Traitement par thérapie cellulaire de la cystite radique chez le rat

Clément Brossard

▶ **To cite this version:**

Clément Brossard. Traitement par thérapie cellulaire de la cystite radique chez le rat. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS130 . tel-03771184

HAL Id: tel-03771184
https://theses.hal.science/tel-03771184

Submitted on 7 Sep 2022

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

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

Sorbonne Université

École Doctorale 394 - Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique.

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN).

Laboratoire de Radiobiologie des expositions Médicales (LRMed).

Traitement par thérapie cellulaire de la cystite radique chez le rat

Par Clément Brossard

Thèse de doctorat de biologie cellulaire et moléculaire

Dirigée par le Dr. Alain Chapel

Présentée et soutenue publiquement le 06/07/2022

Devant un jury composé de :

Pr Onnik Agbulut (Professeur des Universités)	Président du Jury
Dr Anne Bravard (Directeur de recherche)	Rapporteuse
Pr Hélène Rouard (Professeure des Universités)	Rapporteuse
Pr Patricia Albanese (Professeure des Universités)	Examinatrice
Dr Jean-Marc Simon (Professeur des Universités, Praticien Hospitalier)	Examinateur
Dr Alain Chapel (Directeur de recherche)	Directeur de thèse

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

« Assurons-nous bien du fait avant que de nous inquiéter de la cause. »

Bernard Le Bovier de Fontenelle,

Histoire des oracles, 1686, Première dissertation, IV.

« On fait la science avec des faits, comme on fait une maison avec des pierres ; mais une accumulation de faits n'est pas plus une science qu'un tas de pierres n'est une maison. »

Henri Poincaré

La Science et l'hypothèse, 1908

« La science est faite d'erreurs, mais d'erreurs qu'il est bon de commettre, car elles mènent peu à peu à la vérité. »

Jules Verne

Voyage au centre de la terre, 1864

Remerciements

En tout premier, je souhaite remercier chaque membre de mon jury :
Le professeur **Onnik Agbulut** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.
La docteure **Anne Bravard** et la professeure **Hélène Rouard** d'avoir accepté d'être mes rapporteuses et d'avoir relu les plus de 180 pages de manuscrit.
Je remercie aussi la professeure **Patricia Albanese** et le docteur **Jean-Marc Simon** pour avoir accepté d'être examinateurs dans mon jury de thèse.

Je remercie toute l'équipe du LRMed :

À commencer par mon directeur de thèse, **Alain Chapel**. Je te remercie beaucoup pour ton soutien et pour le temps que tu as consacré à la relecture et aux corrections du manuscrit. Ce fut un travail long, bien trop long à mon gout et aux tiens aussi. Je te remercie pour tous ces échanges qu'on a eus, pour les réflexions sur nos résultats qui n'étaient pas toujours simples. On a bien dû se creuser la tête pour comprendre et sortir des explications cohérentes. Je te remercie aussi pour tous les autres échanges qu'on ait eu, notamment celles sur ton père, la moto, les problèmes des rapporteurs dans les articles ou encore le marathon. J'espère que tu pourras reprendre l'entraînement pour en faire de nouveau, mais évite de faire sécher tes vêtements dans le bureau ! La pauvre Christine. Bref merci pour ces 4 années passées avec toi. Je te souhaite bon courage pour la suite.

Ma reconnaissance va aussi à notre directeur de laboratoire, **Fabien Milliat**. Merci d'avoir toujours été présent et accessible, merci pour ton écoute, tes conseils et tes critiques. Je remercie aussi **Agnès François** pour sa gentillesse, son humour et ses questions toujours très pertinentes. Un gros merci à **Valérie Buard.** On en a passé du temps sur le microscope et sur le Nanozoomer. Je crois qu'on a eu tous les problèmes possibles dessus, les lames qui ne passent pas ou qui reste bloquer dans la machine, des jolis flous artistiques du logiciel. Maintenant, on sait presque tout faire dessus. Également un gros merci à **Amine Benadjaoud**, sans toi beaucoup de données n'auraient pas pu être exploitées et on aurait pataugé dans la semoule avec Alain. Merci à **Morgane Dos Santos** pour la réalisation des irradiations de nos rats, sans toi i n'y aurait même pas eu de thèse ! Je remercie aussi **Christelle Demarquay** qui

nous a beaucoup aidés dans la mise en place de la culture des CSM. Merci d'avoir passé les tubes au FACS également.

Je remercie aussi tout le reste du laboratoire, **Vincent Paget**, **Noëlle Mathieu**, **Claire Squiban**, **Alexandra Semont, Christine Linard et Georges Tarlet** pour les échanges qu'on a pu avoir tous au long de ces 4 années. Merci à tous pour la bonne humeur que vous mettez au laboratoire, cela donne un cadre de travail plus qu'agréable. Merci aussi à **Véronique Joffres** pour les discussions que j'ai pu avoir avec toi lorsque je cherchais désespérément certaines fournitures. Enfin, je remercie **Marc Benderitter,** notre chef de service pour m'avoir accueillie au sein du SERAMED ainsi que pour nos échanges au détour d'un couloir.

Cette thèse a été l'occasion, pour moi, d'encadrer plusieurs Masters 2. Je remercie **Anne-Charlotte Lefranc**. Je t'ai connue en tant que licence pro auprès de Ségolène alors que je n'étais qu'au tout début puis tu as rejoint notre équipe pour ton master. Ce fut un véritable plaisir de pouvoir t'encadrer. Ta bonne humeur et ton travail toujours impeccable ont rendu les choses beaucoup plus faciles il faut dire. Je n'ai qu'un seul regret c'est que ton stage ait été écourté à cause du COVID, ça a beaucoup ralenti le projet, mais ça nous as permis de rédiger un très beau article de synthèse (bon, il a mis longtemps avant de sortir, mais il est là !). Ta nouvelle équipe à bien de la chance de t'avoir. Je te souhaite une bonne continuation. Je remercie aussi mon autre master 2, **Anne-Laure Pouliet** (oui oui encore une Anne, c'était un critère de choix des masters XD.). Merci d'avoir été là durant ces 6 mois. Je regrette que tu n'aies pas pu faire autant de choses que voulu et que les comptages aient pris autant de temps. Mais tu as fait un superbe master 2 et je suis très fier de toi. Je le suis encore plus maintenant que tu es en thèse. Je te redonne le bébé, il est à toi. À toi de mener ta barque comme tu l'entends. N'hésite pas à faire entendre ta voix et à proposer des idées sur de nouvelles expériences que tu aimerais réaliser. Je te souhaite bon courage pour ta thèse, qui je suis sûr, ce passera très bien. Je serais toujours à ta disposition si tu as besoin de conseil, d'un avis ou si tu en as marre d'Alain 😂.

Maintenant, on passe dans le dur des remerciements avec tous les collègues thésards. Tout d'abord **Ségolène Ladaigue**, enfin Docteur Ladaigue maintenant. Ma collègue de bureau depuis le master 2 ! Ce fut un énorme plaisir de te rencontrer. On a pu partager nos galères d'écriture du manuscrit de thèse. Heureusement que tu es passé avant moi, j'ai pu voir

toutes les démarches administratives à faire et ça m'a bien aidé (oui, c'est ma hantise l'administration). Je me souviendrais longtemps de ton rire, en même temps il faut dire que tu étais très bon publique. Ce fut un réel plaisir de t'avoir avec moi dans le bureau. Je te souhaite une bonne continuation dans ton nouveau boulot. Merci aussi à **Sarah Braga Cohen**, les débuts n'ont pas forcément été faciles, il faut dire que tu as une « grande gueule » et il faut s'y habituer. Mais tu es une personne au grand cœur et tu fais avancer les choses. Je te souhaite une bonne et dernière année de thèse, mais je ne me fais aucun doute que ça se passera très bien, surtout avec Agnès. Avec Ségolène vous avez sacrément animé le bureau, avec vous pas besoin de radio, au fond ça va me manquer un peu. Par contre, je suis désolé Sarah, mais je vais devoir embarquer le câble du chargeur de téléphone. Enfin la dernière doctorante de la dream team, **Manon Guillou**, la seule doctorante physicienne du groupe. Ce fut un réel plaisir de te connaître. Je me souviendrais longtemps de ton côté 1er degrés qui nous à donner de bonnes barres de fous rires ainsi que la « dark Manon », de ta fameuse RPE et de l'épilation de tes souris. En parlant d'épilation de souris, je ne pouvais enchainer qu'avec **Lucie Ancel**, merci pour ces pauses café et pour être passé le soir avant de partir regarder si je n'étais pas décédé devant mon ordinateur, ça me faisait sentir beaucoup moins seul. En restant dans le LRAcc merci à Quentin, le côté bien gaulois du groupe et notre petit informaticien, merci pour ta bonne humeur.

Je souhaite également bon courage pour tous les autres doctorants du laboratoire qui vont passer leur thèse l'année prochaine. **Martin Jestin, Mallia Geiger** et **Lydia Bensemmane** c'est bientôt votre tour. Ce fut un plaisir de vous connaitre. Lydia, je regretterai toujours l'escapade à Miami que nous n'avons pas pu réaliser, j'espère que tu pourras te rattraper avec un autre voyage ailleurs.

Je n'oublie pas non plus les nouvelles doctorantes, **Sarminie Bavananthan** et **Claire Lago**. Vous êtes partie dans une grande aventure de trois ans, vous formez une bonne petite équipe avec Anne-Laure et les autres étudiantes et je suis de tout cœur avec vous.

Merci également à tous les autres stagiaires qui ont parsemé ces 4 années de thèse, je ne puis les citer tous, mais vous avez chacun une petite place dans mon périple.

Une petite pensée aussi pour les post-doctorantes, **Emilie Lebraud** et **Batoul**. Emilie ce fut un plaisir de te connaitre et de voir le petit bout de chou grandir. Batoul, on n'a pas beaucoup échangé ensemble, mais ce fut toujours très agréable. Tu es une personne avec un cœur en or, ne changes pas.

Je n'oublie pas les anciens doctorants, **Frédéric Soysouvanh, Alexia Lapière** et **Annaïg Bertho et Mariam benkacem**. Merci notamment à Fred pour ta gentillesse et pour nous avoir aidé à nos tous début, rien que pour nous aider à trouver les produits dans ces longs couloirs qui se ressemble tous. Merci à tous les autres pour les discussions et les échanges qu'on a eus.

Deux autres personnes que j'aimerais également remercier bien qu'ils ne soient pas doctorants. Il s'agit de **Miray Razanajatovo** et **Yoan Ristic**. Yoan le tenancier du groupe, la personne qui fait les liens entre les doctorants d'avant, d'aujourd'hui et peut-être de demain. Tu fais partie à jamais des « jeunes » et ce fut un plaisir de te rencontrer. Miray la petite touche d'originalité du groupe. Je me souviendrais de tes danses au nom plus originales les unes que les autres ainsi que tes origamis.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement les membres du GSEA, notre véto **Delphine Denais-Laleive** qui s'est battue au moment du covid pour qu'on puisse garder nos animaux. Sans toi, nous aurions perdu plus d'un an de travail. Merci à **Frédérique Voyer** pour les petits rats GFP et merci à **Amandine Sache** pour les commandes de dernières minutes. Et surtout un grand, grand merci à **Romain Granger**. Sans toi les journées à l'animalerie auraient été beaucoup moins drôles. Merci d'avoir surveillé nos petites bébêtes. Merci aussi pour ces heures interminables à noter les bandelettes urinaires. Tes dessins, parfois approximatifs, de moi et le doux surnom que tu donnais à mes rats ; les connasses.

Ça me permet directement d'enchainer sur mes rats. Cette étude a nécessité plus de 300 rats et elles nous ont donné beaucoup de fil à retordre. Ce fut une véritable série télé. Nous avons eu le droit à Prison break avec les rats qui s'échappent en pleine nuit et passant par les gaines de ventilation ou en se faufilant dans le moteur de la hotte. Du MacGyver avec les rates qui ont rongé la cage juste derrière le biberon pour que nous ne puissions pas les voir et qui ont fait une petite escapade nocturne. Mais ce fut aussi beaucoup d'inquiétude avec leurs tumeurs et les opérations. Bref merci à elles sans qui il n'y aurait pas de thèse.

Je remercie aussi **Chloé** qui m'a fait beaucoup rigoler avec ses histoires interminables et son téléphone toujours en panne (Facebook, je te retiens). Il va falloir que tu trouves quelqu'un d'autre maintenant. Bon courage à toi pour les quelques années qu'il te reste.

Merci aussi à tous les autres membres du LRAcc avec qui j'ai pu échanger autour d'une pause ou d'un café.

Avant de remercier la famille, j'aimerais remercier mes deux meilleures amies, **Sibylle et Lydie**. Nous avons passé de superbes moments depuis la L3. Entre les soirées et les sorties aux bars, ça a bien permis de décompresser. Un merci tout spécial à Sybille pour la fameuse soirée Pikachu.

Tout d'abord merci à mes parents, sans qui je ne serais pas ici aujourd'hui. Vous m'avez toujours soutenu dans mes études et vous avez toujours été là pour moi. Merci de m'avoir transmis certains de vos traits de caractère, surtout ma mère, **Sylvie** avec ta patience légendaire dont j'ai hérité et mon père, **François** pour m'avoir transmis le gout du savoir. Et surtout merci (ou pas) à vous deux de m'avoir transmis ma taille de 1m50, ce ne fut pas toujours facile, mais ça a beaucoup forgé mon caractère.
Merci à mon frère **Vincent**, le premier Docteur de la maison. Merci beaucoup pour m'avoir fait découvrir le métal, pour m'avoir initié à la belote et aux jeux vidéo. Cela m'a suffisamment marqué pour qu'aujourd'hui encore je sois fan des trois. Nos parties en famille et ta capacité à nous faire découvrir de nouveau jeux ont été des bouffées d'air frais durant cette rédaction de thèse.
Merci à mes grands-parents, sans qui mes parents n'auraient pas été là et donc moi non plus. Un énorme merci à ma grand-mère **Gisèle** et à mon grand-père **Michel**. Vous m'avez en partie élevé, j'ai beaucoup de souvenirs avec vous et je vous en serais éternellement reconnaissant. Merci mamie pour tout ce que tu as fait, pour m'avoir emmené à l'école et pour m'avoir appris tant de choses sur les plantes. Promis je vais me remettre au sport et essayé de maigrir un peu. Papy merci pour toutes les leçons de vie que tu m'as donnée. Vous n'avez pas toujours eu une vie facile, mais vous avez toujours été très gentil et attentionné avec nous et pour ça merci infiniment.
J'ai aussi une tendre pensée pour mon autre grand-mère, qui s'appelait également **Gisèle,** pourquoi s'embêter ? Tu es décédée en mars dernier. Ce fut un moment très pénible et je regrette profondément que tu n'aies pas pu assister à la thèse ou du moins à l'annonce de la thèse et du résultat. J'espère que de là où tu es tu as pu retrouver papy et tonton Joël et que vous êtes heureux. Ton rire, ton sens de la dérision et ton humour resteront graver dans ma mémoire.

Un petit merci pour mes beaux-parents, **Sylvie** et **Didier Blanchard**. Vous avez une fille magnifique et merci de m'avoir accepté dans votre famille. Merci pour les vacances passées chez vous et pour tout ce que vous avez pu faire.

Maintenant le plus gros morceau. Un énorme, mais énorme merci à ma petite amie **Justine**. Cela fait plus de 8 ans que l'on est ensemble, tu es mon rayon de soleil, mon petit chaton à moi. Je te remercie pour m'avoir soutenu durant toutes mes études et pour avoir été présente dans les moments difficiles. On n'a pas toujours vécu des moments faciles, surtout depuis le COVID, mais on sera toujours là l'un pour l'autre. Je t'aime et je t'aimerai toujours. Maintenant, on va partir tous les deux pour une nouvelle aventure et j'ai hâte de la passer avec toi. Merci pour ton regard « artistique » et ton écoute. Tu m'as toujours supporté et guidé durant ces années d'étude et plus particulièrement ces 4 années de thèse. Un énorme merci pour t'être également occupé du pot de thèse et de la soirée. Tu es ma lumière de Galadriel dans mes petites mains de Nain.

Un dernier merci à **Léonie**, ma petite fille d'amour. Nous t'avons adoptée juste avant le confinement. On rigole bien avec toi, entre tes miaulements ratés, tes quarts d'heure de folie et ta jalousie maladive on s'amuse bien. Tu nous as bien aidés à passer le confinement.

Table des matières

AVANT -PROPOS 6

PARTIE A : RADIOTHERAPIE ET EFFETS SECONDAIRES 10

A.1 LES CANCERS ABDOMINOPELVIENS 11
A.2 LES ORGANES A RISQUES 12
A.3 LES CONTRAINTES DE DOSE DE LA VESSIE 12

PARTIE B : ANATOMIE DE LA VESSIE 14

B.1 ANATOMIE DE LA VESSIE 15
B.1.1 GENERALITES 15
B.1.2 LE SYSTEME NERVEUX 17
B.1.3 LE SYSTEME VASCULAIRE 18
B.2 ANATOMIE DE LA PAROI DE LA VESSIE 19
B.2.1 L'UROTHELIUM 19
B.2.2 LA SOUS-MUQUEUSE 21
B.2.3 LE DETRUSOR 23
B.2.4 L'ADVENTICE ET SEROSA 24

PARTIE C : LA CYSTITE RADIQUE 26

C.1 INFORMATION SUR LA CYSTITE RADIQUE 27
C.1.1 GENERALITES 27
C.1.2 RELATION ENTRE LA PHASE AIGUË ET LA PHASE CHRONIQUE DE LA CYSTITE 28
C.1.3 ÉCHELLE DE NOTATION 28
C.1.4 ÉTIOLOGIE ET INCIDENCE 32
C.2 : TRAITEMENT DE LA CYSTITE RADIQUE CHRONIQUE 35
C.2.1 PRISE EN CHARGE DE LA CYSTITE RADIQUE CHRONIQUE 35
C.2.2 TRAITEMENT DE LA CYSTITE RADIQUE CHRONIQUE A PREDOMINANCE INFLAMMATOIRE 36
C.2.3 TRAITEMENT DE LA CYSTITE RADIQUE CHRONIQUE A PREDOMINANCE HEMORRAGIQUE 37
C.3 MODELE PRECLINIQUES ET MECANISMES MOLECULAIRES DE LA CYSTITE RADIQUE 42
C.3.1 CYSTITE RADIQUE PHASE AIGUË 43
C.3.2 CYSTITE RADIQUE CHRONIQUE 50

C.4 LA CYSTITE INTERSTITIELLE ET HEMORRAGIQUE : DEUX CYSTITES AUX MECANISMES SIMILAIRES A LA CRC : POTENTIELLE EXPLICATION SUR LE FONCTIONNEMENT DE LA CRC **73**
C.4.1 LES ATTEINTES DE L'UROTHELIUM 74
C.4.2 L'INFLAMMATION ET LA NEUROINFLAMMATION 75
C.4.3 LA REPONSE VASCULAIRE 77
C.4.4 LA FIBROSE 78

PARTIE D : APPLICATION CLINIQUE DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES AU TRAITEMENT DES CYSTITES **84**

D.1 : GENERALITES. **85**
D.2 : LES DIFFERENTS TYPES DE CELLULES SOUCHES **88**
D.2.1 LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES 88
D.2.2 LES CELLULES INDUITES A LA PLURIPOTENCE IPSC 88
D.2.3 LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES 88
D.2.4 INTERET DE L'UTILISATION DES CSM EN CLINIQUE 89
D.3 : ORIGINE ET CARACTERISATION DES CSM **89**
D.4 : UTILISATION DES CSM EN THERAPIE CELLULAIRE **91**
D.4.1 ESSAIS CLINIQUES 91
D.4.2 PATHOLOGIES DE LA VESSIE 92
D.5 MECANISMES D'ACTION DES CSM **98**
D.6 MECANISMES D'ACTION DES CSM DANS LES CYSTITES **101**
D.6.1 APOPTOSE, STRESS OXYDATIF ET HYPOXIE DANS LA VESSIE 102
D.6.2 UROTHELIUM 104
D.6.3 COMPARTIMENT VASCULAIRE 106
D.6.4 L'INFLAMMATION 109
D.6.5 NEUROINFLAMMATION 111
D.6.6 FIBROSE 114
D.6.7 CONCLUSION 115
D.7 IDENTIFICATION DES MECANISMES ET EFFECTEURS PERMETTANT L'ACTION DES CSM SUR LA CRC **116**

PROBLEMATIQUE & OBJECTIFS **120**

RESULTATS **122**

I ARTICLE DE THESE **123**
II RESULTATS COMPLEMENTAIRES **145**
II.1 INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES SUR LES CONDITIONS EXPERIMENTALES 145

II.2 Resultats complementaires de l'analyse de l'uroplakine III 146

II.3 Etudes histologiques 149

II.4 Étude transcriptomique 153

DISCUSSION 158

I Apport du modele d'irradiation par rapport a la litterature 158
I.1 Configuration d'irradiation 158

I.2 Justification du modele animal utilise pour la CRC 159

I.3 Les limites de notre modele 160

I.4 Le choix de la dose 161

I.5 Le choix de la cinetique 162

I. 6 Les parametres analyses 167

II Caracterisation de la cystite radique chronique dans notre modele d'etude 167
II.1 L'hematurie, un marqueur de la cystite radique chronique 167

II.2 L'urothelium, un acteur majeur de l'apparition de la cystite radique chronique. 168

II.3 Inflammation 169

II.4 Mise en place de la fibrose lors de la CRC 170

II.5 Conclusion sur notre modele de cystite radique chronique 171

III Effet des CSM sur la cystite radique chronique 171
III.1 Reduction des lesions de l'urothelium apres traitement par les CSM. 172

III.2 Influence du traitement par les CSM sur l'inflammation lors de la CRC 174

III.3 Influence du traitement par les CSM sur la neuroinflammation lors de la CRC 175

III.4 CSM et fibrose vesicale 176

PERSPECTIVES 178

I Cinetique d'injection 178
II La methode d'injection 179
III Implantation des CSM dans le tissu irradie. 180
IV Cotraitement 180
V Les CSM d'origine adipeux, la meilleure source des CSM ? 181
VI Traitements innovants de la CRC 182
VII Traitement lors des premiers stades de la CRC 182
VIII Traitement lors des stades avances de la CRC 184

BIBLIOGRAPHIE 186

ANNEXES 215

ANNEXE 1: CHRONIC INFLAMMATION AND RADIATION-INDUCED CYSTITIS: MOLECULAR BACKGROUND AND THERAPEUTIC PERSPECTIVES **216**
ANNEXE 2: HGF AND TSG-6 RELEASED BY MESENCHYMAL STEM CELLS ATTENUATE COLON RADIATION-INDUCED FIBROSIS **238**
ANNEXE 3: UNDERSTANDING MOLECULAR MECHANISMS AND IDENTIFYING KEY PROCESSES IN CHRONIC RADIATION CYSTITIS **260**
ANNEXE 4: MOLECULAR MECHANISMS AND KEY PROCESSES OF CYSTITIS **284**

Table des figures

Figure 1 : Incidence des cas de cancers en fonction de leurs fréquences. Seuls les 10 cancers les plus fréquents sont représentés.. 11
Figure 2 : Contraintes de dose dans la vessie en radiothérapie conformationnelle en fonction du pourcentage de la vessie entière exposée. 13
Figure 3 : Anatomie de la vessie. 16
Figure 4 : Schéma de l'innervation de la vessie et des récepteurs spécifiques des différentes fibres nerveuses. 17
Figure 5 : Représentation de la vascularisation de la vessie. 19
Figure 6 : Les symptômes de la CRC sont fonction de la dose et de la surface de la vessie irradiée. 32
Figure 7: Pourcentage de cystite radique en fonction de l'organe irradié sur 5 ans. 34
Figure 8 : Arbre décisionnel de la prise en charge de la Cystite radique chronique et ses traitements. 41
Figure 9 : Anomalies dans la régénération de l'urothélium et perte d'imperméabilité. 52
Figure 10 : Principales fonctions de l'endothélium vasculaire et des lésions après irradiation. 54
Figure 11 : Initiation, progression et installation de la fibrose radio-induite 60
Figure 12 : Mécanisme mis en place dans la CRC 63
Figure 13 : Schéma de l'amplification de la réponse dans la CRC 64
Figure 14 : Schéma récapitulatif des principales atteintes dans la cystite interstitielle (CI), dans la cystite hémorragique et dans la cystite radique chronique. 82
Figure 15 : Schéma représentant les mécanismes spécifiques à la CRC (en noir), communs avec la cystite interstitielle et/ou la cystite hémorragique (en bleu) et les mécanismes potentiels en se basant sur la CI et la CH (en rouge) 83

