radiation oncology*. 2018;28(3):207-17. Epub 2018/06/24.

220. Guckenberger M, Andratschke N, Dieckmann K, Hoogeman MS, Hoyer M, Hurkmans C, et al. ESTRO ACROP consensus guideline on implementation and practice of stereotactic body radiotherapy for peripherally located early stage non-small cell lung cancer. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2017;124(1):11-7. Epub 2017/07/09.
221. Timmerman R, Paulus R, Galvin J, Michalski J, Straube W, Bradley J, et al. Stereotactic body radiation therapy for medically inoperable early-stage lung cancer patients: analysis of RTOG 0236. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009;75(3):S3.
222. Guckenberger M, Baier K, Polat B, Richter A, Krieger T, Wilbert J, et al. Dose-response relationship for radiation-induced pneumonitis after pulmonary stereotactic body radiotherapy. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2010;97(1):65-70. Epub 2010/07/08.
223. Barriger RB, Forquer JA, Brabham JG, Andolino DL, Shapiro RH, Henderson MA, et al. A dose-volume analysis of radiation pneumonitis in non-small cell lung cancer patients treated with stereotactic body radiation therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2012;82(1):457-62. Epub 2010/11/03.
224. Zhao J, Yorke ED, Li L, Kavanagh BD, Li XA, Das S, et al. Simple Factors Associated With Radiation-Induced Lung Toxicity After Stereotactic Body Radiation Therapy of the Thorax: A Pooled Analysis of 88 Studies. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2016;95(5):1357-66. Epub 2016/06/22.
225. Borst GR, Ishikawa M, Nijkamp J, Hauptmann M, Shirato H, Onimaru R, et al. Radiation pneumonitis in patients treated for malignant pulmonary lesions with hypofractionated radiation therapy. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2009;91(3):307-13. Epub 2009/03/27.
226. Fröhlich D. Untersuchungen zur Strahlenpneumopathie. I: Analytische klinischer und röntgendiagnostischer Befunde. *Radiobiologia, radiotherapia*. 1987;28(3):309-19.
227. Lagerwaard FJ, Haasbeek CJ, Smit EF, Slotman BJ, Senan S. Outcomes of risk-adapted fractionated stereotactic radiotherapy for stage I non-small-cell lung cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2008;70(3):685-92. Epub 2008/01/01.
228. Baumann P, Nyman J, Hoyer M, Wennberg B, Gagliardi G, Lax I, 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(20):3290-6. Epub 2009/05/06.
229. Linda A, Trovo M, Bradley JD. Radiation injury of the lung after stereotactic body radiation therapy (SBRT) for lung cancer: a timeline and pattern of CT changes. *European journal of radiology*. 2011;79(1):147-54. Epub 2009/12/04.
230. Benveniste MF, Welsh J, Godoy MC, Betancourt SL, Mawlawi OR, Munden RF. New era of radiotherapy: an update in radiation-induced lung disease. *Clinical radiology*. 2013;68(6):e275-90. Epub 2013/03/12.
231. Baker R, Han G, Sarangkasiri S, DeMarco M, Turke C, Stevens CW, et al. Clinical and dosimetric predictors of radiation pneumonitis in a large series of patients treated with stereotactic body radiation therapy to the lung. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2013;85(1):190-5. Epub 2012/08/30.

232. Maria O, Maria A, Ybarra N, Jeyaseelan K, Lee S, Perez J, et al. Investigation of Stem-Like Cells Role in Regional Radiosensitivity of the Lung. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2013;87(2):S638-S9.
233. Konkol M, Sniatala P, Milecki P. Radiation-induced lung injury - what do we know in the era of modern radiotherapy? *Reports of practical oncology and radiotherapy : journal of Great Poland Cancer Center in Poznan and Polish Society of Radiation Oncology*. 2022;27(3):552-65. Epub 2022/10/04.
234. Okubo M, Itonaga T, Saito T, Shiraishi S, Mikami R, Nakayama H, et al. Predicting risk factors for radiation pneumonitis after stereotactic body radiation therapy for primary or metastatic lung tumours. *The British journal of radiology*. 2017;90(1073):20160508. Epub 2017/02/15.
235. Xiong H, Liao Z, Liu Z, Xu T, Wang Q, Liu H, et al. ATM polymorphisms predict severe radiation pneumonitis in patients with non-small cell lung cancer treated with definitive radiation therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2013;85(4):1066-73. Epub 2012/11/17.
236. Foray N, Colin C, Bourguignon M. [Radiosensitivity: evidence of an individual factor]. *Medecine sciences : M/S*. 2013;29(4):397-403. Epub 2013/04/30. Radiosensibilite - L'evidence d'un facteur individuel.
237. Cosset JM, Chargari C, Crehange G. [Reirradiations: Which decision-making criteria?]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique*. 2019;23(6-7):526-30. Epub 2019/08/12. Reirradiations : quels criteres decisionnels ?
238. Yamashita H, Kobayashi-Shibata S, Terahara A, Okuma K, Haga A, Wakui R, 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. *Radiat Oncol*. 2010;5:32. Epub 2010/05/13.
239. Anscher MS, Kong FM, Marks LB, Bentel GC, Jirtle RL. Changes in plasma transforming growth factor beta during radiotherapy and the risk of symptomatic radiation-induced pneumonitis. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1997;37(2):253-8. Epub 1997/01/15.