Figure 16 : Représentation de la division asymétrique des cellules souches comparée aux autres types cellulaires 85
Figure 17 : Représentation de l'évolution des différentes cellules souches dans l'organisme en fonction du temps et leurs devenirs 87
Figure 18 : Sources principales des CSM 90
Figure 19 : Caractérisation des cellules souches 91
Figure 20 : Nombre d'essais cliniques en fonctions des phases des études 92
Figure 21 : Ensemble des effets des CSM sur l'apoptose, l'inflammation, la régénération, la vascularisation et la fibrose. 101
Figure 22: Effet des CSM sur l'apoptose, le stress oxydatif et l'hypoxie. 104
Figure 23 : Effet des CSM sur la régénération de l'urothélium. 106
Figure 24: Effet des CSM sur le compartiment vasculaire. 109
Figure 25 : Effet des CSM sur l'inflammation. 111
Figure 26 : Effet des CSM sur la neuroinflammation. 113
Figure 27 : Effet des CSM sur la fibrose. 115
Figure 28 : Schéma synthèse des effecteurs possibles des CSM dans la CRC 119
Figure 29 : Évolution des grades d'uroplakine III en fonction du temps (à 6 et 8 mois) et des groupes (non irradiés, irradiés non traités et irradiés traités). 148
Figure 30 : Analyse des plaques de fibrose en fonction de la dose et du temps post-irradiation 151
Figure 31 : Ratio du nombre de mastocytes par unité de surface à 12 mois pour la dose de 40 Gy. 153
Figure 32 : Étude transcriptomique des gènes liés à l'inflammation, la régénération et à la fibrose 157

Table des tableaux

Tableau 1 : Organes à risque en fonction de l'organe de la sphère abdomino-pelvienne traité par radiothérapie 12
Tableau 2 : Système de grading de la CRC 30
Tableau 3 : Tableau répertoriant le pourcentage de cystite radique hémorragique 5 ans après une radiothérapie du cancer de la prostate. 33
Tableau 4 : Grades des traitements de la CRC. 36
Tableau 5 : Liste des études pré-cliniques de la cystite radique aiguë 45
Tableau 6 : Liste des études précliniques sur la cystite radique chronique 65
Tableau 7 : Principales caractéristiques de chaque cystite 73
Tableau 8 : Tableau synthétisant les données principales sur chaque étude en fonction des mécanismes 80
Tableau 9 : Liste des essais clinique avec les principaux critères d'étude des effets des CSM sur la vessie. 94
Tableau 10 : Liste des essais précliniques avec les principaux critères d'étude des effets des CSM sur la vessie 97
Tableau 11 : Récapitulatif des conditions, du nombre d'animaux et des expériences réalisées 145
Tableau 12 : Récapitulatif des amorces utilisées pour la qPCR 155
Tableau 13: Observation des lésions en fonction de la phase de la CRC dans la littérature 163
Tableau 14: Observation détaillée des différentes phases de la cystite radique en fonction des études 164
Tableau 15: Observation des lésions en fonction de la phase de la CRC dans notre étude .. 166

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
3D-CRT	Three-Dimensional Conformal Radiation Therapy
8-OHdG	8-hydroxyguanosine
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ANG-1	Angiopoietin
APF	Anti Proliferating Factor
ATP	Adénosine TriphosPhorique
Bax	Bcl-2–associated X
Bcl	B-cell lymphoma/leukemia
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra Large
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMP-7	Bone Morphogenetic Protein 7
BT	Brachythérapie
Card	Caspase Recruitment Domain Family Member
CAT	Catalase
CD	Cluster of Differentiation
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CH	Cystite Hémorragique
CHL3L1	Chitinase-3-like protein
CI	Cystite Interstitielle
c-Myc	v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
COX	Cyclooxygénase
CRC	Cystite Radique Chronique
CSM	Cellule Souche Mésenchymateuse
CTACE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
CTACK	CC chemokine, cutaneous T cell-attracting chemokine
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CTV	Clinical Target Volume
DLP	Deep Lamina propria
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EBRT	External Beam Radiation Therapy
E-cad	E-cadherine
ECBU	Examen CytoBactériologique des Urines
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
EndoMT	Endothelial Mesenchymal Transition
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer

ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanate
GAG	GlycoAminoGlycane
GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GMPc	Guanosine MonoPhosphate cyclique
GPCR	G Protein-Coupled Receptors
GPx	Glutathione Peroxidase
GS	Glutathione Synthetase
GSH	reduced Glutathione
GSK	Glycogen Synthase Kinase 3
Gy	Gray
HB-EGF	Heparin-Binding EGF-like Growth Factor
hBMP	human Bone Morphogenetic Protein
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HLA	Human Leucocyte Antigen
HO-1	Hème Oxygénase
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
IDO	Indoleamine-pyrrole 2,3-DiOxygenase
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukine
IMAT	Intensity Modulated Arc Therapy
IMRT	Intensity-Modulated RadioTherapy
INCa	Institut National du Cancer
INF-γ	Interféron gamma
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
iPSc	induced Pluripotent Stem cells
ISCT	International Society for Cellular Therapy
IVG	Interruption volontaire de Grossesse
JAK	Just Another Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinases
Klf4	Kruppel-like factor 4
KRT	Keratin
LENT	Late Effects of Normal Tissues
LINAC	LInear ACCelerator
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MCP	Monocyte-Chemotactic Protein
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MEC	Matrice ExtraCellulaire
miARN	micro Acide RiboNucléique
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MMP	Matrix MetalloProteinases

mpCCL2	MMP processed CCL2
MTI	Médicament de Thérapies Innovantes
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
NGF	Nerve Growth Factor
nNOS	neuronal Nitric Oxide Synthase
NO	Nitrogen Oxide
NOS	Nitric Oxide Synthases
NOX	NADPH OXydase
NPY	Neuro Peptide Y
NQO-1	NAD(P)H déshydrogénase quinone
NRF	Nuclear Respiratory Factor
OAR	Organe A Risque
Oct3/4	Octamer-binding transcription factor 3 et 4
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PAS	Periodic Acid Shiff
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptors
PGE-2	ProstaGlandine E-2
PGP	p-GlycoProtein related
PI3K	PhosphoInositide 3-Kinase
PIG2	Prostacycline
PIGF	Placental Growth Factor
PLC	Phospholipase C
POMS	Proopiomélanocortine
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
Ptc-1	Protein patched homolog
RCMI	Radiothérapie Conformationnelle avec Modulation d'Intensité
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
SARRP	Small Animal Radiation Research Platform
SASP	Senescence Associated Secretory Phenotype
SCF	Stem Cell Factor
SCGF	Stem Cell Growth Factor
SDF-1	Stromal cell-Derived Factor 1
SFRO	Société Française de Radiothérapie Oncologique
Shh	Sonic hedgehog
SIRT	Sirtuine
SMAD	Mothers against decapentaplegic homolog
Smo	Smoothened
SOD	SuperOxydes Dismutases
SOMA	Subjective Objective Managment Analytic
Sox2	Sex determining region Y)-box 2

SP	Subtance P
SPARC	Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TGF	Transforming Growth Factor
TH	Tyrosine-Hydroxylase
Th	Lymphocyte T helper
TIE	Tyrosine kinase with Immunoglobulin and EGF homology domains
TIMP	Tissue Inhibitors of Matrix Metalloprotease
TLR	Toll-Like Receptors
TNF	Tumor Necrosis Factor-α
t-PA	tissue Plasminogen Activator
TRAIL	Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand
Trka	Tropomyosin receptor kinase A
TSG-6	Tumor necrosis factor Stimulated Gene-6
ULP	Upper Lamina Propria
Upk	Uroplakine
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VIP	Vasoactive Intestinal Peptide
VMAT	Volumetric modulated arc therapy
vWF	von Willebrand Factor
ZO-1	Zonula occludens 1
αSMA	alpha-Smooth Muscle Actin

Valorisation de la thèse

Publications à comité de lecture

Carole Helissey, Sophie Cavallero, **Clément Brossard**, Marie Dusaud, Cyrus Chargari, and Sabine François. « Chronic Inflammation and Radiation-Induced Cystitis: Molecular Background and Therapeutic Perspectives».
Cells. 2020 Dec 24;10(1). pii: cells10010021. doi: 10.3390/cells10010021

Usunier, B., **Brossard, C**., L'Homme, B., Linard, C., Benderitter, M., Milliat, F., & Chapel, A. «HGF and TSG-6 Released by Mesenchymal Stem Cells Attenuate Colon Radiation-Induced Fibrosis».
Int J Mol Sci. 2021 Feb 11;22(4). pii: ijms22041790. doi: 10.3390/ijms22041790

Brossard Clément, Lefranc Anne-Charlotte, Simon Jean-Marc, Benderitter Marc, Milliat Fabien, Chapel Alain. «Understanding Molecular Mechanisms and Identifying Key Processes in Chronic Radiation Cystitis»
Int J Mol Sci. 2022 Feb 6; 22(4). doi: 10.3390/ijms23031836

Clément Brossard, Anne-Charlotte Lefranc, Anne-Laure Pouliet, Jean-Marc Simon, Marc Benderitter, Fabien Milliat and Alain Chapel. «Molecular mechanisms and key processes of cystitis»
Biology 2022, 11 , 972. doi.org/10.3390/biology11070972

Clément Brossard, Anne-Laure Pouliet, Anne-Charlotte Lefranc, Mohamedamine Benadjaoud, Morgane Dos Santos, Christelle Demarquay, Valerie Buard, Marc Benderitter, Jean-Marc Simon, Fabien Milliat and Alain Chapel. «Mesenchymal stem cells limit vascular and epithelial damage and restore the impermeability of the urothelium in chronic radiation cystitis»
Stem Cell Research & Therapy, **Soumis**

Communications orales

8-10 juillet 2019 : **Brossard C**, Dos Santos M, Demarquay C, Buard V, Tarlet G, Squiban C, Linard C, Mathieu N, Granger R, Sache A, Denais Lalieve D, Milliat F, Chapel A
Conférence internationale sur la science cellulaire et la biologie moléculaire, Paris, france
« Cellular therapy treatment of chronic radiation cystitis in rats »

4-7 décembre 2019 : **Brossard C**, Dos Santos M, Demarquay C, Buard V, Tarlet G, Squiban C, Linard C, Mathieu N, Granger R, Sache A, Denais Lalieve D, Milliat F, Chapel A
International Federation for Adipose Therapeutics ans Science (IFATS), Marseille, France
« Cellular therapy treatment of chronic radiation cystitis in rats »

13-17 septembre 2020 : **Clément Brossard**, Anne-Charlotte Lefranc, Morgane Dos Santos, Mohamedamine Benadjaoud, Christelle Demarquay, Valérie Buard, Georges Tarlet, Claire Squiban, Christine Linard, Noëlle Mathieu, Romain Granger, Amandine Sache, Delphine Denais Lalieve, Jean-Marc Simon, Marc Benderitter, Fabien Milliat, Alain Chapel
European Radiation Research Society (ERRS), Lund, Suède (visioconférence)
« Preclinical study of Chronic radiocystitis and cell therapy treatment »

7-10 octobre 2020 : **Clément Brossard**, Anne-Charlotte Lefranc, Morgane Dos Santos, Christelle Demarquay, Valérie Buard, Georges Tarlet, Claire Squiban, Christine Linard, Noëlle Mathieu, Romain Granger, Amandine Sache, Delphine Denais Lalieve, Jean-Marc Simon, Fabien Milliat, Alain Chapel
Société Française de Radiothérapie Oncologique (SFRO), Paris, France
« Modélisation préclinique de la Cystite Radique Chronique et étude du potentiel thérapeutique d'un traitement par thérapie cellulaire »

14-18 juin 2021 : Clément Brossard, Anne-Charlotte Lefranc, Morgane Dos Santos, Christelle Demarquay, Valérie Buard, Georges Tarlet, Claire Squiban, Christine Linard, Noëlle Mathieu, Romain Granger, Amandine Sache, Delphine Denais Lalieve, Jean-Marc Simon, Fabien Milliat, Alain Chapel
Société Française de RadioProtection (SFRP), Paris, France (visioconférence)

« Traitement par thérapie cellulaire de la cystite radique chronique »

27-01 août-septembre 2021 : **Clément Brossard**, Anne-Charlotte Lefranc, Morgane Dos Santos, Mohamedamine Benadjaoud, Christelle Demarquay, Valérie Buard, Georges Tarlet, Claire Squiban, Christine Linard, Noëlle Mathieu, Romain Granger, Amandine Sache, Delphine Denais Lalieve, Jean-Marc Simon, Marc Benderitter, Fabien Milliat, Alain Chapel
European Society Radiation Oncology (ESTRO), Madrid, Espagne
« Preclinical study of chronic radiation cystitis and cell therapy treatment »

6-8 octobre 2021 : **Clément Brossard**, Anne-Charlotte Lefranc, Morgane Dos Santos, Mohamedamine Benadjaoud, Christelle Demarquay, Valérie Buard, Georges Tarlet, Claire Squiban, Christine Linard, Noëlle Mathieu, Jean-Marc Simon, Marc Benderitter, Fabien Milliat, Alain Chapel
Société Française de Radiothérapie Oncologique (SFRO), Paris, France
« Étude préclinique du traitement par thérapie cellulaire de la cystite radique chronique »

18-21 novembre 2021 : **Clément Brossard**, Anne-Charlotte Lefranc, Morgane Dos Santos, Christelle Demarquay, Valérie Buard, Georges Tarlet, Claire Squiban, Christine Linard, Noëlle Mathieu, Jean-Marc Simon, Fabien Milliat, Alain Chapel
Fédération internationale pour la thérapeutique et la science adipeuses (IFATS), Miami, USA (visioconférence)
« Adipose Mesenchymal Stem Cells treatment mitigates chronic radiation cystitis »

Communications affichées

1-4 avril 2019 : **Clément Brossard**, Alain Chapel.
Journées des thèses de l'IRSN, La Grande Motte, France
«Cellular therapy treatment of radiation cystitis ».

20-21 mai 2019 : **Clément Brossard**, Alain Chapel
Journées des thèses de l'école doctorale ED 394 : Physiologie, Physiopathologie et thérapeutique, Paris, France

« Cellular therapy treatment of radiation cystitis ».

27-28 mai 2021 : **Clément Brossard**, Anne-Charlotte Lefranc, Morgane Dos Santos, Mohamedamine Benadjaoud, Christelle Demarquay, Valérie Buard, Georges Tarlet, Claire Squiban, Christine Linard, Noëlle Mathieu, Romain Granger, Amandine Sache, Delphine Denais Lalieve, Jean-Marc Simon, Marc Benderitter, Fabien Milliat, Alain Chapel
Journées des thèses de l'école doctorale ED 394 : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique (visioconférence)
« Preclinical study of chronic radiation cystitis and cell therapy treatment ».

Formations complémentaires durant la thèse

Septembre 2019 : Expérimentation animale, éthique et bientraitance, formation générale des concepteurs de projets scientifiques (Rongeurs et Lagomorphes).

Octobre 2019 : Formation réglementaire de base en chirurgie chez le rongeur de laboratoire.

Avant -Propos

Dans le monde, le nombre de nouveaux cas de cancer est estimé à 19,3 millions et près de 10 millions de décès par cancer en 2020. En France, c'est environ 382 000 nouveaux cas de cancer et 157 400 décès en 2018. L'amélioration des diagnostics et des traitements a permis de diminuer le taux de mortalité des cancers et d'augmenter l'espérance de vie. La radiothérapie est un traitement utilisé dans environ 60% des parcours de soins, en association avec d'autres traitements. L'amélioration de la précision balistique et du détourage des tumeurs a permis de limiter l'exposition des tissus sains, mais celle-ci n'est cependant pas nulle. Des effets chroniques peuvent subvenir jusqu'à 20 ans après la radiothérapie. Ces complications peuvent parfois être létales.

La sphère abdomino-pelvienne comprend environ 25% de tous les cancers incluant principalement les cancers du côlon-rectum, de la prostate, du col de l'utérus et de la vessie. Chez l'homme, le cancer de la prostate représente 25% des nouveaux cas de cancer en 2018 pour la France. Dans l'ensemble des cancers pelviens, la vessie est un organe à risque en raison de sa position centrale dans cette région et de sa proximité avec la prostate, le col de l'utérus et le côlon. L'irradiation de la vessie peut engendrer, dans 5 à 10% des cas, une cystite radique chronique. Pour une irradiation d'une tumeur de la prostate, cela peut atteindre presque 20% des cas suivant le type d'irradiation. Cette particularité est due à la position particulière de la prostate qui entoure la partie inférieure de la vessie. En clinique, la cystite radique chronique se caractérise par des incontinences, des douleurs et des hématuries et au niveau tissulaire par un dénudement ou une hyperplasie de l'épithélium vésical accompagnée d'anomalies cellulaires (cellules apoptotiques, bi-nuclées, vacuolisations), de télangiectasies et de la fibrose.

La difficulté de la prise en charge des complications des radiothérapies abdomino-pelviennes est illustrée par l'accident d'irradiation d'Épinal. Entre 2001 et 2006, plus de 400 patients ont reçu une dose plus élevée d'irradiation de 10 à 20% lors du traitement de cancers de la prostate au centre hospitalier d'Épinal induisant des cystites et des rectites radiques. Dans certains cas, ces lésions ont nécessité des chirurgies lourdes comme des cystectomies impactant la qualité de vie des patients.

Pour 4 patients issus de l'accident d'Epinal réfractaires aux traitements conventionnels, un essai compassionnel a été mené au moyen d'une thérapie cellulaire à base de Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM). L'injection de ces cellules en intraveineuse a permis d'améliorer durablement les cystites et rectites radiques.

Les CSM sont des cellules multipotentes adultes pouvant être extraites à partir de moelle osseuse ou du tissu adipeux. Ces cellules ont de nombreux rôles, dont le soutien de l'hématopoïèse, le maintien de l'homéostasie tissulaire, la modulation de la réponse inflammatoire et la régénération des tissus. Les CSM ont été utilisées avec succès dans les pathologies du système immunitaire, comme la maladie du greffon contre l'hôte ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Pour la pathologie de la Cystite Radique Chronique (CRC), le nombre d'études précliniques est faible et à notre connaissance il n'existe pas d'étude préclinique utilisant les CSM. Notre objectif est double :

1. Créer un modèle de CRC chez le rat avec des lésions similaires à l'homme. La plateforme SARRP (Small Animal Radiation Research Platform) est utilisée pour une irradiation précise de la vessie en limitant l'exposition des tissus environnants.
2. Evaluer l'efficacité et l'innocuité du traitement par les CSM. L'injection des CSM avant la phase chronique a été retenue afin de potentialiser leurs effets. La caractérisation du modèle ainsi que l'évaluation de l'efficacité des CSM ont été principalement réalisées sur l'épithélium vésical et les lésions vasculaires, deux points cruciaux de la CRC.

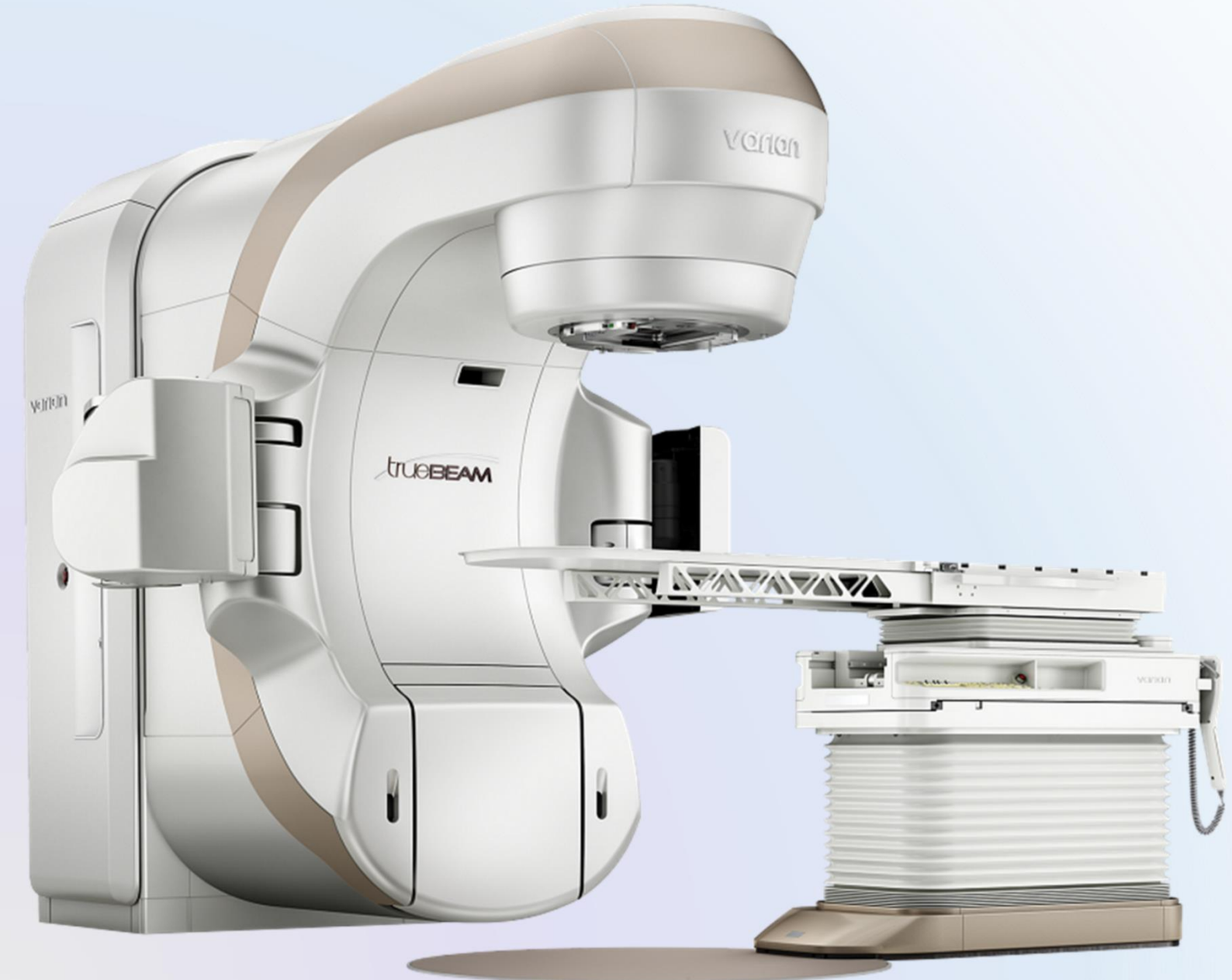
Nous avons montré que les CSM permettent de diminuer les atteintes de l'épithélium et sont également en faveurs d'une diminution des lésions vasculaires.

Les résultats sont les premiers éléments en faveur d'une action des CSM pour limiter la progression de la CRC. Cependant l'étude des mécanismes nécessite d'être approfondie.

THE WHITES
THE PLAN
TRIANGLE
KILLERS
James Branch Cabell
Murder Most Irish
ALFRED HITCHCOCK
MURDER THE CHRISTMAS

État de l’art

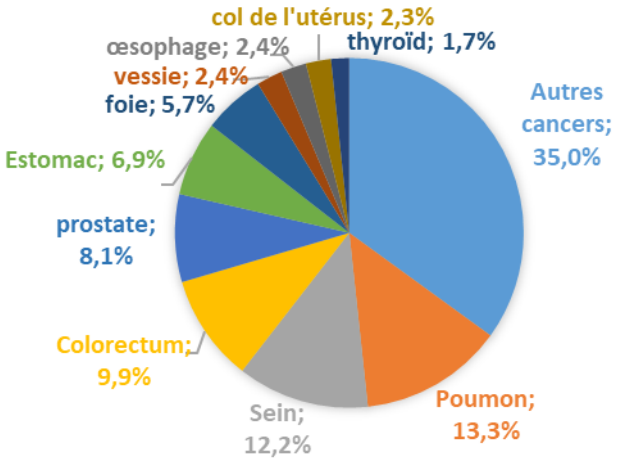
Partie A : Radiothérapie et effets secondaires



A.1 Les cancers abdominopelviens

Le nombre de nouveaux cas de cancer au niveau mondial est estimé à 19,3 millions avec 10 millions de décès par cancer en 2020. Les cancers abdomino-pelviens représentent environ 25 %. Parmi les cancers de la zone pelvienne, les cancers colorectaux représentent 10%, le cancer de la prostate 7,3%, le cancer du col de l'utérus 3,1%, les cancers de la vessie 3% (Sung et al. 2021), voir figure 1.

A Incidence des cancers en 2014



B Incidence des cancers en 2020

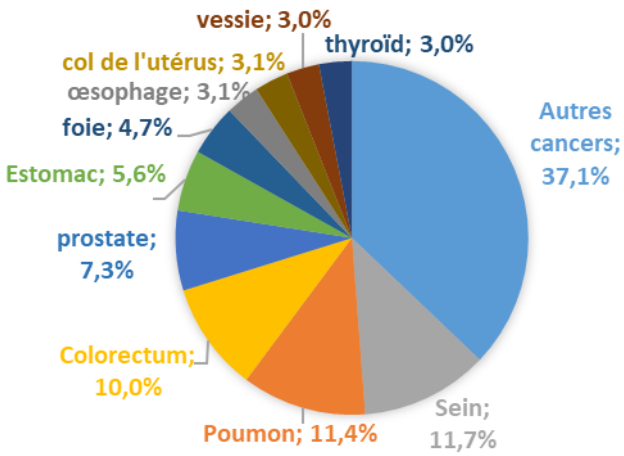


Figure 1 : Incidence des cas de cancers en fonction de leurs fréquences. Seuls les 10 cancers les plus fréquents sont représentés. A : Fréquence des incidences en 2014. B : Fréquence des incidences en 2020. Chiffres issus de Globocan (The Global Cancer Observatory: International Agency for Research on Cancer: World Health Organization 2020 (Globocan). Number of new cases in 2020 November 2020).

L'incidence des cancers augmente, ainsi en 2014 le nombre de nouveaux cancers était estimé à 14,1 millions contre 19,3 millions actuellement. La radiothérapie externe est utilisée dans plus de 60% des traitements tous cancers confondus en 2019 selon l'INCa (Institut National du Cancer) (INCA Février 2019). L'objectif de la radiothérapie est d'éliminer la tumeur tout en préservant les organes sains environnants. Le risque pour un organe dépend de sa sensibilité à l'irradiation, de la dose et du volume exposé (en fonction de la proximité de la tumeur ciblée, de la délimitation de la tumeur), du fractionnement prescrit et du type et de l'énergie de l'irradiation utilisée (photon, neutron, électron, proton, carbone, etc.).

A.2 Les organes à risques

Les organes à risque (OAR) sont les tissus /organes sains à proximité du volume cible clinique (CTV pour Clinical Target Volume) dont l'irradiation peut induire des effets tissulaires néfastes majeurs. La tolérance aux rayonnements ionisants des organes à risque (contraintes de dose), qui dépend de la radiosensibilité et du volume, est l'un des principaux facteurs limitant le choix de la dose de radiothérapie. Le rapport thérapeutique est défini comme la relation entre la probabilité d'éradiquer la maladie néoplasique, dépendant de la dose de radiothérapie, et de la sensibilité des OAR, dépendant des contraintes de dose. Dans les irradiations pelviennes, la vessie est un organe à risque. La vessie a une architecture en parallèle. Elle est constituée de plusieurs sous-unités fonctionnelles plus ou moins indépendantes les unes des autres. Pour induire la perte de fonctionnalité de l'organe, il faut une irradiation sur une large zone de l'organe. La problématique des lésions tardives des organes à risque notamment de la vessie est un enjeu de santé majeur (voir tableau 1).

Tableau 1 : Organes à risque en fonction de l'organe de la sphère abdomino-pelvienne traité par radiothérapie (Source : Institut National du Cancer - Les cancers en France - édition 2015)

Organe traité par radiothérapie	Organe à risque
Rectum	Intestin grêle
Canal anal	Intestin grêle, **vessie,** vulve, grandes lèvres
Col de l'utérus	Rectum, **vessie,** canal anal, intestin grêle, côlon sigmoïde, vagin
Endomètre	Rectum, **vessie**, canal anal, intestin grêle, côlon sigmoïde, vagin
Vulve	Rectum, **vessie**, urètre, canal anal, intestin grêle, côlon sigmoïde
Prostate	Rectum, **vessie**, canal anal
Vessie	Rectum, canal anal, intestin grêle, côlon sigmoïde
Testicule	Moelle épinière, rein, estomac, intestin grêle, côlon

A.3 Les contraintes de dose de la vessie

Le taux de complication à long terme est influencé par trois éléments clés du protocole d'irradiation :

1. La zone de la vessie exposée, le trigone (partie inférieure de la vessie) est plus radiosensible que le dôme (partie supérieure de la vessie).

2. Le débit de dose. Un débit inférieur à 0,8 Gy/h réduit le risque de cystite radique. Des doses supérieures à 2 Gy par fraction augmentent le risque de séquelles.

3. Il est estimé que pour un volume de la vessie irradié <5% la dose maximale est de 74 Gy, 70Gy pour un volume <20%, 65 Gy pour un volume <25% et 40-60 Gy pour un volume <50% (voir figure 2).

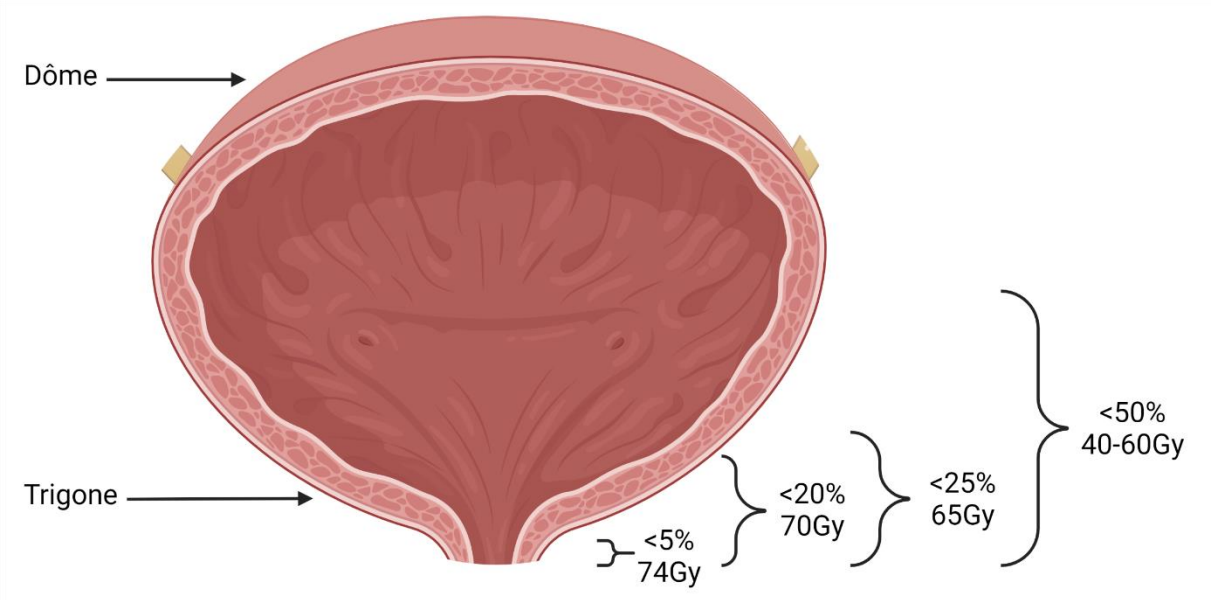
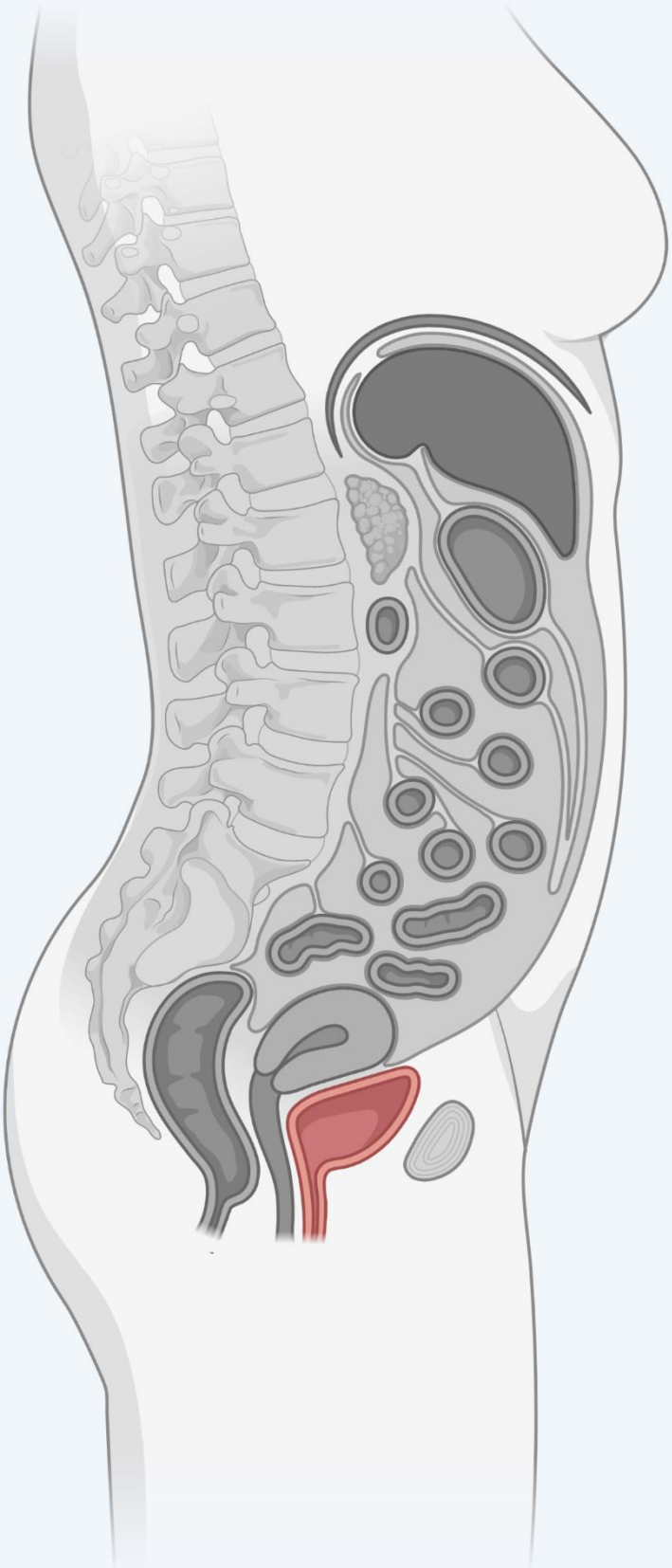
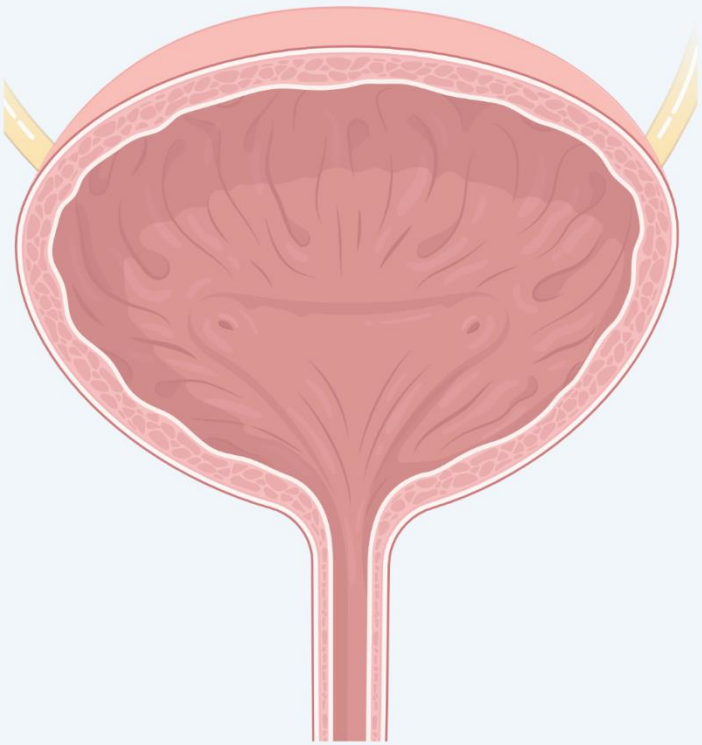


Figure 2 : Contraintes de dose dans la vessie en radiothérapie conformationnelle en fonction du pourcentage de la vessie entière exposée.

Partie B : Anatomie de la vessie





B.1 Anatomie de la vessie

B.1.1 Généralités

La vessie est un organe creux aux parois distensibles, qui lui permet de stocker jusqu'à 300-400 ml d'urine. L'expulsion de l'urine est assurée par la contraction des muscles de la vessie, structure musculaire appelée détrusor, qui se contracte pendant la miction, avec une relaxation concomitante des sphincters.

La vessie se compose de trois parties externes : le dôme, le corps et le trigone. Le dôme est la partie crâniale, pointant vers le haut et la symphyse pubienne. Il est relié à l'ombilic par le ligament ombilical médian. Le corps de la vessie est la partie principale. Le trigone est situé en position caudale. Contrairement au reste de la vessie interne, le trigone a des parois lisses, ceci s'explique par l'origine embryologique différente. Il s'agit d'un tissu d'origine wolffienne donc du mésoderme intermédiaire, contrairement au reste de la vessie qui dérive du sinus uro-génital issu de l'endoderme. Il existe deux sphincters musculaires situés dans l'urètre. Le sphincter urétral interne, qui chez l'homme se compose de fibres lisses circulaires, qui sont sous contrôle autonome. Il empêche la régurgitation séminale pendant l'éjaculation. Chez la femme, il s'agit d'un sphincter fonctionnel (c'est-à-dire sans muscle sphinctérien). Il est formé par l'anatomie du col de la vessie et de l'urètre proximal. Le second sphincter est le sphincter urétral externe qui a la même structure chez les deux sexes. C'est un muscle squelettique sous contrôle volontaire. Cependant, chez les hommes, le mécanisme du sphincter externe est plus complexe, car il est en corrélation avec les fibres du muscle recto-urétral et du muscle releveur de l'anus.

Depuis l'intérieur vers l'extérieur de la vessie, la paroi de la vessie est composée de l'urothélium, la lamina propria, les cellules musculaires (ou détrusor) et l'adventice/serosa (figure 3).

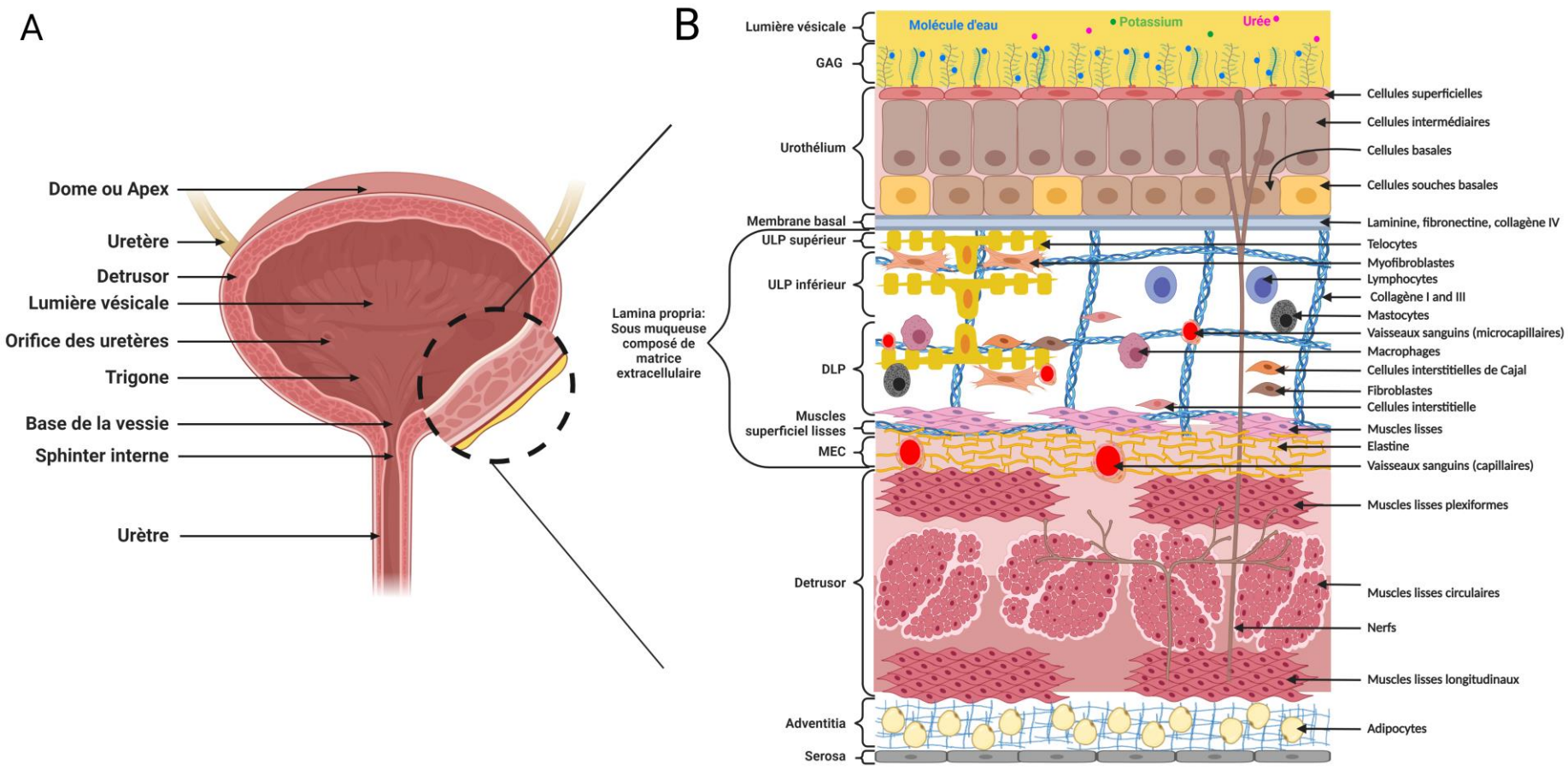


Figure 3 : Anatomie de la vessie. **A :** Anatomie extérieure de la vessie. **B :** Anatomie de la paroi de la vessie

B.1.2 Le système nerveux

La vessie reçoit des informations du système nerveux sympathique, parasympathique et somatique. Le système nerveux autonome sympathique provoque la relaxation du détrusor. Le système nerveux autonome parasympathique, favorise la contraction du détrusor. Le système nerveux somatique permet un contrôle volontaire de la miction (figure 4).

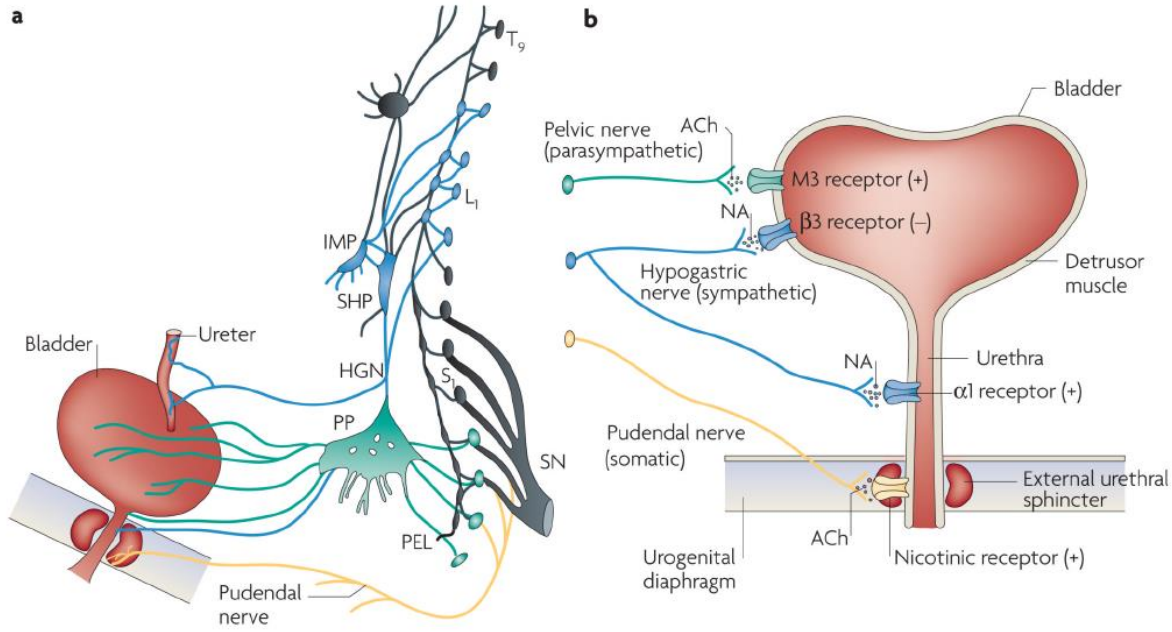


Figure 4 : Schéma de l'innervation de la vessie et des récepteurs spécifiques des différentes fibres nerveuses. **A :** Innervation externe de la vessie. En bleu sont représentées les fibres sympathiques, en vert les fibres parasympathiques et en jaune les fibres somatiques. **B :** Voies efférentes et mécanismes de neurotransmetteurs qui régulent les voies urinaires inférieures. Figure issue de l'article de Fowler et al., de 2008 (Fowler et al. 2008).

Durant la phase de remplissage, les nerfs sympathiques empêchent les nerfs parasympathiques de déclencher des contractions de la vessie. Les nerfs sympathiques induisent la relaxation et donc l'expansion du détrusor ainsi que la contraction du sphincter urétral interne. La distension de la vessie active le nerf pudendal par la libération de l'ATP, de l'acétylcholine et du monoxyde d'azote (Stenqvist et al. 2020). Cette stimulation entraîne une contraction du sphincter urétral externe conduisant au phénomène de continence. Lors de la phase de miction, le nerf pudendal induit le relâchement du sphincter externe. Les nerfs

parasympathiques induisent la relaxation du sphincter interne et la contraction du détrusor engendrant la miction.

L'origine des incontinences peut être très variée. Pour la CRC la fibrose induit une rigidité de la paroi de la vessie. Ainsi la distension est plus difficile et les récepteurs de cette distension s'activent pour des volumes plus faibles que la normale entrainant des urgences. De plus, la rigidité de la vessie induit une pression interne plus grande, dépassant parfois les capacités des sphincters et causant des incontinences. Une hypersensibilité des neurones est observée, causée par l'inflammation. Ceci entraine une sur-activation des fibres nerveuses pouvant engendrer des douleurs, des contractions involontaires et un relâchement incontrôlé des sphincters menant à des incontinences.

B.1.3 Le système vasculaire

Le système vasculaire de la vessie est principalement dérivé des vaisseaux iliaques internes. Chez l'homme, il est complété par l'artère vésicale inférieure et chez la femme par les artères vaginales. Le drainage veineux est assuré par le plexus veineux vésical, qui se vide dans les veines iliaques internes. Chez l'homme, le plexus vésical est en continuité, au niveau de l'espace rétropubien, avec le plexus veineux de la prostate (plexus de Santorin), qui reçoit également le sang de la veine dorsale du pénis (figure 5). Le système vasculaire pénètre profondément dans la vessie. Les plus gros vaisseaux sont localisés au niveau du détrusor et les plus petits dans la lamina propria. C'est dans cette dernière que la densité en capillaire est la plus grande. Le système lymphatique se divise en deux parties. Le trigone et le fond de l'utérus se déversent dans les ganglions iliaques internes, sacrés et communs.

A **B**

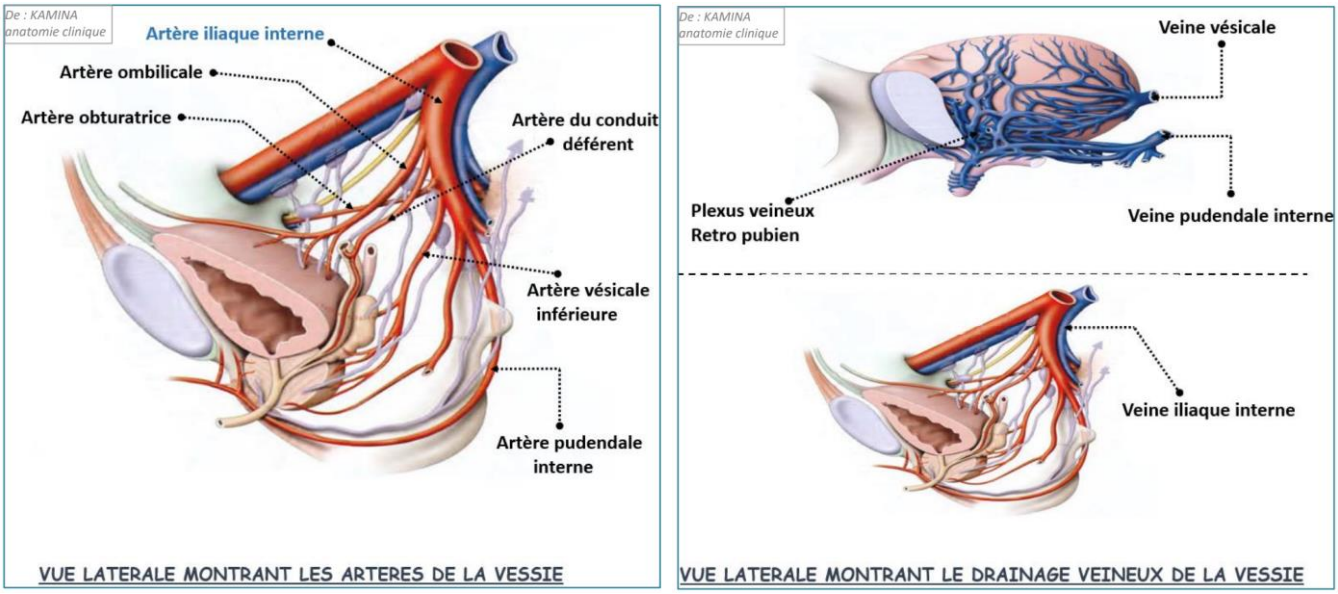


Figure 5 : Représentation de la vascularisation de la vessie. **A :** Représentation des artères. **B :** Représentation des veines. Image issue du cours de médecine sur la vessie de la faculté de médecine et de pharmacie de Marrakech. Source : http://anatomie-fmpm.uca.ma/wp-content/uploads/2020/07/la-vessie.pdf (dernière visite le 02/03/2022)

B.2 Anatomie de la paroi de la vessie

B.2.1 L'urothélium

L'urothélium forme l'interface entre l'espace urinaire et les tissus vasculaires, conjonctifs, nerveux et musculaires sous-jacents et protège ceux-ci de l'urine. L'urothélium est l'un des épithéliums à cycle le plus lent, avec un taux de renouvellement d'environ 200 jours (50 à 350 jours) (Hicks 1975; Walker 1960). L'urothélium est l'une des barrières les plus efficaces de toutes les biomembranes, avec une résistance électrique trans-épithéliale pouvant atteindre 75 000 Ω/cm^2 (Lewis 2000; Negrete et al. 1996) et d'une grande flexibilité (Hicks 1975; Minsky and Chlapowski 1978). L'urothélium est composé de 4 types cellulaires formant des couches. La première couche est composée de cellules souches et de cellules basales, une couche intermédiaire et une couche superficielle ou apicale composée de grandes cellules hexagonales (diamètres de 25 à 250 µm) appelées cellules superficielles ou "cellules parapluies" (figure 3).