240. Zhao L, Wang L, Ji W, Wang X, Zhu X, Hayman JA, et al. Elevation of plasma TGF-beta1 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*. 2009;74(5):1385-90. Epub 2009/02/24.
241. Groves AM, Williams JP, Hernady E, Reed C, Fenton B, Love T, et al. A Potential Biomarker for Predicting the Risk of Radiation-Induced Fibrosis in the Lung. *Radiation research*. 2018;190(5):513-25. Epub 2018/08/18.
242. Teng F, Li M, Yu J. Radiation recall pneumonitis induced by PD-1/PD-L1 blockades: mechanisms and therapeutic implications. *BMC medicine*. 2020;18(1):275. Epub 2020/09/19.
243. Jeter MD, Janne PA, Brooks S, Burstein HJ, Wen P, Fuchs CS, et al. Gemcitabine-induced radiation recall. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2002;53(2):394-400. Epub 2002/05/23.
244. Shibaki R, Akamatsu H, Fujimoto M, Koh Y, Yamamoto N. Nivolumab induced radiation recall pneumonitis after two years of radiotherapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017;28(6):1404-5. Epub 2017/04/07.

245. Vallard A, Rancoule C, Le Floch H, Guy JB, Espenel S, Le Pechoux C, et al. [Medical prevention and treatment of radiation-induced pulmonary complications]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique*. 2017;21(5):411-23. Epub 2017/06/10. Prevention medicale et traitement des complications pulmonaires secondaires a la radiotherapie.
246. Antonadou D, Throuvalas N, Petridis A, Bolanos N, Sagriotis A, Synodinou M. Effect of amifostine on toxicities associated with radiochemotherapy in patients with locally advanced non-small-cell lung cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2003;57(2):402-8. Epub 2003/09/06.
247. Westbury CB, Yarnold JR. Radiation fibrosis--current clinical and therapeutic perspectives. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2012;24(10):657-72. Epub 2012/05/23.
248. 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. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2004;58(1):213-9. Epub 2003/12/31.
249. Misirlioglu CH, 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*. 2007;24(3):308-11. Epub 2007/09/18.
250. Kharofa J, Cohen EP, Tomic R, Xiang Q, Gore E. Decreased risk of radiation pneumonitis with incidental concurrent use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and thoracic radiation therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2012;84(1):238-43. Epub 2012/02/04.
251. Ward WF, Kim YT, Molteni A, Solliday NH. Radiation-induced pulmonary endothelial dysfunction in rats: modification by an inhibitor of angiotensin converting enzyme. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1988;15(1):135-40. Epub 1988/07/01.
252. Groves AM, Johnston CJ, Williams JP, Finkelstein JN. Role of Infiltrating Monocytes in the Development of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis. *Radiation research*. 2018;189(3):300-11. Epub 2018/01/16.
253. Withers HR. The four R's of radiotherapy. *Advances in radiation biology*: Elsevier; 1975. p. 241-71.
254. Steel GG, McMillan TJ, Peacock JH. The 5Rs of radiobiology. *International journal of radiation biology*. 1989;56(6):1045-8. Epub 1989/12/01.
255. Navarro-Martin A, Galiana IL, Berenguer Frances MA, Cacicedo J, Canas Cortes R, Comas Anton S, et al. Preliminary Study of the Effect of Stereotactic Body Radiotherapy (SBRT) on the Immune System in Lung Cancer Patients Unfit for Surgery: Immunophenotyping Analysis. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(12). Epub 2018/12/14.
256. Boustani J, Grapin M, Laurent PA, Apetoh L, Mirjolet C. The 6th R of Radiobiology: Reactivation of Anti-Tumor Immune Response. *Cancers*. 2019;11(6). Epub 2019/06/23.
257. Kim MS, Kim W, Park IH, Kim HJ, Lee E, Jung JH, et al. Radiobiological mechanisms of stereotactic body radiation therapy and stereotactic radiation surgery. *Radiation oncology journal*. 2015;33(4):265-75. Epub 2016/01/13.
258. Fowler JF, Welsh JS, Howard SP. Loss of biological effect in prolonged fraction delivery. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2004;59(1):242-9. Epub 2004/04/20.

259. Withers HR. Biological basis of radiation therapy for cancer. *Lancet*. 1992;339(8786):156-9. Epub 1992/01/18.
260. Song CW, Kim MS, Cho LC, Dusenbery K, Sperduto PW. Radiobiological basis of SBRT and SRS. *International journal of clinical oncology*. 2014;19(4):570-8. Epub 2014/07/06.
261. Macia IGM. Radiobiology of stereotactic body radiation therapy (SBRT). *Reports of practical oncology and radiotherapy : journal of Greatpoland Cancer Center in Poznan and Polish Society of Radiation Oncology*. 2017;22(2):86-95. Epub 2017/05/12.
262. Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science*. 2003;300(5622):1155-9. Epub 2003/05/17.
263. Khalifa J, Boyrie S, Moyal É. Réparation des lésions de l'ADN radio-induites et radiosensibilité. 7. 2012.
264. Song CW, Glatstein E, Marks LB, Emami B, Grimm J, Sperduto PW, et al. Biological Principles of Stereotactic Body Radiation Therapy (SBRT) and Stereotactic Radiation Surgery (SRS): Indirect Cell Death. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2021;110(1):21-34. Epub 2019/03/06.