Les cellules souches sont souvent confondues avec les cellules basales. Ensemble, elles forment la couche basale de l'urothélium. Contrairement aux cellules basales, les cellules souches sont KRT14 (Keratin 14) positive (Wang et al. 2017a). Ces cellules sont relativement rares dans l'urothélium. Ce sont les seules cellules qui ont la capacité de s'auto-renouveler afin de régénérer l'urothélium. En cas de blessure, celles-ci se différencient en cellules basales qui à leur tour vont se différencier en cellules intermédiaires puis superficielles. Les cellules basales sont petites (10 mm de diamètre), elles forment l'essentiel de la couche basale. L'intégrité épithéliale est maintenue grâce à un processus complexe de migration, de prolifération et de différenciation. Leur renouvellement lent et leur différentiation peuvent être influencés par des facteurs exogènes, notamment l'EGF (Epithelium Growth Factor), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR pour Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) et d'autres molécules telles que l'acide rétinoïque (Sun 2006; Varley et al. 2004a; Varley et al. 2004b). De plus, une prolifération accélérée peut se produire dans diverses atteintes de la vessie. Par exemple, lors de l'utilisation d'agents chimiques comme la cyclophosphamide qui endommagent la couche de cellules parapluies (Kreft et al. 2009a; Kreft et al. 2009b).

Les cellules intermédiaires ont une forme de « raquette ». Elles composent la deuxième couche cellulaire. Suivant les espèces, le nombre de strates de cette couche peut varier. D'une strate chez les rongeurs, elle peut aller jusqu'à 7 strates chez les mammifères supérieurs comme l'homme.

La dernière couche de cellule est composée de cellules superficielles, également appelées cellules parapluies. La surface apicale des cellules parapluies possède une membrane unitaire asymétrique (AUM) composée de protéines appelées uroplakines (Upk). Il existe 4 uroplakines différentes, uroplakine Ia (27 kDa), Ib (28 kDa), II (15 kDa) and III (47 kDa) qui forment des plaques (Lin et al. 1994; Wu and Sun 1993; Yu et al. 1994). Ces plaques recouvrent 90% de la surface des cellules parapluies et sont de formes hexagonales. Ces uroplakines, et particulièrement Upk III, possèdent des parties transmembranaires permettant de les ancrer dans la cellule. Ces uroplakines forment 2 hétérodimères, UPIa/II et UP1b/UPKIII combiné en un hétérotétramère. Cet hétérotétramère assure l'étanchéité de la

vessie. Les uroplakines sont mises en évidence dans des vésicules intracellulaires. Elles permettent d'assurer l'étanchéité de la vessie malgré l'augmentation de la surface (Wu et al. 2009). En plus des uroplakines, les cellules superficielles sont riches en jonctions serrées, localisées entre les cellules superficielles. Elles sont composées principalement d'occludines, de claudines, d'E-cadhérine et de Zonula occludens-I (ZO-1). Les cellules superficielles sont également recouvertes d'une couche de glycosaminoglycanes (GAG). Ces GAG sont composés d'acide hyaluronique, sulfate d'héparane et l'héparine, le sulfate de chondroïtine, le sulfate de dermatane et le sulfate de kératane. L'ensemble de ces protéines permet d'assurer le rôle d'imperméabilité de l'urothélium (Hurst 1994).

B.2.2 La sous-muqueuse

Sous l'urothélium se trouve la lamina propria qui est subdivisée en deux parties. La lamina propria supérieure (ULP pour Upper Lamina Propria), juste en dessous de l'urothélium, et la lamina propria profonde (DLP pour Deep Lamina Propria) entre l'ULP et le détrusor (voir figure 6). La lamina propria est composée d'une large zone de matrice extracellulaire (MEC) composée principalement de collagène de type I et III. La lamina propria contient plusieurs types de cellules comme les cellules interstitielles, les cellules interstitielles de Cajal, les cellules immunitaires, les fibroblastes, les myofibroblastes et les télocytes.

Les fibroblastes peuvent jouer un rôle dans la production de la MEC et dans l'intégrité structurelle. La MEC assure l'élasticité de la vessie pendant l'expansion et la contraction. La lamina propria est très riche en vaisseaux sanguins et en canaux lymphatiques. Son épaisseur varie en fonction du volume de la vessie. Sa répartition est homogène dans le tissu, ce qui la rend plus fine lorsque la vessie est dilatée et plus épaisse quand elle est en vide. La lamina à un rôle essentiel dans le fonctionnement de la vessie. Elle permet d'assurer l'élasticité lors de ces contractions et dilatations, permettant de conserver la forme et la fonction de la vessie (Aitken and Bagli 2009; Dixon and Gosling 1983; Heppner et al. 2011; Paner et al. 2007; Paner et al. 2009).

Les télocytes fournissent un support mécanique dans différents organes (intestin, vessie), organisent la matrice extracellulaire (MEC) et retiennent les différentes cellules interstitielles grâce à leur maillage 3D. Les télocytes participent à la communication intercellulaire par leur contact hétérocellulaire (capables, dans le cas de la vessie, de servir d'intermédiaires dans la propagation des stimuli chimiques et électriques). Les télocytes sont impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules souches (Shoshkes-Carmel et al. 2018; Vannucchi et al. 2016).

Dans des conditions normales, les myofibroblastes sont absents des tissus sains, hormis dans la vessie. Dans la vessie humaine, les myofibroblastes sont présents dans la lamina propria supérieure (ULP) où ils forment un réseau, probablement en association avec les télocytes (Chapple 2014; Fry and Vahabi 2016; Roosen et al. 2009; Vannucchi and Faussone-Pellegrini 2016; Wiseman et al. 2003). Ce réseau de myofibroblastes pourrait faire partie d'un système local, incluant l'urothélium et les terminaisons nerveuses, et serait responsable de la production, du traitement et de l'envoi d'informations (Chapple 2014; Fry and Vahabi 2016).

Les télocytes de la vessie ont des fonctions différentes selon leur localisation. On distingue deux types de télocytes. Les télocytes de la lamina propria supérieure (ULP) et ceux de la lamina profonde (DLP) et du détrusor (Vannucchi et al. 2014; Vannucchi and Traini 2018). Les télocytes de l'ULP sont PDGFRα (Platelet-Derived Growth Factor Receptors) positifs et CD34 (Cluster of Differentiation) négatifs. Il est possible de considérer deux sous-parties de l'ULP. La première partie située immédiatement sous l'urothélium (appelée ULP supérieure) forme un réseau homocellulaire et est αSMA négative. La seconde partie de l'ULP située sous l'ULP supérieure (notée ULP inférieure) ou les télocytes sont αSMA (alpha-Smooth Muscle Actin) positifs (Gevaert et al. 2012). Les télocytes sub-urothéliaux pourraient avoir un rôle dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules souches basales (comme dans l'intestin), (Shoshkes-Carmel et al. 2018).

Les télocytes de la DLP sont CD34 positifs et PDGFRα négatifs. Au microscope électronique à transmission, ces télocytes présentent un corps plus grand et des processus cellulaires avec des plaques d'attachement au tissu conjonctif comme les fibronex. En outre,

ces télocytes établissent de vastes régions d'apposition simple avec les myofibroblastes, formant un réseau mixte en 3 dimensions.

Le réseau télocytes/myofibroblastes garantit l'intégrité de l'organe pendant la distension et la relaxation (Cretoiu and Popescu 2014; Vannucchi et al. 2014; Vannucchi et al. 2016; Vannucchi and Traini 2018) grâce à des jonctions lacunaires qui sont proches des varicosités nerveuses. Ils expriment la protéine Cx43, des récepteurs vanilloïdes, ATP, puriques et muscariniques, et contiennent du GMPc (Guanosine MonoPhosphate cyclique), la molécule cible du NO (Cretoiu D 2019). Ces caractéristiques soutiennent l'hypothèse que ces cellules aient un rôle intermédiaire dans la propagation des stimuli chimiques ou électriques générés localement, ainsi qu'un rôle de cibles pour l'activité paracrine de l'urothélium et les stimuli nerveux (Fry and Vahabi 2016; Traini et al. 2018; Vannucchi and Traini 2018). En conclusion, l'ULP, avec ses terminaisons nerveuses, ses vaisseaux, ses télocytes, ses myofibroblastes et son urothélium, constitue un système intégré qui joue un rôle essentiel dans la régulation de la fonction vésicale.

Le réseau télocytes/myofibroblastes peut également jouer un rôle important dans l'inflammation. Ce réseau peut interagir avec le système immunitaire par le biais des interactions hétérocellulaires des télocytes et des cytokines produites par les télocytes et les myofibroblastes ainsi que par l'expression de récepteurs de molécules produites par les lymphocytes (Cretoiu and Popescu 2014; Popescu et al. 2005; Vannucchi and Traini 2016).

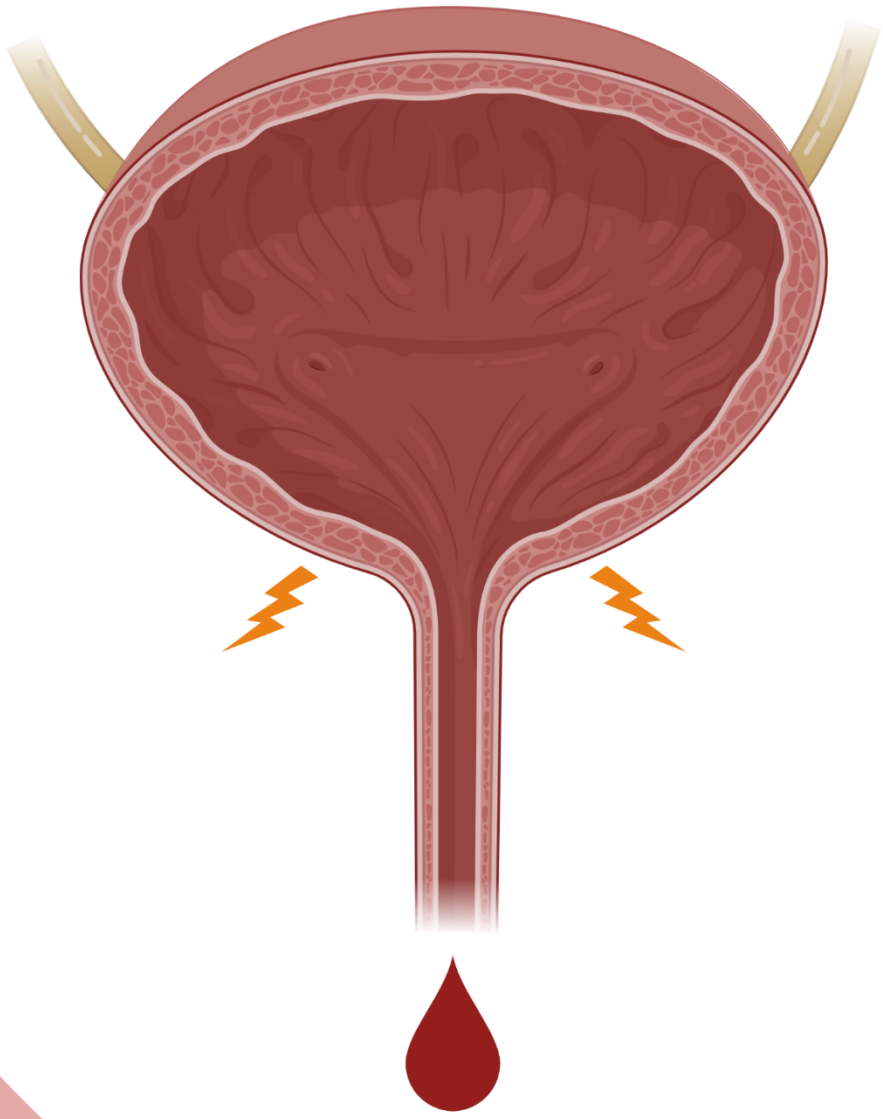
B.2.3 Le détrusor

Cette couche musculaire se compose de trois couches distinctes, de la lumière vers l'extérieur : la couche plexiforme, la couche circulaire et la couche longitudinale permettant ainsi une contraction efficace de la vessie lors des mictions. Ces fibres sont orientées dans de multiples directions, ce qui permet de conserver l'intégrité structurelle lorsqu'elles sont étirées. Elle reçoit l'innervation des systèmes nerveux sympathiques et parasympathiques. À l'extrémité inférieure de la vessie, le détrusor est en continuité avec le sphincter urétral interne. La combinaison de la contraction du détrusor et de la relaxation du sphincter urétral conduit à la miction. Une anomalie du détrusor peut conduire à une vessie hyper active ou à une rétention d'urine.

B.2.4 L'adventice et serosa

Il s'agit de la couche la plus externe de la vessie. Elle consiste en une couche superficielle de mésothélium renforcée par un tissu conjonctif fibroélastique irrégulier. Cette couche sert de protection aux tissus sous-jacents contre les infections et permet le maintien de la vessie dans l'organisme avec le ligament ombilical médian.

Partie C : La cystite radique



C.1 Information sur la Cystite radique

C.1.1 Généralités

La Cystite Radique est une complication des radiothérapies pelviennes. La vessie peut être dans le champ d'irradiation lors des radiothérapies de la prostate, du côlon ou encore du col de l'utérus. Les manifestations cliniques vont des symptômes mineurs comme les troubles mictionnels temporaires, un sentiment d'irritation, des douleurs passagères et une hématurie microscopique indolore à des complications plus graves, comme une hématurie macroscopique, des douleurs chroniques, un sentiment de brûlure lors de la miction, une incontinence persistante, la formation de fistules, une nécrose et potentiellement la mort.

Lors de la phase aiguë, les premiers effets de l'irradiation sur la vessie sont des lésions de l'urothélium et de la micro-vascularisation. Au niveau des cellules de l'urothélium, une pycnose nucléaire et une coloration nucléaire hyperchromatique sont observées ; les noyaux peuvent également être hypertrophiés et atypiques. De plus, une vacuolisation cellulaire est visible, particulièrement sur les cellules basales. L'ensemble de ces lésions peut conduire à une perte progressive des cellules superficielles. Les artérioles, les capillaires et les veinules se distendent. Une thrombose est mise en évidence dans les vaisseaux distendus dont les parois sont amincies. Un œdème de la muqueuse, de la sous-muqueuse et de la lamina propria se développe, accompagné d'une inflammation aiguë (Stewart 1986). La disparition des cellules superficielles (cellules parapluies) entraîne une perte importante de l'imperméabilité de l'urothélium. Il en résulte une augmentation de la fréquence des mictions, de la dysurie et une diminution de la capacité vésicale (Parsons et al. 1994). Les œdèmes de la muqueuse, de la sous-muqueuse et de la lamina propria potentialisent ces effets. Une hématurie peut se développer en relation avec des pétéchies dans la lamina propria et la sous-muqueuse. La phase aiguë prend fin lorsque les lésions sont réparées. Elle ne dure pas plus de trois mois. Il s'en suit une phase de latence jusqu'à l'apparition de la phase chronique. Il faut noter que l'apparition et l'intensité des lésions chroniques sont reliées à l'intensité des lésions aiguës (Dorr and Hendry 2001).

C.1.2 Relation entre la phase aiguë et la phase chronique de la cystite

Plusieurs études ont démontré une relation entre la phase aiguë et la phase chronique de la cystite radique sans que les mécanismes sous-jacents soient compris. Il semblerait que plus la dose d'irradiation est importante et le fractionnement faible plus les lésions précoces et tardives surviennent tôt (Dorr and Beck-Bornholdt 1999). Les atteintes de l'urothélium en sont probablement la cause majeure. L'érosion observée durant la phase aiguë semble être prolongée plus longtemps après une forte dose d'irradiation. De plus, l'expression continue des récepteurs de l'EGF (EGFR pour Epidermal Growth Factor Receptor) semble indiquer une altération permanente des cellules basales pouvant conduire à une hyperplasie en phase tardive. Cependant, il est difficile d'aller plus loin entre la relation aiguë et chronique. Le manque d'étude récente analysant les effets des fractionnements et les effets dose sur les mécanismes empêche une meilleure compréhension. De plus, les quelques études à disposition sont souvent d'avant 1995 avec des protocoles et des appareils aujourd'hui obsolètes. Ces résultats sont à prendre avec précaution en attendant de nouvelles études, mais ouvrent des perspectives sur la possibilité de trouver des facteurs en précoce et prédictible des atteintes chroniques.

C.1.3 Échelle de notation

Il existe différentes échelles de notation de la gravité de la CRC. Celle de l'Organisation européenne pour la recherche et le traitement du cancer et le Groupe européen de radiothérapie oncologique (RTOG/EORTC) pour calculer la toxicité des rayonnements des organes exposés est la plus utilisée. Elle est sans doute l'une des plus complètes et comporte la fréquence et l'importance des hématuries ainsi que des télangiectasies. Elle comporte également d'autres critères comme la capacité vésicale, la fréquence et la sévérité des dysuries. Une autre échelle couramment utilisée est l'échelle SOMA-LENT qui représente l'évaluation subjective, objective, de gestion et analytique (SOMA pour Subjective Objective Managment Analytic) des effets tardifs sur les tissus normaux (LENT pour Late Effects of Normal Tissues). Cette échelle se base sur trois critères : la fréquence et l'importance des hématuries, la fréquence des dysuries et le nombre d'incontinences quotidiennes (tableau 2). La dernière échelle couramment utilisée est le CTCAE (Common Terminology Criteria for

Adverse Events). Cette échelle ne prend en compte que l'hématurie. Elle est utilisée, car elle donne de nombreuses consignes sur les interventions à réaliser suivant les grades. Il existe d'autres échelles comme celle de Droller, de Brugieres ou de Bearman, d'Arthur (voir tableau 2). Ces échelles permettent d'adapter les traitements en fonction de la gravité des lésions observées (voir partie D).

Tableau 2 : Système de grading de la CRC

Grade	Droller (Droller et al. 1982)	Brugieres (Brugieres et al. 1989)	Bearman (Bearman et al. 1988)	Arthur (Arthur et al. 1986)	CTCAE v5.0 (U.S. Department of Health and Human Services National Institutes of Health; National Cancer Institute November 2017)	RTOG/EORTC (Tucker et al. 2010)	SOMA-LENT (1995)
I	Hématurie/ dysurie microscopique	Hématurie macroscopique avec thrombocytopénie	Hématurie macroscopique dans les 2 jours suivant la dernière dose de chimiothérapie, sans symptômes subjectifs de cystite et non causés par une infection.	Plus de 50 érythrocytes	Saignement minime ou microscopique. Intervention non indiquée	Légère atrophie épithéliale Télangiectasie mineure (hématurie microscopique)	Hématurie occasionnelle et microscopique Dysurie occasionnelle Incontinence épisodes hebdomadaires
II	Hématurie macroscopique	Hématurie macroscopique avec caillots	Hématurie macroscopique après 7 jours à partir de la dernière dose de chimiothérapie non causée par une infection ou hématurie après 2 jours avec des symptômes subjectifs de cystite non causés par une infection.	Hématurie macroscopique	Saignement brut, intervention médicale ou irrigation de la vessie	Hématurie macroscopique, fréquence modérée Télangiectasie généralisée	Hématurie intermittente, macroscopique et diminution de l'hémoglobine de <10%. Dysurie intermittente Incontinence à épisodes quotidienne
III	Hématurie macroscopique avec petits caillots évacués lors de la miction.	Hématurie macroscopique avec caillots et obstruction urinaire	Hématurie avec sang franc, nécessitant une intervention locale invasive avec pose d'agents sclérosants, néphrostomie ou autre intervention chirurgicale	Caillots	Transfusion, radiologie interventionnelle, intervention endoscopique ou opératoire indiquée, radiothérapie (c'est-à-dire hémostase du site de saignement)	Fréquence et dysurie sévères Télangiectasie sévère généralisée (souvent accompagnée de pétéchies) Hématurie fréquente Réduction de la capacité vésicale (<150 cc)	Hématurie persistante, macroscopique et diminution de l'hémoglobine de 10-20%. Dysurie persistante et intense Incontinence à épisodes quotidiens

IV	Coagulation massive nécessitant souvent une instrumentation pour l'évacuation des caillots.	Caillots d'hématurie macroscopique, insuffisance rénale	Conséquences mettant la vie en danger, intervention majeure et urgente indiquée	Nécrose/ Vessie contractée (capacité <100 cc) Cystite hémorragique grave	Hématurie persistante, diminution de l'hémoglobine de >20%. Dysurie réfractaire et atroce Incontinence complète réfractaire

Abreviation : CTAEC = Common Terminology Criteria for Adverse Events. RTOG/EORTC = Toxicity criteria of the Radiation Oncology Group (RTOG)/European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). SOMA-LENT = Subjective Objective Managment Analytic (SOMA) - Late Effects Normal Tissue (LENT)

C.1.4 Étiologie et incidence

La cystite radique se distingue par deux phases: la phase aiguë qui intervient dans 40% des cas dans les 3 premiers mois (Mithal and Hoskin 1993) et la phase chronique qui apparait dans 5 à 10% des cas dans les 6 mois à 20 ans après la radiothérapie (Crew et al. 2001; Rigaud et al. 2004). Cependant, derrière ces chiffres se cache une forte différence suivant l'organe cible de la radiothérapie et la technique utilisée. La SFRO (Société Française de radiothérapie Oncologique) estime que pour une irradiation de la prostate par 3D-CRT (normo-fractionnée 2 Gy/séance, 5 séances par semaine pour une dose totale de 70 à 80 Gy (SFRO 2007)) 10 à 20% de la vessie sera irradiée entre 50 et 80 Gy. À 5 ans on retrouve 2 à 15% de CRC de grade 2 et à 10 ans il est estimé à 7% les CRC de grade 3 (Cahlon et al. 2008; Mathieu et al. 2014). Pour l'irradiation de la prostate par IMRT, 10 à 20% de la vessie sera irradiée entre 50 et 80 Gy. A 5 ans, on retrouve 2 à 25% de CRC de grade 2 et à dix ans 9 à 11% de grade 3. Pour les irradiations du col de l'utérus, 2 à 10% de la vessie est irradiée. À 5 ans après la radiothérapie, 32 à 42% des patientes vont déclarer une CRC de grade 3. Cependant, les données de la littérature ne détaillent pas le type de radiothérapie effectué et ni l'incidence à 10 ans. Pour la radiothérapie du colorectum, aucune donnée n'a été trouvée pour l'incidence de la CRC dans la littérature (voir figure 6).

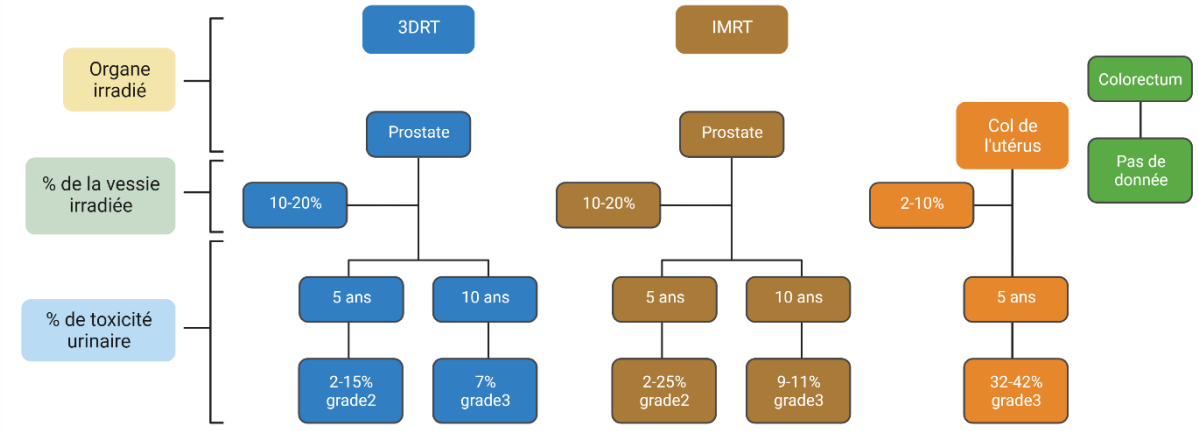


Figure 6 : Les symptômes de la CRC sont fonction de la dose et de la surface de la vessie irradiée. D'après Cahlon et al., 2008 et Mathieu et al., 2014

Cette figure résume nos connaissances concernant les lésions chroniques de la vessie pour la toxicité urinaire de la 3DCRT et de l'IMRT. Le pourcentage de lésions de grade 2 ou 3 pour une gamme de doses de 50 à 80 Gy est indiqué pour 5 et 10 ans après la radiothérapie.

Ces derniers chiffres sont à relativiser. À notre connaissance, il existe une seule étude récente de Martin et al., de 2019 sur la CRC, qui montre qu'environ 11% des patients traités par radiothérapie pour des cancers de la prostate ont des cystites hémorragiques dans les 5 ans après le traitement (Martin et al. 2019). Suivant le type de radiothérapie de la prostate, l'incidence de la CRC varie. Les détails sont donnés dans le tableau ci-dessous (tableau 3). L'EBRT (External Beam Radiation Therapy) est l'une des radiothérapies les plus pratiquées, mais elle présente l'un des taux les plus hauts de CRC avec 16,7%. L'IMRT était la deuxième en termes de proportion et présente un taux de CRC beaucoup plus faibles (10,5%) sauf s'il est couplé avec une radiothérapie neutron plus photon où l'incidence de la CRC est de 19%. Une autre étude de Georg P et al., montre que pour des patients ayant été traités par IMRT et curiethérapie (pour des doses de 45 Gy en 25 fractions aux patients recevant une chimiothérapie concomitante, et 50,4 Gy en 28 fractions aux patients sans chimiothérapie), 76 % des effets indésirables (grade >1) sont survenus dans les 3 ans suivant la radiothérapie. La durée moyenne des effets secondaires de la vessie était de 20 mois et 61 % étaient résolus dans les 3 ans. Les taux de complications à 3 et 5 ans étaient de 18 et 28 %. Les taux de prévalence étaient de 18 et 21% (Georg et al. 2013).

Tableau 3 : Tableau répertoriant le pourcentage de cystite radique hémorragique 5 ans après une radiothérapie du cancer de la prostate. D'après (Martin et al. 2019)

Type de radiothérapie	Pourcentage de patient traité par la technique d'irradiation	Incidence de cystite hémorragique après irradiation
EBRT	50%	16.7%
IMRT	13,90%	10.5%
EBRT neutron + photon	8,50%	16.1%
EBRT + brachythérapie	7,60%	13.3%
Inconnu	7,60%	3.3%
Adjuvant	5%	15.4%
IMRT neutron + photon	4,90%	19%
Sauvetage	2,50%	15.4%

Une autre étude de Tonse et al., en 2022 donne des chiffres sur 5 ans après la radiothérapie (aux États-Unis d'Amérique) mais sans détailler les séquelles aiguës des séquelles chroniques ni le type de radiothérapie. Cette étude montre qu'entre 2005 et 2016, le pourcentage de cystites radiques après radiothérapie de la vessie et de la prostate est d'environ 20%, d'environ 7% pour le col de l'utérus et de 5% pour le côlon et l'utérus (figure 7). Ces chiffres sont cohérents avec le pourcentage du volume vésical irradié et sont en contradiction avec ceux de Cahlon et Mathieu mentionnés ci-dessus, notamment pour le pourcentage après irradiation de l'utérus. Cette différence pourrait provenir de données plus récentes de l'article de Tonse reflétant mieux les nouveaux protocole et technologie utilisées. De plus, à notre connaissance, il s'agit de la seule étude donnant des chiffres de cystites radio-induites après radiothérapie du côlon. Par ailleurs, cette étude met en évidence le coût des hospitalisations pour les séquelles de la radiothérapie estimé à 4,9 milliards de dollars pour environ 480 000 patients (entre 2005 et 2016) et la vessie est la première cause d'hospitalisation (4,8%) pour un coût de 180 millions de dollars. Cet article montre également que l'incidence des cystites radiques reste stable dans le temps (Tonse et al., 2022).

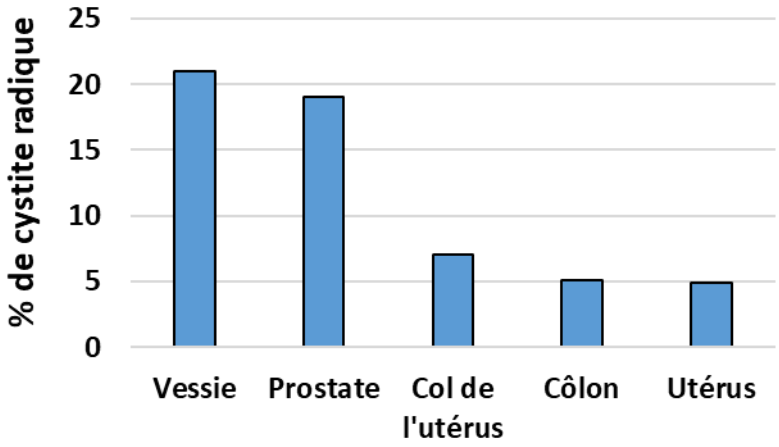


Figure 7: Pourcentage de cystite radique en fonction de l'organe irradié sur 5 ans. D'après Tonse et al., 2022

En conclusion, l'incidence de la CRC est principalement due au volume de la vessie irradié et à la dose d'irradiation reçus. La localisation du cancer est un facteur déterminant (détermine la dose et le volume de la vessie irradiée) dans l'incidence de la CRC. A ce titre ce sont les irradiations des cancers de la vessie et de la prostate qui ont le plus de chance d'induire une CRC

C.2 : Traitement de la cystite radique chronique

C.2.1 Prise en charge de la cystite radique chronique

Il existe de nombreux traitements possibles de la CRC (Gallego-Vilar et al. 2013; Pascoe et al. 2019; Rigaud et al. 2004; Smit and Heyns 2010; Vanneste et al. 2021). Cependant, il n'existe pas de schéma thérapeutique faisant l'unanimité. Une synthèse des traitements est disponible dans l'article d'Helissey et al., de 2020 (en annexe 1), (Helissey et al. 2020).

Deux grands types sont distinguables. La CRC avec une prédominance inflammatoire (avec œdème, pâleur de la muqueuse et ulcère possible) et la CRC avec une prédominance hémorragique (friabilité, hémorragie spontanée et télangiectasie). Nous n'avons pas trouvé de chiffre pour déterminer les fréquences de ces deux types différents de cystite radique, mais la littérature sur la cystite hémorragique est plus dense ce qui peut souligner une prédominance de la CRC hémorragique comparé à la CRC inflammatoire. De plus, le système de grading se base sur les hémorragies soulignant ce fait. Un dernier point à souligné est que la CRC inflammatoire peut, si elle s'aggrave, devenir hémorragique.

Les grades, divisés en 4, vont des plus légers aux plus graves. Au niveau 1 ce sont les grades légers (asymptomatiques ou symptôme léger) ou l'action principale est la surveillance des symptômes. Au niveau 2 ce sont les grades modérés avec des hématuries intermittentes et/ou légères. À ce stade, les 1ers traitements sont administrés. Ce sont des traitements impactant peu la vie du patient (oral, cystoscopie…). Au niveau 3 ce sont des hématuries sévères et/ou permanentes impactant grandement la vie des patients, mais ne mettant pas la vie en jeu dans l'immédiat. Des traitements plus lourds doivent alors être administrés pour diminuer les symptômes (instillation intravésicale, cautérisation des vaisseaux). Au niveau 4, ce sont des hématuries avec un pronostic vital pouvant être engagé. Dès lors, et si toutes les autres méthodes ont échoué, une opération est nécessaire (embolies des artères, cystectomie). Le 5^{e} stade est le décès du patient (tableau 4).

Les 1res étapes du traitement de la CRC sont l'évocation de l'historique du patient ainsi que la réalisation d'un examen physique et d'un ECBU (Examen CytoBactériologique des Urines) pour exclure la possibilité d'une autre pathologie (type cystite bactérienne). Avant les

1ers traitements médicamenteux, les thérapies comportementales (adaptation des apports liquidiens, reprogrammation mictionnelle, tenue d'un calendrier mictionnel) et la rééducation périnéo-sphinctérienne permettent d'inhiber les contractions vésicales pour lutter contre l'incontinence proprement dite. Si ces méthodes ont échoué, il faut passer au traitement médicamenteux.

Tableau 4 : Grades des traitements de la CRC d'après CTCAE v5.0 (U.S. Department of Health and Human Services National Institutes of Health; National Cancer Institute November 2017)

Grade de la CRC	Symptômes et indication médicamenteuse et/ou intervention nécessaire
I	**Léger** ; asymptomatique ou symptômes légers pouvant entrainer un inconfort (hématurie microscopique) ; Observation clinique ou diagnostics : intervention non indiquée
II	**Modéré** ; intervention locale ou non invasive (hématurie intermittente et légère); Intervention indiquée : action minimale n'impactant pas la vie du patient (médicaments, cystoscopie…)
III	**Sévère** ; Hématurie permanente et importante, mais ne mettant pas la vie du patient en danger, mais limitants les activités quotidiennes ; Intervention indiquée : hospitalisation ou prolongation de l'hospitalisation (transfusion sanguine, instillation, cystoscopie)
IV	**Grave** ; Hématuries abondantes pouvant mettre la vie du patient en danger ; intervention urgente : Chirurgie avec embolisation des artères voire cystectomie
V	Décès du patient

C.2.2 Traitement de la cystite radique chronique à prédominance inflammatoire

Pour la CRC inflammatoire, les problèmes se produisent lors de la phase de stockage de l'urine, de la miction et/ou les douleurs chroniques. Les symptômes lors du stockage sont des douleurs pendant la phase de remplissage et de stockage, des urgences/incontinences avec nycturie. Les principaux traitements sont les médicaments anti-inflammatoires, et les antagonistes β3 (Kelleher et al. 2018). Les médicaments anti-inflammatoires comprennent les antihistaminiques tels que l'hydroxyzine et la cimétidine qui empêche la dégranulation des mastocytes et par conséquent diminuent l'inflammation.

Parmi les analgésiques, l'Amitriptyline, la Lidocaïne, les Vanilloïdes agissent sur les voies nerveuses et détendent les muscles, réduisant les spasmes et l'incontinence, ce qui entraîne une diminution de l'hématurie.

Parmi les médicaments limitant l'incontinence on retrouve l'Oxybutynine, la Tolterodine, la Trospium, la Darifenacin, la Fesoterodine, le chlorure de trospium, la Solifénacine, la fésotérodine ou encore le chlorhydrate de flavoxate qui agissent sur la voie nerveuse en bloquant l'action acétylcholine (neurotransmetteur) au niveau des synapses du système nerveux central et périphérique (Anticholinergic Agents (2012; Gerretsen and Pollock 2011). Les antagonistes du β3 sont des médicaments qui bloquent les récepteurs adrénergiques permettant une relaxation du détrusor et augmentent les délais entre deux contractions facilitant la miction et réduisant les douleurs. Les antagonistes du β3 ont une efficacité similaire aux anticholinergiques voir légèrement meilleure sur la capacité urinaire et les incontinences, mais ils sont surtout mieux supportés par les patients avec moins d'effets secondaires (hypertensions artérielles, rhinopharyngites et infections urinaires). À ce titre, ils sont maintenant privilégiés dans le traitement de la CRC à prédominance inflammatoire.

Les symptômes lors de la phase mictionnelle sont une miction intermittente, une hésitation, une dysurie et un écoulement après la miction. Les traitements principaux sont les antagonistes des α1-adrénocepteurs (α1-bloquants), les corticoïdes ainsi que la réalisation d'une cathétérisation pour éviter les douleurs. Si le symptôme principal est la douleur, elle peut être traitée par du paracétamol ou par des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (Vanneste et al. 2021). Les alphas bloquants agissent principalement sur la contraction des sphincters et aide à la relaxation du detrusor, facilitant la miction. Ces médicaments possèdent également de nombreux effets indésirables comme de l'hypertension causant des sensations de vertige, des étourdissements, mais aussi des nausées ou des céphalées.

C.2.3 Traitement de la cystite radique chronique à prédominance hémorragique

En ce qui concerne la CRC hémorragique, la première étape est d'établir l'origine des saignements. Pour cela, une cystoscopie est réalisée afin de vérifier l'état de la paroi vésicale ainsi que de vérifier l'état de vaisseaux sanguins.

Les traitements de la CRC hémorragique vont dépendre de l'intensité des hématuries (figure 8).

Grade 1

Si celle-ci est faible et/ou intermittente (grade 1), la première étape du traitement est l'évacuation des potentiels caillots sanguins par cystoscopie associée si possible avec un traitement par oxygénothérapie hyperbare. De plus, il faut augmenter l'hydratation ainsi que le suivi du patient. Dans les cas où l'hématurie est soudaine et importante, il se peut qu'il faille réaliser une transfusion sanguine de manière unique et immédiate et s'assurer de la stabilité hémodynamique (bonne circulation du sang dans les différents organes et principalement la vessie afin d'éviter une ischémie prolongée et la création d'une nécrose).

Grade 2

Si cette première ligne de traitement ne suffit pas et que la CRC hémorragique est de grade 2. Il est possible d'administrer différents agents oraux. On retrouve ainsi des anti-inflammatoires (AINS, antihistaminique (hydroxyzine ou cimétidine)), des agents protecteurs de l'urothélium (Sodium pentose polysulfate), des médicaments pour contrôler la douleur (analgésique (amitriptyline, lidocaïne, vanilloïdes)) et des médicaments procoagulants (acide aminocaproïque). Si les saignements diminuent, la CRC est à surveiller et si possible à compléter avec une oxygénothérapie hyperbare. L'oxygénothérapie hyperbare est utilisée pour augmenter l'apport en oxygène aux tissus urothélials hypoxiques, stimulant ainsi une granulation et une angiogenèse saines qui réduisent l'hématurie. Le traitement par oxygène hyperbare est contraignant et coûteux avec 30-40 séances de 80-90 min sur 2 mois, et les effets diminuent avec le temps et des récidives peuvent apparaître quelques années après le traitement (Cardinal et al. 2018; Colemeadow et al. 2020; Oscarsson et al. 2019; Villeirs et al. 2020). Si les hématuries persistent, voire s'aggravent, on passe à des traitements plus lourds.

Grade 3

Si la CRC hémorragique est de grade 3 (échelle SOMA-LENT EORTG et grade 3 des traitements). L'instillation intravésicale, la cautérisation des vaisseaux sanguins, voire l'embolisation des artères vésicales et/ou prostatiques est réalisée. Le principe de base d'une instillation intravésicale est l'introduction d'une solution dans la vessie par un cathéter. La

cautérisation est réalisée soit par l'électrocoagulation, la fulguration ou la coagulation laser afin d'arrêter les saignements.

C'est principalement à ces étapes que diffère le management de la CRC. Dans certaines études, ces différents traitements sont positionnés au même niveau et leur utilisation dépend de la volonté du corps médical (Vanneste et al. 2021). Dans la plupart des études, ces traitements sont hiérarchisés depuis la cystoscopie avec hydrodistension, l'instillation de solution protectrice de la couche de GAG (acide hyaluronique, sulfate de chondroïtine, héparine et le polysulfate de pentosan sodique) ainsi que des traitements comme l'instillation de DMSO et de toxine botulique A. L'hydrodistension permettrait la rupture puis la reconstruction des voies nerveuses endommagées pour soulager la douleur. Le polysulfate de pentosan sodique est un polysaccharide sulfaté semi-synthétique qui sert de glycosaminoglycane (GAG) synthétique. Le DMSO (diméthylsulfoxyde) pourrait agir sur la libération d'oxyde nitrique (NO) par les neurones permettant un effet analgésique direct des nerfs afférents du tractus inférieur en désensibilisant les voies nociceptives (Birder et al. 1997). La toxine botulique A agit sur l'hyperexcitabilité des fibres nerveuses afférentes. Elle entraîne une dénervation chimique réversible, mais transitoire diminuant la contractilité du détrusor et réduisant l'incontinence.

Si ces instillations ne sont pas suffisantes, il est possible de réaliser des instillations de sulfate d'aluminium (alun) puis de formol. L'alun est un astringent qui provoque la contraction de la matrice extracellulaire en précipitant les protéines dans l'espace interstitiel et à la surface des membranes cellulaires. Ceci a pour effet de créer une vasoconstriction réduisant les saignements. Le formol et l'alun sont tous deux utilisés pour précipiter les protéines et réduire les saignements. Ils peuvent induire une inflammation et une nécrose de la muqueuse vésicale. Ces deux dernières techniques sont très éprouvantes pour les patients. La cautérisation des vaisseaux sanguins permet de limiter les saignements, elle est parfois utilisée avant les instillations de seconde intention. L'embolisation des artères est un traitement efficace dans d'autres pathologies afin de traiter des hémorragies récurrentes et rebelles (Bonne et al. 2017; Comploj et al. 2021; De Berardinis et al. 2005; Tapping et al. 2018). Cette procédure est peu invasive et bien supportée par les patients, mais elle présente des comorbidités importantes pour les patients traités par radiothérapie, rendant cette opération potentiellement dangereuse.

Grade 4

Si la CRC s'aggrave (grade 4 de l'échelle SOMA-LENT EORTG), il est possible de passer au stade 4 des traitements. Ce dernier stade comprend les chirurgies comme l'ablation de la partie de la vessie la plus affectée (De Berardinis et al. 2005). La cystectomie est réalisée en dernier recours. Pour chacune des étapes si celle-ci conduit à une résolution de la CRC hémorragique, elle doit être consolidée par une oxygénothérapie hyperbare (Gallego-Vilar et al. 2013; Pascoe et al. 2019; Rigaud et al. 2004; Smit and Heyns 2010; Vanneste et al. 2021). Les options de traitements chirurgicaux vont de la dérivation urinaire cutanée à la dérivation de l'anse iléale ou du côlon, avec ou sans cystectomie (Linder et al. 2014). Ces différentes méthodes ont, en plus de l'impact de la chirurgie, un impact mental (trouble de l'érection, sentiment de diminution physique…) et social important pour les patients. La cystectomie conduisant à la pose d'une poche pour recueillir les urines ou à la pose d'une néovessie (mieux tolérée chez les patients) (Hobisch et al. 2000; Philip et al. 2009).

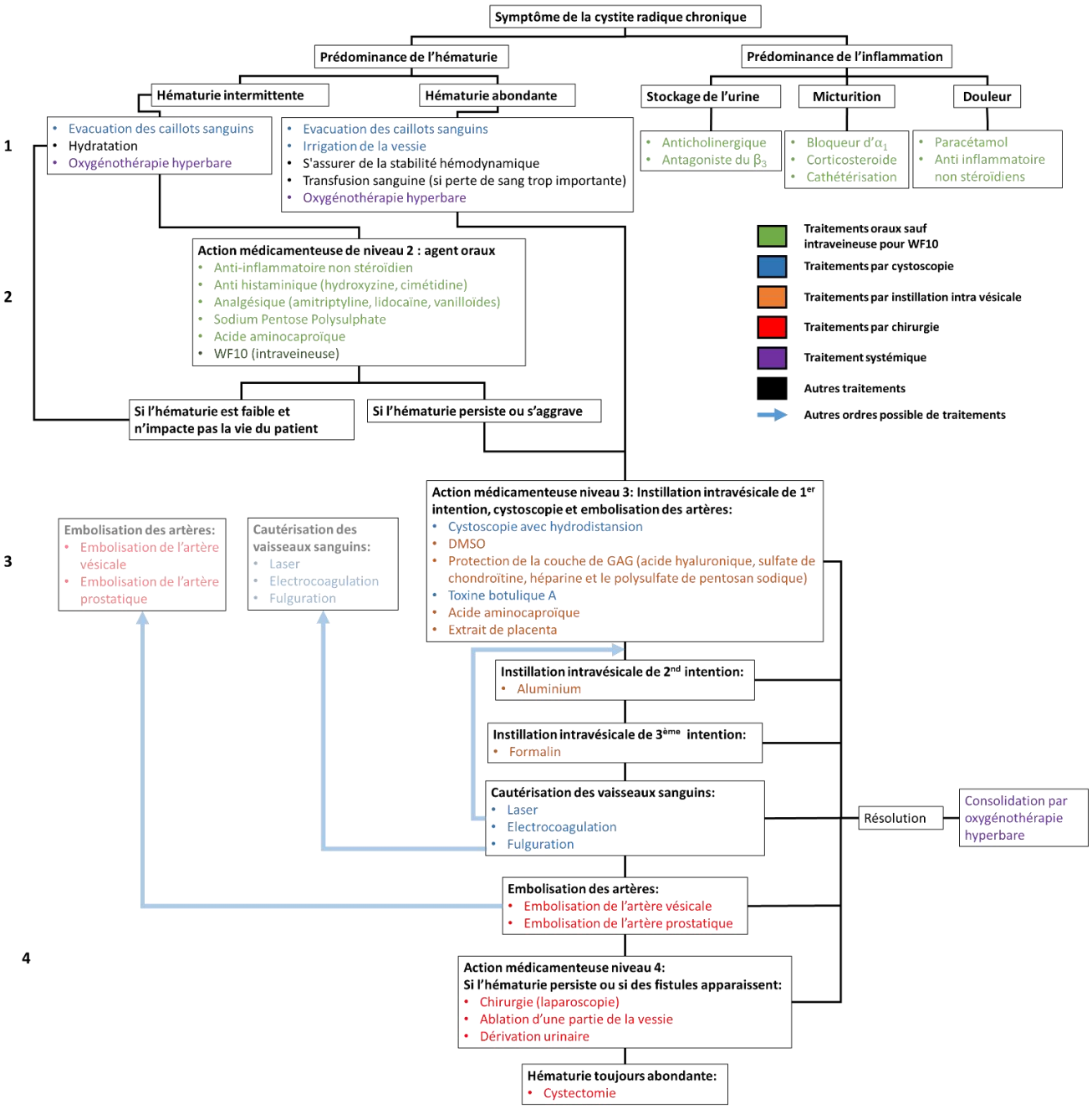


Figure 8 : Arbre décisionnel de la prise en charge de la Cystite radique chronique et ses traitements. D'après (Pascoe et al. 2019; Rigaud et al. 2004; Smit and Heyns 2010; Vanneste et al. 2021).

En conclusion, comme nous pouvons le voir ci-dessus, il n'existe pas de traitement curatif, car bien que l'efficacité des traitements soit généralement élevée à court terme, à long terme l'efficacité est réduite. De plus, chaque traitement reste peu étudié. En outre, tous ces traitements ne traitent qu'une seule cause de la pathologie à savoir l'inflammation ou les dommages vasculaires. Les traitements peuvent ralentir ou arrêter la progression de la cystite,

sans toutefois permettre la régénération des tissus endommagés. De plus, les effets secondaires restent importants, limitant les possibilités thérapeutiques. Des traitements innovants, efficaces à long terme et sans effets secondaires sont nécessaires. En se basant sur les connaissances actuelles et sur les progrès significatifs de la médecine régénérative, on peut s'attendre dans un futur proche à l'introduction en clinique d'un traitement qui permettrait la régénération du tissu vésical endommagé.

C.3 Modèle précliniques et mécanismes moléculaires de la Cystite radique

Une compréhension assez détaillée des mécanismes de la cystite radique peut être obtenue à partir de la synthèse des résultats obtenus dans les modèles animaux. Les modèles précliniques ont été réalisés principalement chez la souris, avec une étude unique chez le rat et une autre chez le lapin. Dans le contexte d'une exposition aux rayonnements ionisants, les configurations, les doses, les débits de dose et les dispositifs sont différents dans les études. Les expérimentations ont été réalisées avec des irradiateurs linéaires principalement pour des doses comprises entre 20 et 40 Gy, mais pouvant atteindre un maximum de 90 Gy. Les études ont le plus souvent été réalisées en dose unique, mais certaines études ont été réalisées avec des doses fractionnées (Kohler et al. 1992; Kohler et al. 1995; Stewart et al. 1981; Stewart et al. 1984).

Parmi l'ensemble de la littérature deux études se distinguent, soit par la source d'irradiation avec les études du Soler qui utilise une source de césium (Soler et al. 2011), soit par la configuration d'irradiation dans l'étude d'Ikeda et al. ou la vessie est extériorisée pour l'irradiation (Ikeda et al. 2018).

Des études plus récentes, utilisant le SARRP (Small Animal Radiation Research Platform) ont permis un ciblage unique de la vessie par plusieurs faisceaux en évitant les éventuels effets secondaires sur les tissus environnants (Zwaans et al. 2016; Zwaans et al. 2020). Bien que ces études soient assez disparates en termes de configuration d'irradiation et de modèles animaux, des tentatives de synthèse de mécanismes communs sont néanmoins présentées dans les paragraphes suivants. L'extrapolation à la pathologie humaine afin

d'enrichir les mécanismes de la CRC nécessite une comparaison avec les observations faites chez l'homme.

C.3.1 Cystite radique phase aiguë

Durant la phase aiguë, une réponse transitoire est observée et se résout en quelques semaines ou quelques mois, puis une phase de latence est décrite, suivie de la phase chronique. Ses symptômes sont causés par l'activation de la cascade pro-inflammatoire entrainant une diminution de la capacité vésicale avant 30 jours. Plus les doses sont importantes, plus la diminution de la capacité vésicale (un des critères les plus importants et les plus étudiés) est précoce. Le fractionnement des doses d'irradiations a un effet protecteur, retardant la lésion (Dorr 1992; Dorr and Schultz-Hector 1992; Dorr 1995; Giglio et al. 2016; Jaal et al. 2004; Rajaganapathy et al. 2015; Schreiber et al. 1969; Zwaans et al. 2021). Cette diminution de la capacité vésicale est associée avec une diminution du nombre de cellules superficielles (Jaal and Dorr 2006c).