265. Zhang R, Meng Z, Wu X, Zhang M, Piao Z, Jin T. PD-L1/p-STAT3 promotes the progression of NSCLC cells by regulating TAM polarization. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2022;26(23):5872-86. Epub 2022/11/15.
266. Sumitomo R, Hirai T, Fujita M, Murakami H, Otake Y, Huang CL. PD-L1 expression on tumor-infiltrating immune cells is highly associated with M2 TAM and aggressive malignant potential in patients with resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2019;136:136-44. Epub 2019/09/10.
267. Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2000;191(3):423-34. Epub 2000/02/09.
268. Dutt S, Ahmed MM, Loo BW, Jr., Strober S. Novel Radiation Therapy Paradigms and Immunomodulation: Heresies and Hope. *Seminars in radiation oncology*. 2020;30(2):194-200. Epub 2020/05/10.
269. Deng L, Liang H, Xu M, Yang X, Burnette B, Arina A, et al. STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. *Immunity*. 2014;41(5):843-52. Epub 2014/12/18.
270. Postow MA, Callahan MK, Barker CA, Yamada Y, Yuan J, Kitano S, et al. Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *The New England journal of medicine*. 2012;366(10):925-31. Epub 2012/03/09.
271. Lumniczky K, Safrany G. The impact of radiation therapy on the antitumor immunity: local effects and systemic consequences. *Cancer letters*. 2015;356(1):114-25. Epub 2013/09/03.
272. Lee Y, Auh SL, Wang Y, Burnette B, Meng Y, Beckett M, et al. Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8+ T cells: changing strategies for cancer treatment. *Blood*. 2009;114(3):589-95. Epub 2009/04/08.

273. Abuodeh Y, Venkat P, Kim S. Systematic review of case reports on the abscopal effect. *Current problems in cancer*. 2016;40(1):25-37. Epub 2015/11/20.
274. Marconi R, Strolin S, Bossi G, Strigari L. A meta-analysis of the abscopal effect in preclinical models: Is the biologically effective dose a relevant physical trigger? *PloS one*. 2017;12(2):e0171559. Epub 2017/02/22.
275. Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, Sarfraz Y, Diamond JM, Schneider RJ, et al. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nature communications*. 2017;8:15618. Epub 2017/06/10.
276. Grapin M, Richard C, Limagne E, Boidot R, Morgand V, Bertaut A, et al. Optimized fractionated radiotherapy with anti-PD-L1 and anti-TIGIT: a promising new combination. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2019;7(1):160. Epub 2019/06/27.
277. Song CW, Lee YJ, Griffin RJ, Park I, Koonce NA, Hui S, et al. Indirect Tumor Cell Death After High-Dose Hypofractionated Irradiation: Implications for Stereotactic Body Radiation Therapy and Stereotactic Radiation Surgery. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2015;93(1):166-72. Epub 2015/08/19.
278. Kocher M, Treuer H, Voges J, Hoevels M, Sturm V, Muller RP. Computer simulation of cytotoxic and vascular effects of radiosurgery in solid and necrotic brain metastases. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2000;54(2):149-56. Epub 2000/03/04.
279. Oh ET, Park MT, Song MJ, Lee H, Cho YU, Kim SJ, et al. Radiation-induced angiogenic signaling pathway in endothelial cells obtained from normal and cancer tissue of human breast. *Oncogene*. 2014;33(10):1229-38. Epub 2013/03/19.
280. Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodiceci P, Juan G, Ehleiter D, et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science*. 2001;293(5528):293-7. Epub 2001/07/14.
281. Park HJ, Griffin RJ, Hui S, Levitt SH, Song CW. Radiation-induced vascular damage in tumors: implications of vascular damage in ablative hypofractionated radiotherapy (SBRT and SRS). *Radiation research*. 2012;177(3):311-27. Epub 2012/01/11.
282. Roy S, Salerno KE, Citrin DE. Biology of Radiation-Induced Lung Injury. *Seminars in radiation oncology*. 2021;31(2):155-61. Epub 2021/02/22.
283. Ghosh SN, Wu Q, Mader M, Fish BL, Moulder JE, Jacobs ER, et al. Vascular injury after whole thoracic x-ray irradiation in the rat. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009;74(1):192-9. Epub 2009/04/14.
284. Supiot S, Paris F. [Radiobiology dedicated to endothelium]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique*. 2012;16(1):11-5. Epub 2012/02/14. Radiobiologie appliquee a l'endothelium.
285. Santana P, Pena LA, Haimovitz-Friedman A, Martin S, Green D, McLoughlin M, et al. Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell*. 1996;86(2):189-99. Epub 1996/07/26.

286. Soysouvanh F, Benadjaoud MA, Dos Santos M, Mondini M, Lavigne J, Bertho A, et al. Stereotactic Lung Irradiation in Mice Promotes Long-Term Senescence and Lung Injury. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2020;106(5):1017-27. Epub 2020/01/29.
287. Panganiban RA, Mungunsukh O, Day RM. X-irradiation induces ER stress, apoptosis, and senescence in pulmonary artery endothelial cells. *International journal of radiation biology*. 2013;89(8):656-67. Epub 2012/07/14.
288. Hansel C, Jendrossek V, Klein D. Cellular Senescence in the Lung: The Central Role of Senescent Epithelial Cells. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(9). Epub 2020/05/10.
289. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007;115(10):1285-95. Epub 2007/03/14.