Ces observations sont associées à une production de ROS accrue après irradiation provoquant un stress oxydatif et une surexpression de SOD-2 (SuperOxydes Dismutases), HO-1 (hème oxygénase), NRF-α (Nuclear Respiratory Factor) et 8-OHdG, mais pas de SOD-1 (Oscarsson et al. 2017). Une inflammation aiguë est observée avec une surexpression de NF-κB (nuclear factor-kappa B) induisant l'expression de la Cyclooxygénase (COX) 1 et 2 créant une vasodilatation et des microhémorragies (Jaal and Dorr 2006b; Ozbilgin et al. 2016b).

L'activation de NF-κB, par ses sous-unités p50 et p65 (Kowaliuk et al. 2020), entraine une augmentation de l'expression d'ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) dans les cellules endothéliales favorisant le recrutement des macrophages (Jaal et al. 2004; Jaal and Dorr 2007). De plus, NF-κB, est activateur de Cox-2. D'autres études ne montrent aucun changement dans le recrutement de cellules immunitaires, voire une diminution des mastocytes (Giglio et al. 2016; Zwaans et al. 2021). Diverses études démontrent une augmentation d'IL-10, TNF-α et TGF-β (Transforming Growth Factor Beta), une diminution d'IL-6 et des TLR-4 (Toll-Like Receptors) et aucune différence d'expression d'INF-γ (interféron gamma), IL-1β, de l'IL-2, 4, 5, 13, des lymphocytes Th1 et 2 et des synthases d'oxyde nitrique (eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase), iNOS (inducible Nitric Oxide

Synthase) et nNOS (neuronal Nitric Oxide Synthase)), (Giglio et al. 2016; Oscarsson et al. 2017).

Les rayons X, le stress oxydatif et l'inflammation semblent conduire à l'altération de l'urothélium. Une érosion de l'urothélium associée à une perte de cellules superficielles est observée les 15 premiers jours suivie d'une récupération jusqu'à 24 jours et d'une deuxième phase de diminution pouvant perdurer dans le temps (jusqu'à 120 jours) avant restauration à 180 jours (Jaal and Dorr 2006c, 2010). Cette action est cohérente avec le temps de renouvellement de l'urothélium en cas de lésion qui est de plus ou moins 24 jours (Schreiber et al. 1969). Cette régénération est associée à une augmentation du récepteur EGFR qui précède cette phase (Jaal and Dorr 2010) ainsi qu'une augmentation de HB-EGF (Heparin-Binding EGF-like Growth Factor) (Ozbilgin et al. 2016a) et de POMC (proopiomélanocortine) (Kemal Ozbilgin and Caner Aktas January 4 2016). L'érosion de l'urothélium est associée à une diminution de l'uroplakine III (Upk III), E-cadhérine et de ZO-1 (Jaal and Dorr 2006c; Zwaans et al. 2021) augmentant la perméabilité de la vessie. La régénération visible de l'urothélium après les deux premiers mois d'irradiation est associée à un retour structurel de la vessie avec une restauration des jonctions serrées. L'ensemble des données de la littérature est résumé dans le tableau 5.

Tableau 5 : Liste des études pré-cliniques de la cystite radique aiguë

Auteur	Date de publication	Modèle	Dose	Source d'irradiation	Temps de l'étude	Principales caractéristiques étudiées	Moyen utilisé	Résultats principaux
Schreiber H (Schreiber et al. 1969)	1969	Rat Winstar male	Dose unique 800, 1600, 2000 Roentgen	Stabilipan (Siemens), distance focale de 5 cm, 120 kV 6 mA. Champ d'irradiation de 2,5 cm de diamètre	24 heures, 2, 3, 8, 14 et 30 jours et deux animaux 60 jours après l'irradiation	Régénération de l'urothélium	Marquage au tritium	Le temps de renouvellement de l'épithélium de la vessie est d'au moins 24 jours. Le temps de renouvellement des cellules superficielles est d'environ 24 jours après irradiation. À 800 et 2000 R (roentgen), diminution de l'épithélium au 3e jour, guérison au 14e.
Dorr W (Dorr 1992)	1992	Souris femelle C3H/Neu	Traitement avec des doses uniques et 2, 3, 5 et 10 fractions	SeifeE3rt Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	30 jours	Fonctionnalité de la vessie	Cystométrie	Diminution de la capacité vésicale après irradiation. Plus le fractionnement est important plus les lésions sont légères
Dorr W (Dorr and Schultz-Hector 1992)	1992	Souris femelle C3H/Neu	**Tir latéral** 1 fraction : 1, 12, 16, 18, 20.3, 24.2 Gy 2 fractions : 13.2, 14.3, 19.9, 21.8, 26.6 Gy 3 fractions : 20.1, 23.1, 24.6, 27, 30 Gy 5 fractions : 25, 28, 30, 32, 34 Gy10 fractions : 38/41/44/47/50 **Tir ventrale** 1 fraction : 13, 16, 18, 20, 23 Gy 2 fractions : 20, 23, 26, 29, 32 10 fractions : 38, 41, 44, 47, 50 Gy	SeifeE3rt Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 300kV, 5,3 Gy/min	35 jours	Fonctionnalité de la vessie	Cystométrie	Diminution dose dépendante de la capacité vésicale entre 7 et 25 jours (avec une durée de 3 à 9 jours). Le traitement avec des doses uniques et 2, 3, 5 et 10 fractions a démontré un effet d'épargne significatif avec des valeurs ED50 de 18,3, 24,9, 26,8, 29,8 et 38,0 Gy.
Dorr W (Dorr 1995)	1995	Souris femelle C3H/Neu	18,2 Gy en fraction (1 à 10) et 28,1 Gy en dose unique	SeifeE3rt Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	30 jours	Fonctionnement de la vessie	Cystométrie	ED50 = 18.2 Gy pour une dose unique et 28.1 Gy pour une attente entre 2 doses d'irradiation de 8h (α/β = 10,4 Gy)
Jaal J (Jaal et al. 2004)	2004	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique de 20 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	2, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 jours (précoce), puis aux jours 90, 120, 180, 240 et 360 (tardif) après l'irradiation	Fonctionnement de la vessie Urothélium	Cystométrie Immuno-histochimie	Réduction de la capacité de la vessie de 50 % chez 40 % des animaux irradiés entre les jours 0 et 15, 64 % des animaux entre les jours 16 et 30. En tardive, 71% des animaux présentions ne réduction de la capacité vésicale après le 180e jour. Augmentation de l'expression d'ICAM au deuxième jour, avec un maximum au quatrième jour et un retour

								aux valeurs de contrôle au jour 13. Augmentation permanente du signal de coloration de l'ICAM-1 a été observée dans la phase tardive, du 90e au 360e jour après l'irradiation.
Jaal J (Jaal and Dorr 2006b)	2006	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique de 20 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	2, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 jours (précoce), puis aux jours 90, 120, 180, 240 et 360 (tardif) après l'irradiation	Vasculaire	immuno-histochimie	Augmentation de l'expression de COX-2 dans la paroi des vaisseaux sanguins durant la phase précoce (4 à 16 jours), mais pas dans la phase tardive
Jaal J (Jaal and Dorr 2006c)	2006	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique de 20 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	2, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 jours (précoce), puis aux jours 90, 120, 180, 240 et 360 (tardif) après l'irradiation	Urothélium	Immuno-histochimie	Diminution des cellules superficielles en phase précoce (jour 0 à 31) jusqu'au début de la phase tardive (90 à 120 jours), perte progressive de l'expression de l'Uroplakine III à la surface des cellules corrélé à la perte des cellules superficielles, mais augmentation de l'expression cytoplasmique de l'Uroplakine III dans les cellules superficielles jusqu'au début de la phase tardive (120 jours)
Jaal J (Jaal and Dorr 2006a)	2006	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique de 20 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	2, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 jours (précoce), puis aux jours 90, 120, 180, 240 et 360 (tardif) après l'irradiation	Fibrose Vasculaire	Histologie Immuno-histologie	Infiltration de l'albumine autour des petits vaisseaux sanguins en phase précoce et tardif Augmentation du dépôt des collagènes dans la vessie
Jaal J (Jaal and Dorr 2007)	2007	Souris femelle C3H/Neu	3x10 Gy	SeifeE3rt Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	17 jours	Lésions vasculaires Inflammation	Immuno-histochimie	Augmentation après irradiation de la vasodilatation jusqu'à 13 jours. Augmentation d'ICAM-1 après irradiation Augmentation des macrophages après irradiation

Jaal J (Jaal and Dorr 2010)	2010	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique de 20 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	De 0 à 360 jours	Prolifération de l'urothélium	Histologie	Diminution du nombre de cellules total de l'urothélium à 13 jours, suivi d'une légère récupération le jour 22 et d'une deuxième diminution de 49% à 31 jours. Diminution du nombre total de cellules à 90 et 120 jours avec une restauration apparente de l'urothélium au jour 180. En revanche, au jour 360, une augmentation du nombre total de cellules a été observée (143%). Pas de changement de l'expression de Ki67 jusqu'à j35, puis augmentation jusqu'à j360. Augmentation de l'expression d'EGFR jusqu'à j 360. Augmentation de l'expression urothéliale de l'EGFR (dans les cellules basales) qui précède la restauration urothéliale, ce qui indique une contribution du système EGF/EGFR à la prolifération et à la différenciation urothéliales
Rajaganapathy B.R (Rajaganapathy et al. 2015)	2015	Rats Sprague-Dawley femelles	20, 30 et 40 Gy	SARRP (225 KVp, Xstrahl, Gulmay Medical Inc., Suwanee, GA)	6 semaines	Inflammation Urothélium Vasculaire	Histologie	Diminution de l'intervalle de miction pour la dose de 30 et 40 Gy (20min). Dégénérescence de cellules de l'urothélium avec œdème, hyperplasie
Giglio D (Giglio et al. 2016)	2016	Rats Sprague Dawley	Dose unique 20 Gy	Accélérateur linéaire 6 MeV (Varian MedicalSystems Inc.,Palo Alto, CA, USA)	14 jours	Fonctionnement de la vessie Inflammation	Cage métabolique PCR Immuno-fluorescence Westernblot ELISA	Augmentation de la fréquence urinaire et diminution du volume vésicale. Augmentation de l'expression de l'IL-10 et du collagène. Diminution de l'expression des TLR-4 de l'IL-6 et des mastocytes dans la sous-muqueuse et de l'IL-6 et nitrite dans les urines. Pas de différence d'expression d'IFN-γ, IL-1β, de l'IL-2, de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-13, des synthases d'oxyde nitrique (eNOS, iNOS et nNOS), du facteur de nécrose tumorale TNF-α.
Ozbilgin (Ozbilgin et al. 2016a)	2016	Souri male Swiss Albinos	Dose unique 10 Gy	Cobalt 60 avec un champ de 5×23 cm et une distance source-surface de 80 cm pendant 10,7min	1, 2 et 7 jours	Changement histologique	Immuno-histologie	Augmentation de HB-EGF en subépithéliale
Ozbilgin (Kemal Ozbilgin and Caner Aktas January 4 2016)	2016	Souri male Swiss Albinos	Dose unique 10 Gy	Cobalt 60 avec un champ de 5×23 cm et une distance source-surface de 80 cm pendant 10,7min	1, 2 et 7 jours	Inflammation	Immuno-histologie	Aucune différence morphologique. Augmentation de l'expression de POMC àn7 jours
Ozbilgin (Ozbilgin et al. 2016b)	2016	Souri male Swiss Albinos	Dose unique 10 Gy	Cobalt 60 avec un champ de 5×23 cm et une distance source-surface de 80 cm pendant 10,7min	1, 2 et 7 jours	Inflammation	Immuno-histologie	Augmentation de l'expression de Cox-1 et 2

Oscarsson N (Oscarsson et al. 2017)	2017	Rats Sprague-Dawley femelles	Dose unique de 20 Gy	Accélérateurs linéaires avec une énergie photonique nominale de 6 MV (Varian Medical Systems Inc., Palo Alto, CA, USA). Le rayonnement a été administré en utilisant deux champs latéraux pour éviter l'exposition de la moelle épinière.	1, 15 et 29 jours	Stress oxydatif Fibrose	Histologie et Immuno-histochime PCR	L'irradiation de la vessie augmentait l'expression du 8-OHdG, sod2, HO-1, NRFα, IL-10, TNF-α et TGF-β. Ces changements ont été complètement inversés par l'OHB. Pas de changement avec l'irradiation de l'expression de SOD-1, Th1 Th2, IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IFN-γ
Podmolikova L (Podmolikova et al. 2020)	2020	Rats Sprague-Dawley femelles	Dose unique 20 Gy	Accélérateur linéaire de 6 MV (Varian Medical Systems Inc., Palo Alto) et administré dans deux champs latéraux pour éviter l'exposition de la moelle épinière	6 h, 3 jours, 7 jours et 14 jours	Inflammation	Histologie et Immuno-histochime PCR et western blot	L'irradiation de la vessie a inhibé l'augmentation des mastocytes induite par le LPS et la diminution des cellules Iba1 +. La combinaison du LPS et du rayonnement a augmenté l'expression du 8-OHdG et le nombre de cellules CD3 positives dans l'urothélium et a entraîné une diminution de l'expression du gène NRF2α dans la vessie. Donnée manquante pour l'effet de l'irradiation seul
Kowaliuk (Kowaliuk et al. 2020)	2020	Souris femelles C3H/Neu	Dose unique de 14 à 23 Gy (14, 17, 19, 21, 23 Gy); Traitement à base de thalidomide (inhibiteur de la voie NF-κB)	YXLON MG325 X ray, (YXLON International GmbH, Hambourg, Allemagne), 200 kV, 20mA, vessie à 0,9 cm du champ d'irradiation 1Gy/min à une distance de 45,5cm	12 mois (analyse une fois par mois)	Fréquence urinaire Inflammation	Cystométrie Immuno-histochimie	Diminution proportionnelle de la capacité vésicale en fonction de la dose d'irradiation Augmentation de l'expression de p50 et p65 au début de la phase de cystite radiologique (jour 1-30). En chronique diminution de l'expression de p65 avec un retour presque à la condition de contrôle (légèrement supérieur). Expression continue de p50 en phase chronique à des niveaux identique à la phase aiguë
Zwaans B M M (Zwaans et al. 2021)	2021	Souris femelles C57BL6	Dose unique de 40 Gy	Small Animl Radiation Research Plateforme (SARRP), 2 Gy/min 220 kV et 13 mA, collimateur 5x5	12 semaines	Mictions Urothelium Inflammation Fibrose	Papier pH Histologie, Immuno-histologie Histologie	Augmentation de la fréquence urinaire avec diminution du volume par miction à 7 et 8 semaines Augmentation de la fibrose Amincissement de la paroi urothéliale à partir de 4 semaines après l'irradiation et un pic à 8 semaines. Diminution de l'Ecadhérine de 4 à 8 semaines et retour au témoin ont 12 semaines. Diminution de l'uroplakine III après l'irradiation puis augmentation progressive de l'expression jusqu'a 12 semaines. Diminution de l'expression de ZO-1 à 8 semaines et retours ont la condition témoin à 12 semaines. Pas de cellules pro-inflammatoires ni d'expression de cytokine pro-inflammatoire ni d'œdème jusqu'a 12 semaines. Pas de fibrose jusqu'à 12 semaines.

Krischak (Krischak et al. 2021)	2021	Souris femelles C3H/Neu	Dose unique de 23 Gy. Traitement à base de thalidomide (inhibiteur de la voie NF-κB)	YXLON MG325 X ray, (YXLON International GmbH, Hambourg, Allemagne), 200 kV, 20mA, vessie à 0,9 cm du champ d'irradiation 1Gy/min à une distance de 45,5cm	12 mois (analyse une fois par mois)	Urothélium	Immunohistochimie	Augmentation de l'E-cadhérine et de la β-caténine en précoce, puis diminution à la fin de la phase précoce pour la β-caténine seulement (30 jours). Augmentation en phase chronique de l'E-cadhérine avec un plateau à 240 jours avec relocalisation dans le cytoplasme. Augmentation qu'à partir de 180 jours de la β-caténine avec un plateau à 240 jours. En précoce la thalidomide augmente plus rapidement l'expression de l'E-cadhérine et de la β-caténine pour arriver au même plateau que les irradiés, En chronique une augmentation de l'expression de l'E-cadhérine est observée avec expression plus forte sur la paroi cellulaire, peu de différence pour la β-caténine

C.3.2 Cystite radique chronique

Les différents mécanismes de la CRC sont présentés dans un paragraphe indépendant. Un tableau résumant la bibliographie sur la CRC sera mis à la fin de cette partie (tableau 6). L'ensemble des mécanismes sont synthétisés dans l'article de Brossard et al., de 2022 (en annexe 3), (Brossard et al. 2022).

C.3.2.1 Atteintes de l'urothélium

Les lésions de l'urothélium sont un élément clé de l'initiation de la CRC. La perte d'imperméabilité de l'urothélium correspond à la perte d'une barrière protectrice de la vessie. C'est le premier élément permettant la détérioration des tissus sous-jacents. Le maintien dans le temps du défaut d'imperméabilité dû à une réparation défectueuse peut permettre la mise en œuvre des mécanismes observés lors de la phase chronique. De nombreux agents peuvent entretenir ces lésions de l'urothélium chez les patients et pourraient être des agents facilitant l'établissement de la CRC. L'observation de ces lésions apparaît au début de la CRC et peut être le résultat d'une mauvaise réparation durant la phase aiguë. Ce qui confirmerait que l'urothélium peut être le point d'initiation de la CRC. Cette absence de réparation peut conduire à une inflammation, qui peut participer aux dommages vasculaires et ainsi conduire au développement de la CRC.

L'urothélium subit des modifications moléculaires, avec une relocalisation des jonctions serrées telle la E-cadhérine induisant une augmentation de la perméabilité de la vessie (Krischak et al. 2021; Zwaans et al. 2016). Cependant, une étude de Jaal et al. a démontré une augmentation de l'expression d'ICAM-1, sans étudier la relocalisation (Jaal et al. 2004). Dans la première phase de la CRC, une diminution du nombre total de cellules de l'urothélium à 90 et 120 jours (principalement due à la perte des cellules superficielles) avec une restauration apparente de l'urothélium au jour 180 a été observée (Jaal and Dorr 2006c, 2010; Zwaans et al. 2016). Dans la phase tardive, la principale caractéristique des études sont les lésions structurelles de l'urothélium accompagnées d'anomalies cellulaires. Dans les études de Zwaans et al. et de Jaal et al., une diminution de l'expression de l'uroplakine III et de l'E-cadhérine a été détectée comme dans la phase aiguë, mais celle-ci persiste dans le temps. L'ensemble de ces anomalies, diminution des cellules superficielles puis diminution

des jonctions serrées, induisent une perte de l'étanchéité de la vessie chronique. Une hyperplasie est aussi observée dans les études de Zwaans et al. et de Jaal et al. avec une augmentation du nombre total de cellules (143%) au jour 360. L'hyperplasie pourrait provenir d'une augmentation anormale et prolongée des facteurs de prolifération. L'étude de jaal et al., de 2010 démontre une augmentation de l'expression de Ki67 à partir du jour 35 jusqu'à 360 jours, suggérant une prolifération cellulaire importante pouvant être responsable de l'hyperplasie. Cette augmentation pourrait s'expliqué par la surexpression d'EGFR (dans les cellules basales) qui précède la restauration urothéliale indique une contribution du système EGF/EGFR à la prolifération et à la différenciation urothéliale (Jaal and Dorr 2010).

L'infiltration d'urine dans les tissus entretient une inflammation et créé des œdèmes. De plus, en phase tardive de la CRC, une altération de la régénération de l'urothélium est observée (Jaal and Dorr 2006c, 2010; Zwaans et al. 2016). L'hyperplasie reste le phénomène le plus fréquent, bien que des érosions ont également été décrites, mais plus dans la phase précoce de la CRC (Jaal and Dorr 2006c, 2010; Kohler et al. 1995; Lane and Epstein 2008; Zwaans et al. 2016). Dans les études précliniques, l'hyperplasie, l'atrophie et l'œdème cellulaire, notamment dans les cellules basales, sont des mécanismes communs à plusieurs espèces animales et aux configurations d'irradiation. L'œdème et l'hyperplasie ont également été décrits chez les patients atteints de CRC (Lane and Epstein 2008).

Une prolifération accélérée peut se produire dans diverses pathologies de la vessie. Par exemple, lors de l'utilisation d'agents chimiques tels que le cyclophosphamide qui endommagent la couche cellulaire parapluie (Kreft et al. 2009a; Kreft et al. 2010). Le renouvellement et la différenciation lents des cellules urothéliales peuvent être influencés par des facteurs exogènes, notamment le facteur de croissance épithélial (EGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPARs) et d'autres molécules comme l'acide rétinoïque (Sun 2006; Varley et al. 2004a; Varley et al. 2004b). Nous pouvons supposer qu'au cours de la CRC, il y a une dérégulation des cellules souches urothéliales et que des facteurs tels que l'EGF, le PDGF et les PPARγ pourraient contribuer à cette dérégulation (figure 9).

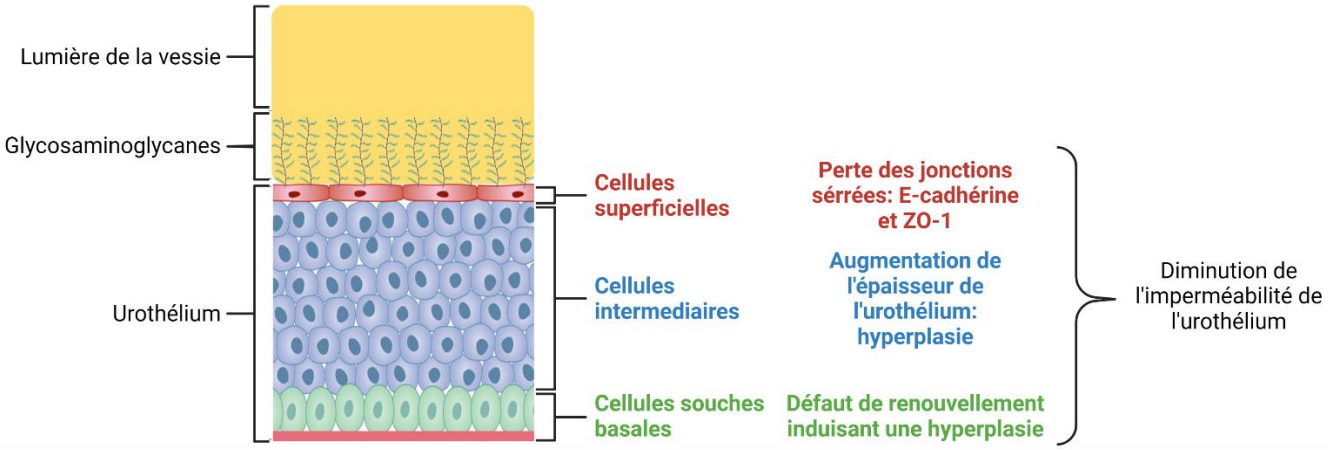


Figure 9 : Anomalies dans la régénération de l'urothélium et perte d'imperméabilité.

C.3.2.2 Atteintes du compartiment vasculaire

Les rayonnements ionisants, par leurs effets sur l'endothélium, contribuent à l'initiation et à la progression des dommages causés aux tissus sains par les rayonnements. Chez les patients traités par radiothérapie, l'atteinte vasculaire est considérée comme la cause majeure de la morbidité radio-induite à long terme (Milliat et al. 2008). Présent dans tout l'organisme, le réseau vasculaire est une cible potentielle, quelle que soit la localisation du cancer traité par radiothérapie. Nous décrirons les atteintes générales des irradiations sur le compartiment vasculaire avant de nous intéresser aux les lésions vasculaires dans la CRC. L'ensemble des données sont résumé en figure 10.

Les mécanismes généraux de la réponse du compartiment vasculaire lors de l'irradiation sont une diminution de la perméabilité endothéliale et une augmentation de la perméabilité vasculaire. En conséquence, le passage des cellules immunitaires peut être facilité, mais si cette perméabilité est trop importante, il peut en résulter des micro-hémorragies comme observées dans la cystite radique (Alexander and Elrod 2002), (figure 10). Des auteurs montrent que la surexpression des molécules d'adhésion peut s'expliquer par une modification de l'expression de gènes impliqués dans la glycosylation (Jaillet et al. 2017). L'irradiation abdominale à 10 Gy chez la souris entraîne une surexpression d'ICAM-1 à 24 h. Par la suite, l'expression de VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule) apparaît 14 jours post-irradiation (Molla and Panes 2007). L'augmentation des molécules d'adhésion au niveau

membranaire va favoriser l'adhésion des leucocytes et des plaquettes au niveau de la barrière endothéliale et ainsi induire une réponse inflammatoire qui peut être aiguë et/ou chronique (Castellon and Bogdanova 2016).

Le système de coagulation est également activé. La thrombomoduline est inactivée par les ROS favorisant la coagulation par les facteurs VIIIa et Va. La diminution de la thrombomoduline-1 induit une augmentation de thrombine (Richter et al. 1997). L'expression de PGI2 (prostacycline) est également diminuée après irradiation favorisant l'agrégation des plaquettes. Les cellules endothéliales vont sécréter de nombreux facteurs dont le facteur de Von Willebrand (vWF) qui est un puissant coagulateur. Les taux de PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1) augmentent. Or PAI-1 inhibe t-PA (tissue Plasminogen Activator) et l'urokinase. La fibrine n'est plus dégradée, favorisant la formation de caillots (figure 10). Les ROS induisent une augmentation des cytokines pro-inflammatoires, dont le TNF-α et l'IL-1. Il en résulte une augmentation des molécules d'adhésions favorisant le recrutement immunitaire (figure 10). Au final, ce déséquilibre entraîne une agrégation des plaquettes qui vont former des dépôts de fibrine responsables de l'obstruction des vaisseaux irradiés (Ward et al. 1997).

La transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT, Endothelial Mesenchymal Transition) est un processus phénotypique de commutation par lequel les cellules endothéliales perdent leurs caractéristiques et acquièrent des marqueurs mésenchymateux comme l'αSMA (Cho et al. 2018). L'EndoMT joue un rôle dans l'évolution de la rectite radique. En effet, chez des patients développant une rectite radique après leur traitement par radiothérapie, les cellules endothéliales expriment à la fois des marqueurs endothéliaux (vWF) et mésenchymateux (αSMA) (Mintet et al. 2015). Des travaux antérieurs menés dans le laboratoire ont permis de mettre en évidence l'EndoMT sur un modèle préclinique murin à la suite d'une irradiation colorectale à 27 Gy au Cobalt 60 (Mintet et al. 2015). L'EndoMT apparaît alors comme un processus important dans l'évolution et la mise en place de la fibrose radio-induite.

Les cellules endothéliales peuvent également répondre à l'irradiation par la mise en place d'une sénescence prématurée. À des doses allant de 0,5 à 10 Gy, les cellules endothéliales répondent par un arrêt dans le cycle cellulaire ou encore par l'acquisition d'un

phénotype sénescent (Kim et al. 2014; Oh et al. 2001; Panganiban et al. 2013). Si le taux de cellules sénescentes est supérieur à la capacité de clairance du système immunitaire, les cellules sénescentes s'accumulent dans le tissu. Celles-ci peuvent créer des dommages tissulaires et induire des pathologies à travers le SASP. En effet, les cellules sénescentes endothéliales seraient incapables de maintenir un renouvellement cellulaire pour maintenir la réparation des dommages et l'homéostasie vasculaire (Wang et al. 2016). La sénescence participe à la progression de la fibrose radio-induite (Citrin et al. 2013; Pan et al. 2017).

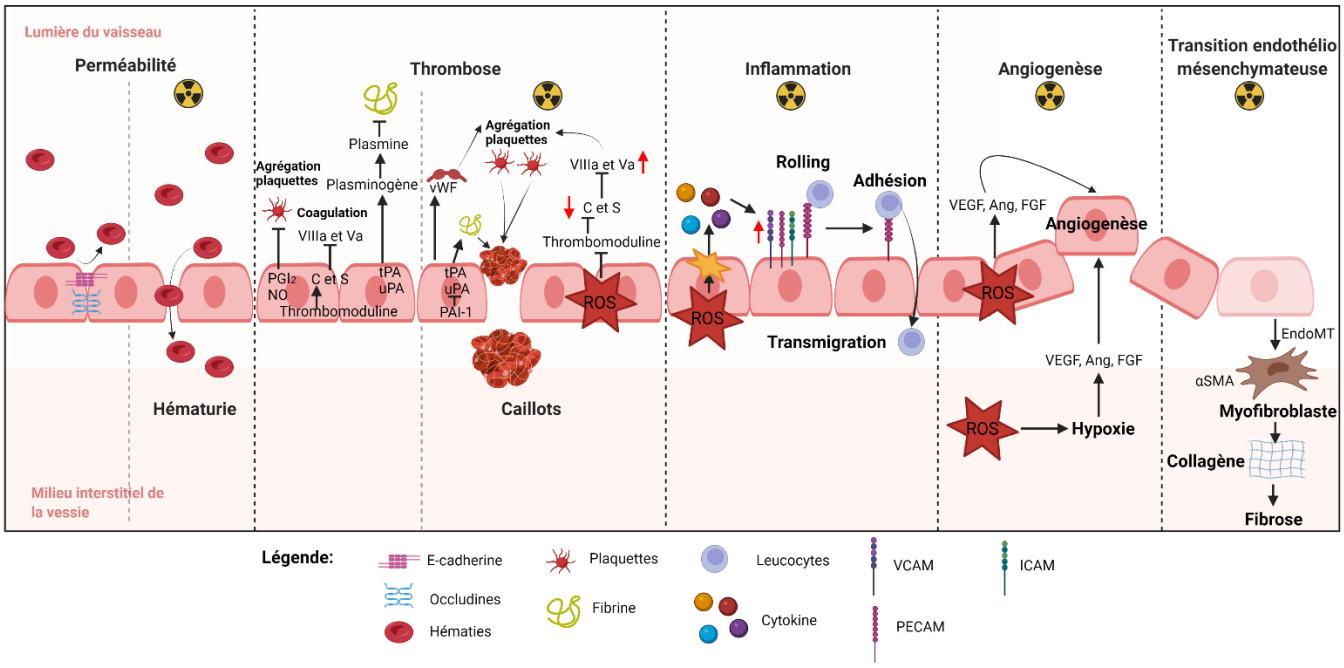


Figure 10 : Principales fonctions de l'endothélium vasculaire et des lésions après irradiation. D'après (Michiels 2003)

Dans la CRC, les lésions vasculaires sont un mécanisme commun retrouvé dans ces études indépendamment des modèles animaux et de la configuration de l'irradiation. La télangiectasie est le phénomène le plus fréquemment observé, ce qui n'est pas le cas pour l'hématurie, contrairement à ce qui est observé chez les patients. Ces lésions sont l'un des premiers phénomènes visibles de la CRC. Les télangiectasies s'accompagnent d'une augmentation de la perméabilité des petits vaisseaux sanguins. Toutes ces modifications entraînent une détérioration des microcapillaires, permettant leur rupture lors de la contraction et de la distension de la vessie. Les études de Zwaans et al., ont indiqué une altération

significative des vaisseaux sanguins avec des lésions vasculaires pâles, des lésions hémorragiques et des télangiectasies sur les plus gros vaisseaux sanguins un an après une irradiation à 40 Gy. La télangiectasie est définie comme une dilatation permanente avec épaississement de la paroi des vaisseaux sanguins. Il convient de souligner que les lésions étaient visibles dans toutes les souches de souris testées (Zwaans et al. 2020). Des télangiectasies sont également visibles en histologie 130 jours après l'irradiation (environ 4 mois) dans la sous-muqueuse à partir de 20 Gy chez les souris CH3/HeN (Zwaans et al. 2016). La télangiectasie a été mesurée de façon similaire chez les lapins dans l'étude de Kohler et al. deux ans après une irradiation de 33 Gy et s'est avérée être proportionnelle à la dose d'irradiation. Les télangiectasies affectaient principalement la partie caudale de la vessie, sans que cela soit statistiquement significatif (Kohler et al. 1995). Les télangiectasies des petits vaisseaux sanguins les rendent plus fragiles face aux contractions et dilatations subies par la vessie. Jaal et al. (Jaal and Dorr 2006a) ont mit en évidence une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins caractérisée par la présence d'albumine autour de ces vaisseaux. La présence d'albumine a été détectée tout au long de la phase tardive de 90 jours à 360 jours. Cependant, l'albumine n'a pas été observée autour des gros vaisseaux sanguins.

Contrairement à la pathologie humaine, la majorité des études précliniques n'ont pas montré d'hématurie. Cette observation concernant l'absence d'hématurie dans les modèles animaux de la CRC nous amène à nous interroger sur les limites des études précliniques pour expliquer les mécanismes de la CRC chez l'homme.

C.3.2.3 Inflammation

Après une irradiation, l'inflammation est une réponse tissulaire majeure, induisant des dommages tissulaires chroniques notamment au système vasculaire induisant la migration de leucocytes dans la zone irradiée et la sécrétion de multiples agents du système immunitaire (Yahyapour et al. 2018). L'irradiation modifie les fonctions des cellules immunitaires. La multiplication des macrophages et des lymphocytes T entraîne la production de médiateurs inflammatoires, tels que des cytokines, notamment IL-1, IL-2, IL6, IL-8, IL-33, TNFα (tumor necrosis factor-α), TGF-β (transforming growth factor beta, et INFγ (inter-feron gamma) associé à une stimulation de facteur nucléaire comme NFκB (nuclear factor-kappa B) et SMAD2/3 (Mothers against decapentaplegic homolog) (Yahyapour et al. 2018). Une

association étroite existe entre l'inflammation chronique et les dommages oxydatifs après irradiation. La quantité élevée de médiateurs inflammatoires est combinée à la production de prostaglandines et de radicaux libres, qui comprennent les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'oxyde nitrique (NO) (Petkau 1987). L'échange persistant entre le système immunitaire et les tissus endommagés par les radiations amplifie à son tour les boucles inflammatoires en mobilisant davantage de cellules inflammatoires.

Dans la CRC, le manque de données dans les études précliniques sur l'inflammation chronique est un véritable obstacle à la compréhension du rôle de l'inflammation dans la CRC. Par rapport à des pathologies similaires, comme la cystite interstitielle (CI), on peut suggérer que la dégradation de l'urothélium entraîne la libération d'histamine, d'IL-6, de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et de tryptase (He and Walls 1997; Wang et al. 2017b). La libération de ces facteurs pourrait activer les mastocytes, ce qui pourrait favoriser une inflammation chronique dans la CRC. Dans les études précliniques, les mécanismes de l'inflammation chronique n'ont été que partiellement étudiés dans la CRC. Cependant, au niveau cellulaire, plusieurs études ont révélé un nombre croissant de cellules pro-inflammatoires.

Zwaans et al., ont démontré une légère augmentation du nombre de mastocytes dans la sous-muqueuse, 130 jours après une irradiation (Zwaans et al. 2016), tandis que d'autres études démontrent qu'il n'y a pas eu d'augmentation (Vale et al. 1993). Aucune autre étude ne s'est intéressée aux mécanismes pro-inflammatoires dans la phase chronique. Cependant, Jaal et al. ont démontré que la COX-2 (Cyclooxygénase-2), qui a un rôle dans l'inflammation, était augmentée en aiguë, mais pas en phase chronique (Jaal and Dorr 2006b). La présence de mastocytes à la fin de la phase précoce et au début de la phase tardive était en faveur d'une inflammation chronique. Les mastocytes participent activement à la production de cytokines pro-inflammatoires et aux lésions vasculaires. L'étude de Kowaliuk a démontré une augmentation de l'expression de p50, un régulateur de NF-κB en phase chronique après 150 jours post-irradiation (mais pas de p65 augmenté que en aiguë). Ces résultats suggèrent bien une inflammation chronique, car NF-κB est impliqué dans la production de cytokines et le recrutement des cellules immunitaires (Kowaliuk et al. 2020).

L'inflammation chronique joue un rôle central dans l'acquisition et l'évolution de la CRC, ainsi que dans de nombreuses maladies chroniques. Ce qui n'est pas décrit dans la CRC et qui est pourtant la principale caractéristique de l'inflammation chronique est la présence importante de macrophages et de lymphocytes, y compris les lymphocytes B, les plasmocytes et les lymphocytes T. Mais la présence de mastocytes en phase précoce et tardive pourrait sous-entendre que l'inflammation chronique participe à l'origine de l'apparition de la maladie. Il est difficile de savoir si l'inflammation est à l'origine de l'apparition des lésions tardives ou si elle est la conséquence des lésions de l'urothélium. En plus des mastocytes, il est donc possible que l'inflammation chronique implique des macrophages et des lymphocytes T comme dans diverses pathologies radio-induites.

C.3.2.4 La neuro-inflammation : La cause des spasmes et des douleurs ?

Le compartiment nerveux a un rôle très important lors de la miction, ordonnant aux muscles détrusors de se contracter pour vider la vessie. La cystite radique est associée à un trouble fonctionnel entre le système nerveux et la vessie générant des contractions aléatoires et incomplètes (phénomène de la vessie hyperactive), ce qui contribue à l'incontinence, mais aussi à la douleur exprimée par les patients. L'étude de Crowe a étudié de nombreuses fibres nerveuses chez le rat 6 mois post-irradiation pour une dose de 15 ou 25 Gy (en dose unique). Il s'agit de la seule étude trouvée dans la littérature s'intéressant aux fibres nerveuses après irradiation de la vessie et en chronique. Dans la vessie, la majorité des animaux des nerfs contenaient du neuropeptide Y (NPY), du peptide lié au gène de la calcitonine (CGRP pour Calcitonin Gene-Related Peptide), du polypeptide intestinal vasoactif (VIP pour Vasoactive Intestinal Peptide), de la substance P (SP) et de la tyrosine-hydroxylase (TH) sont exprimés dans la lamina propria et à la base de l'urothélium. Des nerfs périvasculaires ont été observés contenant de la TH. Après irradiation une augmentation de la densité de ses nerfs a été observée. De plus, leurs densités étaient plus importantes autour et dans l'urothélium à 6 mois post-irradiation (Crowe et al. 1996).

Cette étude permet de nous éclairer sur le rôle des fibres nerveuses. Ces fibres semblent très associées à l'urothélium et leur augmentation et la neuro-inflammation pourraient induire une sur activation des nerfs afférents entrainant des contractions

involontaires et incomplètes comme observée dans de nombreuses études. L'urothélium étant en contact étroit avec les fibres musculaires et les nerfs par le biais des télocytes. De plus, l'augmentation de la substance P et de CGRP indiquerait une augmentation de la douleur, symptôme retrouvé chez les patients. Des études complémentaires doivent être effectuées pour mieux comprendre ces mécanismes et leurs liens avec l'inflammation.

C.3.2.5 La fibrose : un acteur essentiel dans le maintien de la CRC et dans les symptômes cliniques

La fibrose est un acteur essentiel dans le maintien de la CRC et dans les symptômes cliniques. La fibrose est une accumulation anormale et désordonnée de la Matrice Extracellulaire (MEC). Cette accumulation va induire une augmentation du ratio MEC/muscles. Il en résulte une diminution de la capacité contractile et une rigidification du tissu. Dans la vessie, cela se traduit par des incontinences, des urgences et des pollakiuries. D'une manière générale la fibrose se distingue en 3 phases, l'initiation, la progression et la fibrose établie. Nous étudierons dans un premier temps les mécanismes mis en place dans la fibrose radio-induite, puis nous décrirons les mécanismes découverts dans la CRC.

L'initiation : Lors de l'inflammation chronique, de grandes quantités de cellules immunitaires sont recrutées, produisant de nombreuses cytokines dont TGF-β. Cette molécule est un point clé de la fibrose. Elle permet d'induire le changement de phénotype des cellules pro-inflammatoires vers un phénotype anti-inflammatoire (Sanjabi et al. 2009; Zhang et al. 2016). Les cellules Th1 (lymphocyte T helper de type 1) pro-inflammatoires vont acquérir un phénotype anti-inflammatoire Th2 sécrétant un ensemble de cytokines, dont les interleukines anti-inflammatoires IL-4, IL-10 et IL-13, associées au remodelage de la MEC (Kaviratne et al. 2004). Th17 est un facteur important de la fibrose (Bessout et al. 2015; Feng et al. 2009; Wilson et al. 2010). Les Treg peuvent favoriser la fibrose (Estes et al. 2007; Liu 2010) ou l'inhiber (Claassen et al. 2010; Kotsianidis et al. 2009). Dans les lésions tardives, l'apoptose, les ROS, l'hypoxie permanente induisent le recrutement des cellules pro-inflammatoires. Les cellules sénescentes restent présentes, continuant à produire des cytokines pro-inflammatoires. L'emballement des ROS par la réaction inflammatoire ne peut plus être arrêté par les antioxydases (SOD, Nrf2, GS (Glutathione Synthetase), GSH (reduced Glutathione Synthetase). Une augmentation de l'apoptose est observée, continuant l'émission de signaux

pro-inflammatoires. Il en résulte une accumulation de cellules pro et anti-inflammatoires dans le tissu conduisant à la fibrose.

La progression : L'accumulation de cellules immunitaires et notamment des macrophages M2 conduit à la production importante de TGF-β. Le TGF-β va induire la cascade des SMAD. Plus particulièrement SMAD 2 et 3 seront phosphorylés, ce qui permet la fixation de SMAD 4. Cette cascade va induire des gènes liés à la transition fibroblaste en myofibroblaste, à l'EndoMT (transition endothélium mésenchyme) et à l'EMT (transition épithélium mésenchyme) (Piera-Velazquez and Jimenez 2019). L'EndoMT est un processus qui induit la commutation des cellules endothéliales en myofibroblastes. Les myofibroblastes sécrètent de grandes quantités de collagène I et III qui sont les principaux composants de la MEC (Klingberg et al. 2013). L'EMT est un processus similaire à l'EndoMT. Elle concerne les cellules épithéliales. Ce changement de phénotype vers un profil de myofibroblastes contribue comme l'EndoMT à la production de MEC (Gonzalez and Medici 2014).

L'ensemble de ces voies induit une augmentation des myofibroblastes qui vont produire de la MEC. Durant la phase de progression seule, quelques plaques de fibrose sont visibles.

Fibrose établie : Dans la fibrose, l'inflammation persiste et les myofibroblastes sont activés en permanence induisant à de grandes quantités de MEC. De plus, le remodelage incessant de la MEC par les TIMPs (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloprotease)/MMPs (produits par les macrophages (M2 principalement), les neutrophiles et les myofibroblastes eux-mêmes induisent une densification et une rigidification de la MEC. L'accumulation de la MEC rend le tissu hypocellulaire en induisant l'apoptose des cellules entrainant la perte de fonctionnalité du tissu et induit sa rigidité. Un envahissement des muscles par la MEC est observé, diminuant la capacité contractile du tissu (figure 11).

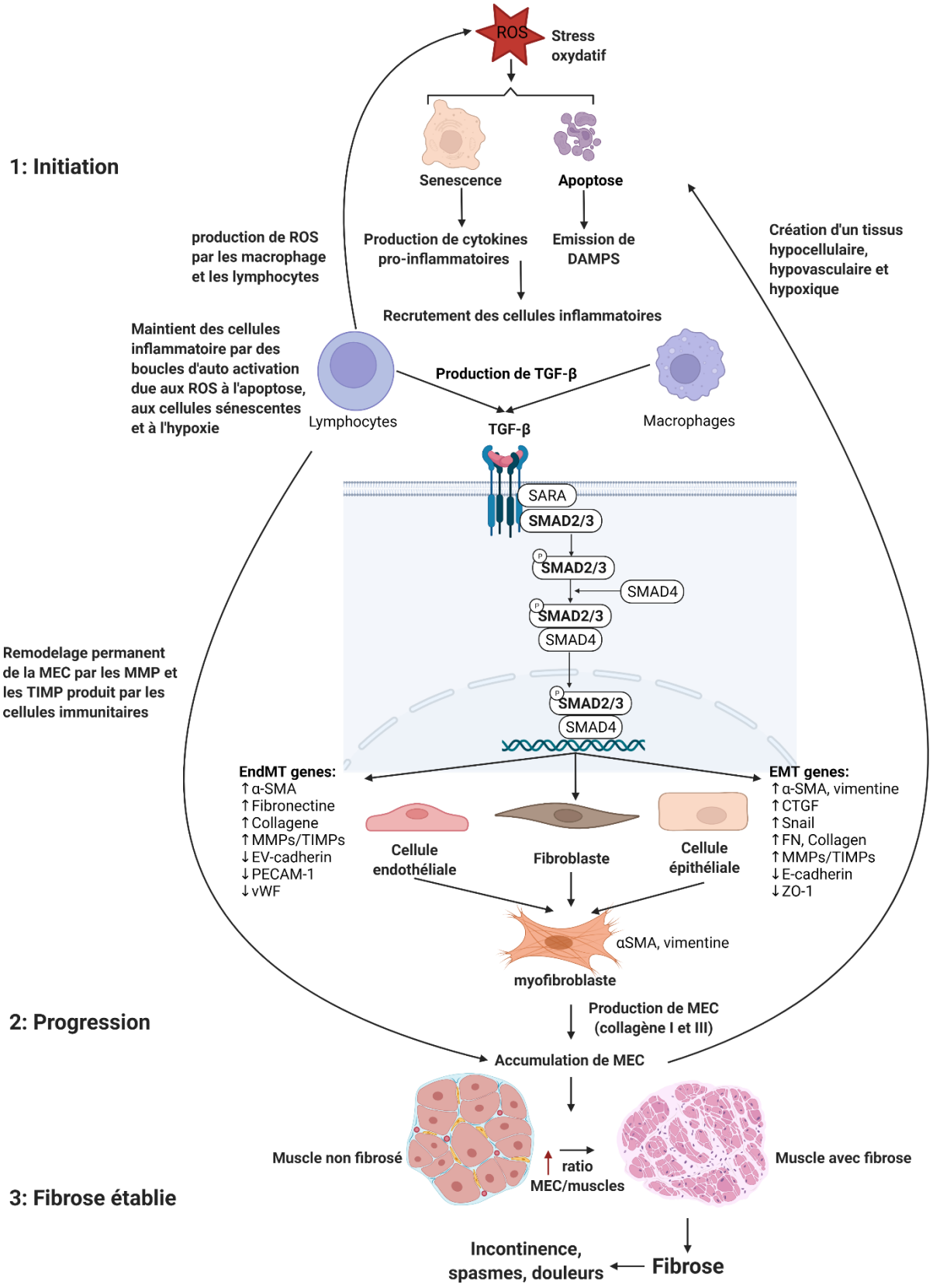


Figure 11 : Initiation, progression et installation de la fibrose radio-induite

Dans les tissus irradiés, la fibrose est étroitement associée et se superpose à l'inflammation. Dans tous les modèles étudiant la fibrose, une augmentation de la densité du collagène a été observée, ainsi qu'une infiltration de la matrice extracellulaire (MEC) dans la partie musculaire. La fibrose est un problème clé dans le maintien de la CRC.

La rigidification des tissus va contribuer aux problèmes de contractilité de la vessie. Ces deux facteurs favorisent les lésions vasculaires, notamment en provoquant la rupture de ces vaisseaux, créant une hématurie et générant à nouveau une inflammation. Le facteur de croissance transformant bêta (TGF-β 1) est un contributeur majeur à la fibrose dans la cystite radique chronique. L'étude de Kraft (Kraft et al. 1996) montre que le TGF-β1 est fortement exprimé dans l'urothélium et la sous-muqueuse, et de façon diffuse dans les couches musculaires. Globalement, les études ont révélé que la libération de TGF-β1 est corrélée à la dose d'irradiation et au temps post-irradiation. L'augmentation du collagène a été étudiée dans plusieurs modèles.

L'étude publiée par Kraft et al. a montré une augmentation de l'expression des collagènes I et III dans les tissus et principalement dans la sous-muqueuse et le muscle à partir de 180 jours (six mois) après l'irradiation (Kraft et al. 1996). Cependant, le rapport collagène I/III diffère selon les souches de souris (Zwaans et al. 2020). L'étude réalisée avec la souche C3H/HeN Af- nu+ a montré une diminution de ce rapport alors que la souche C3H/Neu a montré une augmentation. Le collagène de type I est important pour la cicatrisation, l'élasticité et le maintien du tissu conjonctif. Le collagène III est le principal constituant de la matrice extracellulaire. Une modification du ratio pourrait indiquer la présence d'un tissu cicatriciel.

Dans le modèle de Zwaans et al, une augmentation de la densité des fibres de collagène a été mise en évidence, mais pas de leur longueur ou de leur diamètre chez les souris un an après une irradiation à une dose unique de 40 Gy. Une augmentation des cellules I et III positives pour le collagène a été observée chez les souris C57BL/6, mais pas chez les souris CH3 et BALB/c. Il est important de souligner que la souche de la souris joue un rôle essentiel dans la réponse à la fibrose radio-induite (Zwaans et al. 2016; Zwaans et al. 2020). La fibrose a été mesurée chez les souris CH3/HeN 130 jours après l'irradiation (environ quatre mois) pour une dose unique d'irradiation de 20 Gy (Zwaans et al. 2016; Zwaans et al. 2020).

Dans l'étude de Soler et al, une augmentation du ratio collagène/muscle a été mise en évidence trois mois après l'irradiation chez des rats Lewis pour une dose unique de 20 Gy (Soler et al. 2011). Les coupes histologiques ont révélé une infiltration de la matrice extracellulaire entre les fibres musculaires. De plus, cette augmentation était homogène dans les trois parties de la vessie (dôme, corps et trigone) (Soler et al. 2011). Dans le modèle utilisé par Ikeda et al. la fibrose était également visible 60 jours après l'irradiation (Ikeda et al. 2018).