290. Baselet B, Sonveaux P, Baatout S, Aerts A. Pathological effects of ionizing radiation: endothelial activation and dysfunction. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2019;76(4):699-728. Epub 2018/11/01.
291. Lavigne J, Soysouvanh F, Buard V, Tarlet G, Guipaud O, Paget V, 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. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2017;99(4):972-82. Epub 2017/09/06.
292. Choi SH, Hong ZY, Nam JK, Lee HJ, Jang J, Yoo RJ, 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(16):3716-26. Epub 2015/04/26.
293. Bertho A, Dos Santos M, Buard V, Paget V, Guipaud O, Tarlet G, et al. Preclinical Model of Stereotactic Ablative Lung Irradiation Using Arc Delivery in the Mouse: Effect of Beam Size Changes and Dose Effect at Constant Collimation. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2020;107(3):548-62. Epub 2020/04/13.
294. Almeida C, Nagarajan D, Tian J, Leal SW, Wheeler K, Munley M, et al. The role of alveolar epithelium in radiation-induced lung injury. *PloS one*. 2013;8(1):e53628. Epub 2013/01/18.
295. Citrin DE, Shankavaram U, Horton JA, Shield W, 3rd, Zhao S, Asano H, et al. Role of type II pneumocyte senescence in radiation-induced lung fibrosis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2013;105(19):1474-84. Epub 2013/09/21.
296. Pan J, Li D, Xu Y, Zhang J, Wang Y, Chen M, 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. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2017;99(2):353-61. Epub 2017/05/10.
297. Zhou J, Wu P, Sun H, Zhou H, Zhang Y, Xiao Z. Lung tissue extracellular matrix-derived hydrogels protect against radiation-induced lung injury by suppressing epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Physiol*. 2020;235(3):2377-88.
298. Vallee A, Lecarpentier Y, Guillevin R, Vallee JN. Interactions between TGF-beta1, canonical WNT/beta-catenin pathway and PPAR gamma in radiation-induced fibrosis. *Oncotarget*. 2017;8(52):90579-604. Epub 2017/11/23.

299. Straub JM, New J, Hamilton CD, Lominska C, Shnayder Y, Thomas SM. Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2015;141(11):1985-94. Epub 2015/04/26.
300. Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z. TGF- β 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respiratory research*. 2005;6(1):1-15.
301. Wirsdorfer F, Jendrossek V. The Role of Lymphocytes in Radiotherapy-Induced Adverse Late Effects in the Lung. *Front Immunol*. 2016;7:591. Epub 2016/12/27.
302. Cappuccini F, Eldh T, Bruder D, Gereke M, Jastrow H, Schulze-Osthoff K, et al. New insights into the molecular pathology of radiation-induced pneumopathy. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2011;101(1):86-92. Epub 2011/07/05.
303. Genard G, Lucas S, Michiels C. Reprogramming of Tumor-Associated Macrophages with Anticancer Therapies: Radiotherapy versus Chemo- and Immunotherapies. *Front Immunol*. 2017;8:828. Epub 2017/08/05.
304. Mukherjee D, Coates PJ, Lorimore SA, Wright EG. Responses to ionizing radiation mediated by inflammatory mechanisms. *The Journal of pathology*. 2014;232(3):289-99. Epub 2013/11/21.
305. Groves AM, Johnston CJ, Misra RS, Williams JP, Finkelstein JN. Whole-lung irradiation results in pulmonary macrophage alterations that are subpopulation and strain specific. *Radiation research*. 2015;184(6):639-49.
306. Shi X, Shiao SL. The role of macrophage phenotype in regulating the response to radiation therapy. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2018;191:64-80. Epub 2017/11/28.
307. Groves AM, Johnston CJ, Misra RS, Williams JP, Finkelstein JN. Effects of IL-4 on pulmonary fibrosis and the accumulation and phenotype of macrophage subpopulations following thoracic irradiation. *International journal of radiation biology*. 2016;92(12):754-65. Epub 2016/08/20.
308. de Leve S, Wirsdorfer F, Cappuccini F, Schutze A, Meyer AV, Rock K, et al. Loss of CD73 prevents accumulation of alternatively activated macrophages and the formation of profibrotic macrophage clusters in irradiated lungs. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2017;31(7):2869-80. Epub 2017/03/23.
309. Zhang H, Han G, Liu H, Chen J, Ji X, Zhou F, et al. The development of classically and alternatively activated macrophages has different effects on the varied stages of radiation-induced pulmonary injury in mice. *Journal of radiation research*. 2011;52(6):717-26. Epub 2011/11/23.
310. Meng Y, Beckett MA, Liang H, Mauceri HJ, van Rooijen N, Cohen KS, et al. Blockade of tumor necrosis factor alpha signaling in tumor-associated macrophages as a radiosensitizing strategy. *Cancer research*. 2010;70(4):1534-43. Epub 2010/02/11.
311. Klug F, Prakash H, Huber PE, Seibel T, Bender N, Halama N, et al. Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS(+)/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy. *Cancer cell*. 2013;24(5):589-602. Epub 2013/11/12.
312. Nagai T, Tanaka M, Hasui K, Shirahama H, Kitajima S, Yonezawa S, et al. Effect of an immunotoxin to folate receptor beta on bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis. *Clinical and experimental immunology*. 2010;161(2):348-56. Epub 2010/06/17.

313. Wang H, Gao Y, Wang L, Yu Y, Zhang J, Liu C, et al. Lung specific homing of diphenylethylideneiodonium chloride improves pulmonary fibrosis by inhibiting macrophage M2 metabolic program. *Journal of advanced research*. 2023;44:213-25. Epub 2023/02/02.
314. Conte E. Targeting monocytes/macrophages in fibrosis and cancer diseases: Therapeutic approaches. *Pharmacology & therapeutics*. 2022;234:108031. Epub 2021/11/15.
315. Ghebremedhin A, Salam AB, Adu-Addai B, Noonan S, Stratton R, Ahmed MSU, et al. A Novel CD206 Targeting Peptide Inhibits Bleomycin Induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *bioRxiv*. 2020. Epub 2020/08/09.
316. Rubin P, Finkelstein J, Shapiro D. Molecular biology mechanisms in the radiation induction of pulmonary injury syndromes: interrelationship between the alveolar macrophage and the septal fibroblast. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1992;24(1):93-101. Epub 1992/01/01.
317. Ray D, Shukla S, Allam US, Helman A, Ramanand SG, Tran L, et al. Tristetraprolin mediates radiation-induced TNF-alpha production in lung macrophages. *PloS one*. 2013;8(2):e57290. Epub 2013/03/08.
318. Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology. *Respiratory research*. 2006;7(1):125. Epub 2006/10/13.
319. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum tumor necrosis factor-alpha levels in patients with systemic sclerosis: association with pulmonary fibrosis. *The Journal of rheumatology*. 1997;24(4):663-5. Epub 1997/04/01.
320. Miyazaki Y, Araki K, Vesin C, Garcia I, Kapanci Y, Whitsett JA, et al. Expression of a tumor necrosis factor-alpha transgene in murine lung causes lymphocytic and fibrosing alveolitis. A mouse model of progressive pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 1995;96(1):250-9. Epub 1995/07/01.
321. Zhang M, Qian J, Xing X, Kong FM, Zhao L, Chen M, et al. Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha pathway is radioprotective for the lung. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(6):1868-76. Epub 2008/03/19.
322. Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circulation research*. 2000;86(12):1259-65. Epub 2000/06/24.
323. Thavarajah K, Wu P, Rhew EJ, Yeldandi AK, Kamp DW. Pulmonary complications of tumor necrosis factor-targeted therapy. *Respir Med*. 2009;103(5):661-9. Epub 2009/02/10.
324. Lierova A, Jelicova M, Nemcova M, Proksova M, Pejchal J, Zarybnicka L, et al. Cytokines and radiation-induced pulmonary injuries. *Journal of radiation research*. 2018;59(6):709-53. Epub 2018/09/01.
325. Park H-R, Jo S-K, Jung U. Ionizing radiation promotes epithelial-to-Mesenchymal transition in lung epithelial cells by TGF- β -producing M2 macrophages. *in vivo*. 2019;33(6):1773-84.
326. Su L, Dong Y, Wang Y, Guan B, Lu Y, Wu J, et al. Potential role of senescent macrophages in radiation-induced pulmonary fibrosis. *Cell death & disease*. 2021;12(6):527. Epub 2021/05/24.

327. Mora AL, Torres-Gonzalez E, Rojas M, Corredor C, Ritzenthaler J, Xu J, et al. Activation of alveolar macrophages via the alternative pathway in herpesvirus-induced lung fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2006;35(4):466-73. Epub 2006/05/20.
328. Medeiros AI, Serezani CH, Lee SP, Peters-Golden M. Efferocytosis impairs pulmonary macrophage and lung antibacterial function via PGE2/EP2 signaling. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(1):61-8. Epub 2009/01/07.
329. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annual review of immunology*. 2009;27.
330. Shashkin P, Dragulev B, Ley K. Macrophage differentiation to foam cells. *Current pharmaceutical design*. 2005;11(23):3061-72.
331. S NS, Raviraj R, Nagarajan D, Zhao W. Radiation-induced lung injury: impact on macrophage dysregulation and lipid alteration - a review. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 2019;41(3):370-9. Epub 2018/11/18.
332. Chiang C-S, Liu W-C, Jung S-M, Chen F-H, Wu C-R, McBride WH, et al. Compartmental responses after thoracic irradiation of mice: strain differences. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 2005;62(3):862-71.
333. Maxfield FR, Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*. 2005;438(7068):612-21.
334. Levis G, Efstratiadis A, Mantzos J, Miras C. The effect of ionizing radiation on lipid metabolism in bone marrow cells. *Radiation research*. 1975;61(2):342-9.
335. Agudelo CW, Samaha G, Garcia-Arcos I. Alveolar lipids in pulmonary disease. A review. *Lipids in health and disease*. 2020;19(1):122. Epub 2020/06/05.
336. Kim TH, Lee YH, Kim KH, Lee SH, Cha JY, Shin EK, et al. Role of lung apolipoprotein A-I in idiopathic pulmonary fibrosis: antiinflammatory and antifibrotic effect on experimental lung injury and fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;182(5):633-42. Epub 2010/05/14.
337. Venosa A, Smith LC, Murray A, Banota T, Gow AJ, Laskin JD, et al. Regulation of Macrophage Foam Cell Formation During Nitrogen Mustard (NM)-Induced Pulmonary Fibrosis by Lung Lipids. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2019;172(2):344-58. Epub 2019/08/21.
338. Chung EJ, Reedy JL, Kwon S, Patil S, Valle L, White AO, et al. 12-Lipoxygenase is a Critical Mediator of Type II Pneumocyte Senescence, Macrophage Polarization and Pulmonary Fibrosis after Irradiation. *Radiation research*. 2019;192(4):367-79. Epub 2019/08/03.
339. Raghu G, Martinez FJ, Brown KK, Costabel U, Cottin V, Wells AU, et al. CC-chemokine ligand 2 inhibition in idiopathic pulmonary fibrosis: a phase 2 trial of carlumab. *The European respiratory journal*. 2015;46(6):1740-50. Epub 2015/10/24.
340. Hu D, Zhang Y, Cao R, Hao Y, Yang X, Tian T, et al. The protective effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor against radiation-induced lung injury. *Transl Lung Cancer Res*. 2020;9(6):2440-59. Epub 2021/01/26.
341. Bert P. Expériences et considérations sur la greffe animale. . *Journal de l'Anatomie et de la physiologie* 1864;1 :69-87.

342. Finerty JC. Parabiosis in physiological studies. *Physiological reviews*. 1952;32(3):277-302. Epub 1952/07/01.
343. Conboy MJ, Conboy IM, Rando TA. Heterochronic parabiosis: historical perspective and methodological considerations for studies of aging and longevity. *Aging cell*. 2013;12(3):525-30. Epub 2013/03/16.
344. Van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *Journal of immunological methods*. 1994;174(1-2):83-93. Epub 1994/09/14.
345. Zeng Y, Jin H, Wang J, Guo C, Chen W, Tan Y, et al. An optimized method for intratracheal instillation in mice. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2022;118:107230. Epub 2022/11/03.
346. Lawrenz MB, Fodah RA, Gutierrez MG, Warawa J. Intubation-mediated intratracheal (IMIT) instillation: a noninvasive, lung-specific delivery system. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2014(93):e52261. Epub 2014/12/10.
347. Thepen T, Van Rooijen N, Kraal G. Alveolar macrophage elimination in vivo is associated with an increase in pulmonary immune response in mice. *The Journal of experimental medicine*. 1989;170(2):499-509. Epub 1989/08/01.
348. Xu M, Wang X, Xu L, Zhang H, Li C, Liu Q, et al. Chronic lung inflammation and pulmonary fibrosis after multiple intranasal instillation of PM(2) (.5) in mice. *Environmental toxicology*. 2021;36(7):1434-46. Epub 2021/03/30.
349. Froes SDP, Souza ABF, Matos NA, Philips NE, Costa GP, Talvani A, et al. Intranasal instillation of distilled water, hypertonic saline and sodium bicarbonate promotes redox imbalance and acute lung inflammation in adult mice. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2019;266:27-32. Epub 2019/04/28.
350. Jackson IL, Vujaskovic Z, Down JD. 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. *Radiation research*. 2011;175(4):510-8.
351. Beach TA, Johnston CJ, Groves AM, Williams JP, Finkelstein JN. Radiation induced pulmonary fibrosis as a model of progressive fibrosis: Contributions of DNA damage, inflammatory response and cellular senescence genes. *Experimental lung research*. 2017;43(3):134-49. Epub 2017/05/24.
352. Zhang Y, Zhang X, Rabbani ZN, Jackson IL, Vujaskovic Z. Oxidative stress mediates radiation lung injury by inducing apoptosis. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2012;83(2):740-8. Epub 2012/01/25.
353. Cho J, Kodym R, Seliounine S, Richardson JA, Solberg TD, Story MD. 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(3):895-902.
354. Hong Z-Y, Eun SH, Park K, Choi WH, Lee JI, Lee E-J, 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(4):648-57.

355. Hong Z-Y, Lee H-J, Choi WH, Lee Y-J, Eun SH, Lee JI, et al. A preclinical rodent model of acute radiation-induced lung injury after ablative focal irradiation reflecting clinical stereotactic body radiotherapy. *Radiation research*. 2014;182(1):83-91.
356. 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. *Technology in Cancer Research & Treatment*. 2017;16(3):316-20.
357. Paget V, Ben Kacem M, Dos Santos M, Benadjaoud MA, Soysouvanh F, Buard V, et al. Multiparametric radiobiological assays show that variation of X-ray energy strongly impacts relative biological effectiveness: comparison between 220 kV and 4 MV. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-10.
358. Dörr W, Hendry JH. Consequential late effects in normal tissues. *Radiotherapy and oncology*. 2001;61(3):223-31.
359. Dörr W, Bertmann S, Herrmann T. Radiation induced lung reactions in breast cancer therapy. *Strahlentherapie und Onkologie*. 2005;9(181):567-73.
360. Slanina J, Maschitzki R, Wannemacher M. Pulmonary reaction to radiation as depicted in chest x-rays following megavolt therapy of breast cancer. *Der Radiologe*. 1987;27(4):181-91.
361. Bertho A, Dos Santos M, Braga-Cohen S, Buard V, Paget V, Guipaud O, et al. Preclinical Model of Stereotactic Ablative Lung Irradiation Using Arc Delivery in the Mouse: Is Fractionation Worthwhile? *Frontiers in Medicine*. 2021;8:794324.
362. Beach TA, Groves AM, Williams JP, Finkelstein JN. Modeling radiation-induced lung injury: lessons learned from whole thorax irradiation. *International journal of radiation biology*. 2020;96(1):129-44. Epub 2018/10/26.
363. Ji WJ, Ma YQ, Zhou X, Zhang YD, Lu RY, Sun HY, et al. Temporal and spatial characterization of mononuclear phagocytes in circulating, lung alveolar and interstitial compartments in a mouse model of bleomycin-induced pulmonary injury. *Journal of immunological methods*. 2014;403(1-2):7-16. Epub 2013/11/28.
364. Groves AM, Johnston CJ, Misra RS, Williams JP, Finkelstein JN. Whole-Lung Irradiation Results in Pulmonary Macrophage Alterations that are Subpopulation and Strain Specific. *Radiation research*. 2015;184(6):639-49. Epub 2015/12/04.
365. Juers JA, Rogers RM, McCurdy JB, Cook WW. Enhancement of bactericidal capacity of alveolar macrophages by human alveolar lining material. *J Clin Invest*. 1976;58(2):271-5. Epub 1976/08/01.
366. Serezani CH, Aronoff DM, Jancar S, Mancuso P, Peters-Golden M. Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. *Blood*. 2005;106(3):1067-75. Epub 2005/02/19.
367. Park HR, Jo SK, Jung U. Ionizing Radiation Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Lung Epithelial Cells by TGF-beta-producing M2 Macrophages. *in vivo*. 2019;33(6):1773-84. Epub 2019/10/31.
368. Chung SI, Horton JA, Ramalingam TR, White AO, Chung EJ, Hudak KE, et al. IL-13 is a therapeutic target in radiation lung injury. *Scientific reports*. 2016;6:39714. Epub 2016/12/23.

369. Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*. 2014;40(2):274-88. Epub 2014/02/18.
370. Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, David E, Keren-Shaul H, Merad M, et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell*. 2014;159(6):1312-26. Epub 2014/12/07.
371. Bleriot C, Chakarov S, Ginhoux F. Determinants of Resident Tissue Macrophage Identity and Function. *Immunity*. 2020;52(6):957-70. Epub 2020/06/20.
372. Feliste R, Dousset N, Carton M, Douste-Blazy L. Changes in plasma apolipoproteins following whole-body irradiation in rabbit. *Radiation research*. 1981;87(3):602-12.
373. Feurgard C, Bayle D, Guezingar F, Serougne C, Mazur A, Lutton C, et al. Effects of ionizing radiation (neutrons/gamma rays) on plasma lipids and lipoproteins in rats. *Radiation research*. 1998;150(1):43-51.
374. Gu L, Larson Casey JL, Andrabi SA, Lee JH, Meza-Perez S, Randall TD, et al. Mitochondrial calcium uniporter regulates PGC-1 α expression to mediate metabolic reprogramming in pulmonary fibrosis. *Redox Biol*. 2019;26:101307. Epub 2019/09/02.
375. Romero F, Shah D, Duong M, Penn RB, Fessler MB, Madenspacher J, et al. A pneumocyte-macrophage paracrine lipid axis drives the lung toward fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2015;53(1):74-86. Epub 2014/11/20.
376. Hou X, Summer R, Chen Z, Tian Y, Ma J, Cui J, et al. Lipid Uptake by Alveolar Macrophages Drives Fibrotic Responses to Silica Dust. *Scientific reports*. 2019;9(1):399. Epub 2019/01/25.
377. Duru N, Wolfson B, Zhou Q. Mechanisms of the alternative activation of macrophages and non-coding RNAs in the development of radiation-induced lung fibrosis. *World journal of biological chemistry*. 2016;7(4):231-9. Epub 2016/12/14.
378. Prieur X, Roszer T, Ricote M. Lipotoxicity in macrophages: evidence from diseases associated with the metabolic syndrome. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1801(3):327-37. Epub 2009/10/03.
379. Lee S, Lee E, Ko E, Ham M, Lee HM, Kim E-S, et al. Tumor-associated macrophages secrete CCL2 and induce the invasive phenotype of human breast epithelial cells through upregulation of ERO1- α and MMP-9. *Cancer letters*. 2018;437:25-34.
380. Marx C, Gardner S, Harman RM, Wagner B, Van de Walle GR. Mesenchymal stromal cell-secreted CCL2 promotes antibacterial defense mechanisms through increased antimicrobial peptide expression in keratinocytes. *Stem Cells Translational Medicine*. 2021;10(12):1666-79.
381. Roy RM, Wüthrich M, Klein BS. Chitin elicits CCL2 from airway epithelial cells and induces CCR2-dependent innate allergic inflammation in the lung. *The Journal of Immunology*. 2012;189(5):2545-52.
382. Amsellem V, Abid S, Poupel L, Parpaleix A, Rodero M, Gary-Bobo G, et al. Roles for the CX3CL1/CX3CR1 and CCL2/CCR2 Chemokine Systems in Hypoxic Pulmonary Hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2017;56(5):597-608. Epub 2017/01/27.
383. Ranjbar M, Rahimi A, Baghernejadan Z, Ghorbani A, Khorramdelazad H. Role of CCL2/CCR2 axis in the pathogenesis of COVID-19 and possible Treatments: All options on the Table. *International immunopharmacology*. 2022;113(Pt A):109325. Epub 2022/10/18.

384. Okuma T, Terasaki Y, Kaikita K, Kobayashi H, Kuziel WA, Kawasuji M, et al. C-C chemokine receptor 2 (CCR2) deficiency improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis by attenuation of both macrophage infiltration and production of macrophage-derived matrix metalloproteinases. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2004;204(5):594-604.
385. Maus UA, Waelsch K, Kuziel WA, Delbeck T, Mack M, Blackwell TS, et al. Monocytes are potent facilitators of alveolar neutrophil emigration during lung inflammation: role of the CCL2-CCR2 axis. *The Journal of Immunology*. 2003;170(6):3273-8.
386. Mecozzi L, Mambrini M, Ruscitti F, Ferrini E, Ciccimarra R, Ravanetti F, et al. In-vivo lung fibrosis staging in a bleomycin-mouse model: a new micro-CT guided densitometric approach. *Scientific reports*. 2020;10(1):18735. Epub 2020/11/01.
387. Turpin M, Rémy-Jardin M. Pneumopathie infiltrante diffuse: analyse des différents compartiments radiologiques. *Revue des Maladies Respiratoires Actualités*. 2016;8(2):80-2.
388. Murphy J, Summer R, Wilson AA, Kotton DN, Fine A. The prolonged life-span of alveolar macrophages. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2008;38(4):380-5. Epub 2008/01/15.
389. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Reyfman PA, Cuda CM, Walter JM, McQuattie-Pimentel AC, et al. Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *The Journal of experimental medicine*. 2017;214(8):2387-404. Epub 2017/07/12.
390. Davies LC, Rosas M, Smith PJ, Fraser DJ, Jones SA, Taylor PR. A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation. *Eur J Immunol*. 2011;41(8):2155-64. Epub 2011/06/29.
391. Aegerter H, Lambrecht BN, Jakubzick CV. Biology of lung macrophages in health and disease. *Immunity*. 2022;55(9):1564-80. Epub 2022/09/15.
392. Bosteels C, Neyt K, Vanheerswynghels M, van Helden MJ, Sichien D, Debeuf N, et al. Inflammatory type 2 cDCs acquire features of cDC1s and macrophages to orchestrate immunity to respiratory virus infection. *Immunity*. 2020;52(6):1039-56. e9.
393. Gibbings SL, Goyal R, Desch AN, Leach SM, Prabagar M, Atif SM, et al. Transcriptome analysis highlights the conserved difference between embryonic and postnatal-derived alveolar macrophages. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2015;126(11):1357-66.
394. Aegerter H, Kulikauskaite J, Crotta S, Patel H, Kelly G, Hessel EM, et al. Influenza-induced monocyte-derived alveolar macrophages confer prolonged antibacterial protection. *Nature immunology*. 2020;21(2):145-57.
395. Guillon A, Arafa El, Barker KA, Belkina AC, Martin I, Shenoy AT, et al. Pneumonia recovery reprograms the alveolar macrophage pool. *JCI insight*. 2020;5(4).
396. Mata E, Tarancon R, Guerrero C, Moreo E, Moreau F, Uranga S, et al. Pulmonary BCG induces lung-resident macrophage activation and confers long-term protection against tuberculosis. *Science immunology*. 2021;6(63):eabc2934.
397. Chen F, El-Naccache DW, Ponessa JJ, Lemenze A, Espinosa V, Wu W, et al. Helminth resistance is mediated by differential activation of recruited monocyte-derived alveolar macrophages and arginine depletion. *Cell reports*. 2022;38(2):110215.

398. Machiels B, Dourcy M, Xiao X, Javaux J, Mesnil C, Sabatel C, et al. A gammaherpesvirus provides protection against allergic asthma by inducing the replacement of resident alveolar macrophages with regulatory monocytes. *Nature immunology*. 2017;18(12):1310-20.
399. Grant RA, Morales-Nebreda L, Markov NS, Swaminathan S, Querrey M, Guzman ER, et al. Circuits between infected macrophages and T cells in SARS-CoV-2 pneumonia. *Nature*. 2021;590(7847):635-41.
400. Liao M, Liu Y, Yuan J, Wen Y, Xu G, Zhao J, et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nature medicine*. 2020;26(6):842-4.
401. Morse C, Tabib T, Sembrat J, Buschur KL, Bittar HT, Valenzi E, et al. Proliferating SPP1/MERTK-expressing macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*. 2019;54(2).
402. Mantri M, Scuderi GJ, Abedini-Nassab R, Wang MFZ, McKellar D, Shi H, et al. Spatiotemporal single-cell RNA sequencing of developing chicken hearts identifies interplay between cellular differentiation and morphogenesis. *Nature communications*. 2021;12(1):1771. Epub 2021/03/21.
403. Du S, Lockamy V, Zhou L, Xue C, LeBlanc J, Glenn S, 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(3):529-37. Epub 2016/09/30.
404. Wennerberg E, Spada S, Rudqvist NP, Lhuillier C, Gruber S, Chen Q, et al. CD73 Blockade Promotes Dendritic Cell Infiltration of Irradiated Tumors and Tumor Rejection. *Cancer immunology research*. 2020;8(4):465-78. Epub 2020/02/13.
405. Ban Y, Markowitz GJ, Zou Y, Ramchandani D, Kraynak J, Sheng J, et al. Radiation-activated secretory proteins of Scgb1a1(+) club cells increase the efficacy of immune checkpoint blockade in lung cancer. *Nature cancer*. 2021;2(9):919-31. Epub 2021/12/18.