Le muscle altéré induit un déficit de contractilité, et augmente la fréquence de la miction ainsi que la diminution du volume de la miction. Un dépôt excessif de matrice extracellulaire (MEC) nuit à la fonction musculaire et à la régénération musculaire après une irradiation. La compréhension par lequel les facteurs profibrotiques activent la fibrose musculaire est une étape essentielle pour développer des traitements anti-fibrotiques. Selon Ikeda et al, l'augmentation de la densité du collagène et l'invasion de la matrice extracellulaire dans les muscles entraînent une perte de la capacité contractile des muscles et de la vessie. Il en résulte des contractions incomplètes, soudaines et involontaires de la vessie (Ikeda et al. 2018). D'après les études de Stewart et al. et de Zwaans et al. la perte de contractilité entraîne une augmentation de la fréquence des mictions, mais pas de changement du volume d'urine. L'importance de l'incontinence augmente avec la dose d'irradiation, mais pas avec le moment de son apparition, qui se produit entre quatre mois et un an après l'irradiation (Bentzen 2006; Dorr and Kraft 1997; Dorr and Beck-Bornholdt 1999; Ikeda et al. 2018; Jaal et al. 2004; Kohler et al. 1992; Kowaliuk et al. 2020; Kraft et al. 1996; Post et al. 1995; Stewart et al. 1978; Stewart et al. 1980; Stewart et al. 1981; Stewart et al. 1984; Stewart 1985, 1986; Stewart et al. 1991; Vale et al. 1993; Zwaans et al. 2016). Dans l'étude de Stewart, l'augmentation des fréquences urinaires est corrélée à une diminution du volume total de la vessie (Kraft et al. 1996; Stewart et al. 1978; Stewart et al. 1980; Stewart et al. 1981; Stewart et al. 1984; Stewart 1985, 1986; Stewart et al. 1991), (figure 12).

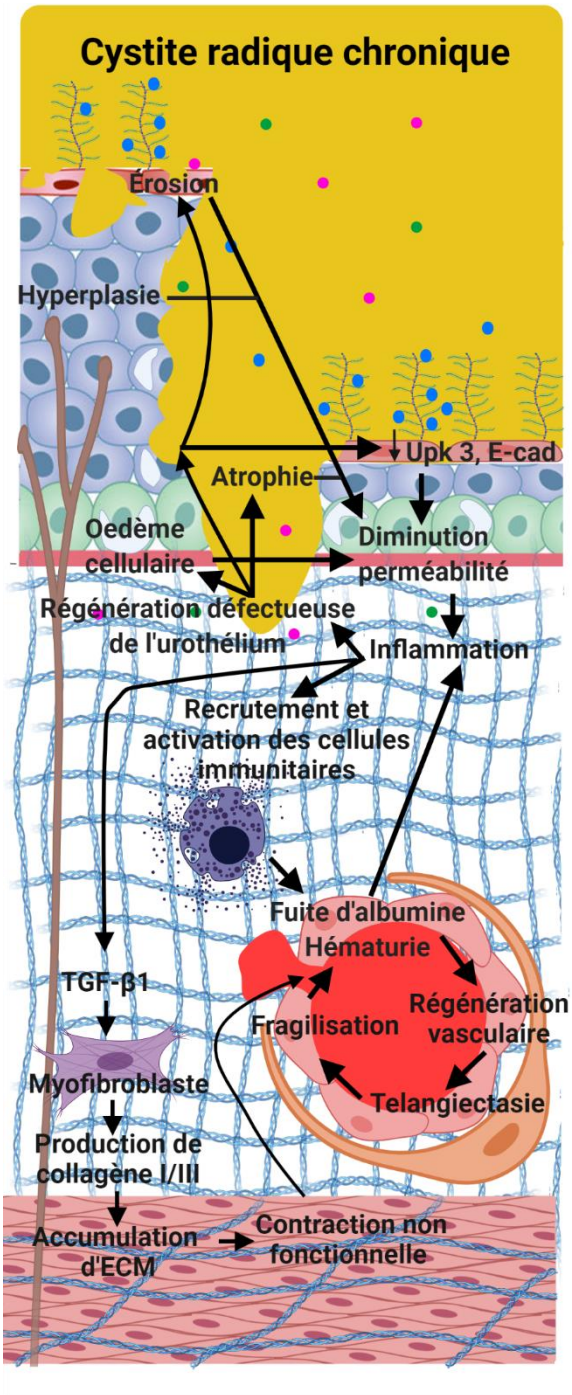


Figure 12 : Mécanisme mis en place dans la CRC

C.3.2.6 Conclusion

En conclusion, l'étiologie de la CRC est mal comprise et principalement liée à la dégradation de l'urothélium et aux hémorragies. Le nombre limité d'études précliniques empêche une compréhension approfondie de cette pathologie. En outre, les études portent

principalement sur la télangiectasie, la fibrose, l'hématurie et la perte de la fonction vésicale. Le processus moléculaire reste mal décrit en termes d'inflammation et d'atteinte du muscle détrusor (figure 12 et 13).

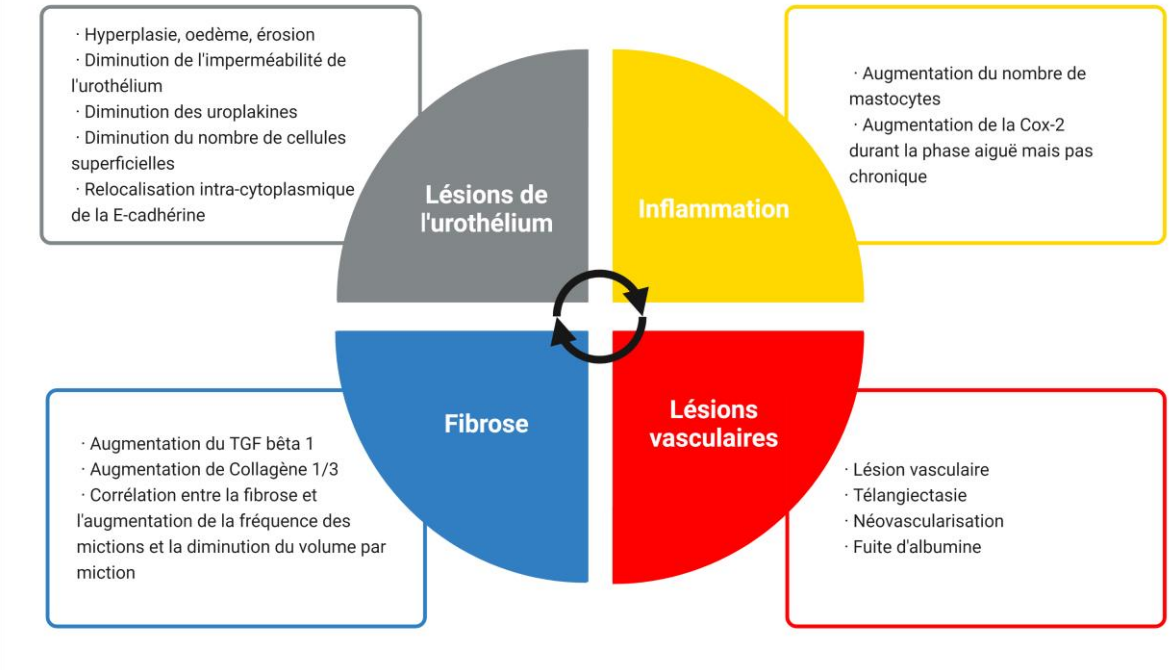


Figure 13 : Schéma de l'amplification de la réponse dans la CRC

Tableau 6 : Liste des études précliniques sur la cystite radique chronique

Auteur	Date de publication	Modèle	Dose	Source d'irradiation	Temps de l'étude	Principales caractéristiques étudiées	Moyen utilisé	Résultats principaux
STEWART, F. A. (Stewart et al. 1978)	1978	Souris femelle CBA	Dose unique de 10 à 40 Gy (incrémentation de 5 Gy)	Accélérateur linéaire (1,8 MeV, 75 impulsions/sec). 112,5 Gy/min	Tous les mois (pendant 16 mois)	Mictions	Cage métabolique	Augmentation de la fréquence urinaire avec la dose d'irradiation.
STEWART, F. A .(Stewart et al. 1980)	1980	Souris (probablement CBA)	Dose unique de 10 à 40 Gy (incrémentation de 5 Gy)	Accélérateur linéaire (1,8 MeV, 75 impulsions/sec). 112,5 Gy/min	3, 7, 9, 12, 19 et 22 mois	Régénération de l'urothélium Régénération de l'endothélium	Marquage au tritium Marquage au tritium	Augmentation de la vitesse de régénération de l'urothélium entre 6 et 22 mois inversement proportionnelle à la dose. Augmentation de la vitesse de régénération de l'endothélium entre 6 et 22 mois inversement proportionnelle à la dose.
STEWART, F. A. (Stewart et al. 1981)	1981	Souris femelle CBA	Dose unique ou part fraction : 2 (24 heures) et 5 fractions (4 jours) Dose unique : 15 à 32,5 Gy (incrémentation de 2,5 Gy) Dose pour 2 fractions : 22,5 à 37,5 Gy (incrémentation de 5 Gy) Dose pour 5 fractions : 30 à 55 Gy (incrémentation de 5 Gy)	Accélérateur linéaire (1,8 MeV, 75 impulsions/sec). 112,5 Gy/min	6 à 15 mois (1 fois par mois)	Mictions Capacité de la vessie	Cage métabolique	Augmentation de la fréquence urinaire avec la dose d'irradiation, mais diminution de la fréquence urinaire avec le nombre de fractions à partir de 12 mois. Réduction progressive de la capacité de la vessie proportionnelle à la dose et augmentation de la capacité proportionnelle au nombre de fractionnements à partir de 12 mois.
STEWART, F. A. (Stewart et al. 1984)	1984	Souris femelle CBA/Ht Gy f BSVS	Fractionnement : 1, 5, 10 ou 20 fractions (dose égale par fraction répartie sur 1 à 2 semaines (condition 20 fractions = 2 fractions par jour séparées de 5h)) Dose d'irradiation pour 1 fraction : 20, 25 et 30 Gy. Pour 5 fractions : 35, 45, 55 et 60 Gy. Pour 10 fractions : 45, 55, 65 et 75 Gy. Pour 20 fractions : 50 à 90 Gy (incrémentation de 10 Gy)	Accélérateur linéaire (1,8 MeV, 75 impulsions/sec). 112,5 Gy/min	9, 10, 11, 13, 14 mois	Mictions Capacité de la vessie	Cage métabolique	Augmentation de la fréquence urinaire avec la dose d'irradiation, mais diminution de la fréquence urinaire avec le nombre de fractions à partir de 10 mois. Réduction progressive de la capacité de la vessie proportionnelle à la dose et augmentation de la capacité proportionnelle au nombre de fractionnements à partir de 10 mois.

STEWART, F. A. (Stewart 1985)	1985	Souris femelle CBA/Ht Gy f BSVS	dose unique de 15 à 32,5 (incrément de 2,5 Gy)	accélérateurs linéaires (1,8 MeV, 75 impulsions/sec). 112,5 Gy/min	16 mois (1 fois par mois)	Mictions Régénération urothélium Régénération endothélium	Cage métabolique Marquage au tritium Marquage au tritium	Augmentation des fréquences urinaires à partir de 7 mois et proportionnelles à la dose d'irradiation. Peu de régénération de l'urothélium dans les 3 premiers mois après irradiation. Peu de régénération de l'endothélium dans les 3 premiers mois après irradiation.
Knowles J.F (Knowles 1985)	1985	Rat femelle Wistar	Dose unique 23,4 ou 37,4 Gy pour l'urètre et 25 ou 40 Gy pour le trigone	Rayon X 300kV, 15mA	300 jours	Hydronéphroses et hydro-uretère	Urographie et radiographie	Irradiation de l'uretère à 37,4 Gy à entrainer la mort avant 40 jours à cause de lésions intestinales, mais pas à 23,4 Gy, mais le développement d'une hydronéphrose après 49 jours (87,5%). Pas de décès à 25 ou 40 Gy pour l'irradiation de la vessie. 82 et 100% des rats présentaient une hydronéphrose pour des doses respectives de 25 et 40 Gy. L'hydronéphrose se développait après 42 jours.
STEWART, F. A. (Stewart et al. 1986)	1986	Souris femelle CBA/Ht Gy f BSVS	**Electron :** 1 fraction : 17.5, 22.5, 25, 30 Gy 2 fractions : 22,5, 27.5, 32.5, 37.5 Gy 4 fractions : 35, 45, 55 Gy; 8 fractions: 35, 45, 55, 65 Gy **Neutron :** 1 fraction : 7, 8, 9, 10 Gy 2 fractions : 7.5, 9, 11, 12.5 Gy 4 fractions : 8, 10, 12, 14 Gy 8 fractions : 8, 10, 12, 14, 16 Gy	Accélérateur linéaire électron 1,8 MeV ou neutron 3 MeV	9 à 14 mois (1 fois par mois)	Mictions	Cage métabolique	Augmentation de la fréquence urinaire avec la dose d'irradiation, mais diminution de la fréquence urinaire avec le nombre de fractions à partir de 9 mois. Les irradiations avec électron sont moins dommageables.
Lundbeck F (Lundbeck et al. 1989a)	1989	Souris femelle C3D2F1 (C3H/Tif x DBA/2)	Dose unique 5, 10, 15, 20, 25, 30 Gy	Rayon X 250 kV	1 an	Fonctionnement de la vessie	Cystométrie	Diminution dose dépendante de la capacité vésicale. Survie dose dépendante.
Lundbeck F (Lundbeck et al. 1989b)	1989	Souris femelle C3D2F1 (C3H/Tif x DBA/2)	Dose unique 20 Gy	Rayon X 250 kV	1 an	Fonctionnement de la vessie	Cystométrie	Diminution de 50% de la capacité vésicale en aiguë (<30 jours), puis phase de latence puis réponse chronique après 200 jours.

STEWART, F. A. (Stewart et al. 1990)	1990	Souris femelle C3H/Hen Af-nu+	Dose de 8 ou 16 Gy répétés à 1 jour, 3 ou 9 mois	Rayon X 250 kV	30 semaines	Fréquence urinaire	Cystométrie	Dommages fonctionnels après 2 semaines suite à la ré-irradiation à 9 mois pour une dose de 16 Gy. Pas d'effet à 8 Gy. La tolérance à la réirradiation est inversement proportionnelle à la dose du premier traitement.
STEWART, F. A. (Stewart et al. 1991)	1991	Souris femelle C3H/Hen Af-nu+	Dose unique de 10, 15, 20, 25, 27,5 et 30 Gy	Rayons X 250 kV, filtrés à 0,5 mm Cu, à 15 mA. À de 2,1 Gy/min	Jour 5, 12, 19 puis toutes les 4 à 6 semaines (sur 53 semaines)	Fréquence urinaire Volume max de la vessie Urothélium	Cage métabolique Cystoscopie Histologie	Augmentation de la fréquence urinaire en fonction du temps (phase aiguë le 1er mois) et proportionnelle à la dose. Diminution du volume max de la vessie en fonction du temps (phase aiguë le 1er mois) et proportionnelle à la dose. Dénudation épithéliale et hyperplasie focale, avec fibrose et ulcération.
Bentzen S.M (Bentzen et al. 1992)	1992	Souris femelle C3D2F1 (C3H/Tif x DBA/2)	Dose unique : 5, 10, 15, 20, 25, 30 Gy 2 fractions : 16, 18, 20, 22, 24, 28 Gy 3 fractions : 21, 33, 39, 45 Gy 5 fractions : 20, 25, 30, 35, 40 Gy 10 fractions : 30, 40, 45, 50, 55, 60 Gy	Rayon X 250kV, 3,1 mm Cu, 2,3 Gy/min	401 jours	Fonctionnement de la vessie	Cystométrie	Diminution de 50% après 35 jours. Plus l'irradiation était forte, plus les lésions étaient précoces et plus le fractionnement a été élevé et plus les lésions étaient tardives. a/b ratio de 5,8 Gy.
kohler M (Kohler et al. 1992)	1992	Lapin mâle de Nouvelle-Zélande	Dose fractionnée sur 5 jours consécutifs (1 fois/jour) pour un total de 33, 36 et 39 Gy Irradiation vessie entière ou la moitié de la vessie côté crânial ou caudale	Rayons X de 300 kV 0,8 Gy/min (isovolt 3002 de Seifert; filtration: 1.0 mm Al)	100 semaines	Mictions	Cage métabolique	Augmentation de la fréquence des mictions diminution du volume max durant 100 semaines pour les doses 39 Gy ou 36 Gy (irradiation vessie totale), et à partir de 20 semaines pour l'irradiation sur la moitié de la vessie (39 Gy à la partie crânienne de la vessie et 39 Gy ou 36 Gy à la partie caudale).
Vale J.A (Vale et al. 1993)	1993	Rat femelle Wistar	Dose unique de 10, 15, 20 et 25 Gy	Rayons X Pantak 300 kV et 10 mA, 1,72 Gy/min	6 mois	Fonctionnement de la vessie Inflammation Fibrose Neuro-inflammation	Cystométrie Histologie	La première réduction de la capacité vésicale se développe à environ 4 semaines, et la seconde débute 3-4 mois et persiste jusqu'à 6 mois. Augmentation de la densité des mastocytes a 6 mois (non statistique). Augmentation de la fibrose (dans 50% des rats) avec dégénérescence focale des cellules musculaires lisses. Dégénération des fibres non myélinisées.

kohler M (Kohler et al. 1995)	1995	Lapin mâle de Nouvelle-Zélande	Dose fractionnée sur 5 jours consécutifs (1 fois/jour) pour un total de 33, 36 et 39 Gy. Irradiation vessie entière ou la moitié de la vessie côté crânial ou caudale	Rayons X de 300 kV 0,8 Gy/min (isovolt 3002 de Seifert; filtration: 1.0 mm Al)	100 semaines	Altération des tissus	Histologie	Hyperplasie ou atrophie de l'urothélium proportionnel à la dose et plus marqué au niveau du corps de la vessie et du trigone, les tissus sous-muqueux et musculaires présentaient une fibrose dose dépendante et des modifications des vaisseaux sanguins et lymphatiques, le corps et le trigone sont plus sensible aux radiations (plus de fibrose, de modification des vaisseaux).
Post G.J avec Stewart (Post et al. 1995)	1995	Souris femelle C3H/Hen Af-nu+	Dose unique de 10, 15, 20, 22.5, et 25 Gy	Rayons X 250 kV, filtrés à 0,5 mm Cu, à 15 mA, 2,1 Gy/min	1, 2 et 4 semaines après l'irradiation puis mensuelles jusqu'à 61 semaines (irradiation lors de la semaine 4 ou 12)	Fréquence urinaire Volume par miction Volume max de la vessie	Papier absorbant (15 cm/h) Tablette de numérisation (Calcomp B.V., Amstelveen, Pays-Bas) avec un programme spéciale Cystoscopie	Augmentation de la fréquence en phase aiguë les 4 premières semaines, et tardif à partir de 15 à 37 semaines (proportionnelle à la dose). Réduction du volume par miction entre 52 et 56 semaines pour 25 Gy. Diminution du volume total de la vessie en fonction de la dose.
Kraft M avec Stewart (Kraft et al. 1996)	1996	Souris femelle C3H/ Souris femelle C3H/Hen Af-nu+	Dose unique de 19 Gy . Dose unique de 25 Gy et 14 Gy	.Seifert Isovolt 320 300kV, 5,3 Gy/min .Seifert Isovolt 320 250kV 2,1 Gy/min	90 à 360 jours	Fonctionnement de la vessie Fibrose Urothélium	Cystoscopie Immunohistochimie Histologie	Corrélation entre la diminution du volume max de la vessie et l'expression du TGFβ et des collagènes, diminution du volume total de la vessie. Augmentation de l'expression protéique dans le tissu de TGF-β (dans les deux souches) en fonction du temps et de la dose, augmentation des collagènes I et III à partir de 180 jours après l'irradiation, mais diminution du rapport collagène I/III chez les souris C3H/Hen Af-nu+ et augmenté chez les souris de CH3/Neu. Dénudation ou hyperplasie plus importante en fonction de la dose, œdème.
Crowe R (Crowe et al. 1996)	1996	Rat	Dose unique de 15 et 25 Gy	Pantak HF 320 X-ray generator	6 mois	Système nerveux	Immunohistochimie	Les animaux témoins contenaient du NPY, puis du CGRP, VIP, SP et TH. Des nerfs SP, CGRP, TH et parfois VIP ont été observés dans la lamina propria, à la base de l'urothélium. Des nerfs périvasculaires contenant des neuropeptides et de la TH ont été observés dans toute la paroi de la vessie. Il y avait une absence de nerfs immunoréactifs m-ENK-, l-ENK- et SOM dans les vessies témoins et irradiées du rat. Dans la vessie du rat irradiée 25 Gy, il y avait une augmentation de la densité des nerfs immunoréactifs NPY, TH et SP, mais pas CGRP et VIP. Il y avait des différences régionales dans

								la vessie, c'est-à-dire qu'il y avait une augmentation des nerfs immunoréactifs VIP, CGRP et SP autour et dans l'urothélium. Des nerfs immunoréactifs NPY ont été observés dans le tissu conjonctif. Une augmentation de la densité ou de l'intensité de fluorescence des nerfs périvasculaires contenant des TH, mais non des neuropeptides.
Dörr W (Dorr and Kraft 1997)	1997	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique de 19 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machin+E14:H14e (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 300kV, 5,3 Gy/min	250 jours	Fonctionnement de la vessie	Cystométrie Immunohistochimie	Diminution du volume urinaire jusqu'à 30 jours. Diminution progressive du volume urinaire à partir de 15 semaines. Altération importante de la fonction vésicale durant la phase diurne.
Dörr W (Dorr and Bentzen 1999)	1999	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique 13, 16, 18, 20 et 23 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machin+E14:H14e (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 300kV, 5,3 Gy/min	0 à 360 jours	Fonctionnement de la vessie	Cystoscopie	Diminution du volume urinaire en fonction du temps et en fonction de la dose. Plus la dose et faible et le fractionnement important plus les lésions chroniques sont tardives.
Jaal J (Jaal et al. 2004)	2004	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique de 20 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	2, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 jours (précoce), puis aux jours 90, 120, 180, 240 et 360 (tardif) après l'irradiation	Fonctionnement de la vessie Urothélium	Cystométrie Immunohistochimie	Réduction de la capacité de la vessie de 50 % chez 40 % des animaux irradiés entre les jours 0 et 15, 64 % des animaux entre les jours 16 et 30. En tardif, 71% des animaux présentions une réduction de la capacité vésicale après le 180e jour. Augmentation de l'expression d'ICAM au deuxième jour, avec un maximum au quatrième jour et un retour aux valeurs de contrôle au jour 13. Augmentation permanente du signal de coloration de l'ICAM-1 a été observée dans la phase tardive, du 90e au 360e jour après l'irradiation.

Jaal J (Jaal and Dorr 2006b)	2006	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique de 20 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	2, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 jours (précoce), puis aux jours 90, 120, 180, 240 et 360 (tardif) après l'irradiation	Vasculaire	Immunohistochimie	Augmentation de l'expression de COX-2 dans la paroi des vaisseaux sanguins durant la phase précoce (4 à 16 jours), mais pas dans la phase tardive.
Jaal J (Jaal and Dorr 2006c)	2006	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique de 20 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	2, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 jours (précoce), puis aux jours 90, 120, 180, 240 et 360 (tardif) après l'irradiation	Urothélium	Immunohistochimie	Diminution des cellules superficielles en phase précoce (jour 0 à 31) jusqu'au début de la phase tardive (90 à 120 jours), perte progressive de l'expression de l'Uroplakine III à la surface des cellules corrélé à la perte des cellules superficielles, mais augmentation de l'expression cytoplasmique de l'Uroplakine III dans les cellules superficielles jusqu'au début de la phase tardive (120 jours).
Jaal J (Jaal and Dorr 2006a)	2006	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique de 20 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	2, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 jours (précoce), puis aux jours 90, 120, 180, 240 et 360 (tardif) après l'irradiation	Fibrose Vasculaire	Histologie Immunohistologie	Infiltration de l'albumine autour des petits vaisseaux sanguins en phase précoce et tardive. Augmentation du dépôt des collagènes dans la vessie.
Jaal J (Jaal and Dorr 2010)	2010	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique de 20 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	de 0 à 360 jours	Prolifération de l'urothélium	Histologie	Diminution du nombre de cellules total de l'urothélium à 13 jours, suivis d'une légère récupération le jour 22 et d'une deuxième diminution de 49% à 31 jours. Diminution du nombre total de cellules à 90 et 120 jours avec une restauration apparente de l'urothélium au jour 180. En revanche, au jour 360, une augmentation du nombre total de cellules a été observée (143%). Pas de changement de l'expression de Ki67 jusqu'à j35, puis augmentation jusqu'à j360. Augmentation de l'expression d'EGFR jusqu'à j 360. Augmentation de l'expression urothéliale de l'EGFR (dans les cellules basales) qui précède la restauration urothéliale, ce qui indique une contribution du système EGF/EGFR à la prolifération et à la différenciation urothéliales.
Soler R (Soler et al. 2011)	2011	Rats Lewis femelle	Dose unique de 20 Gy	Irradiation au Cesium (environ 4 Gy/min)	1,5 et 3 mois	Fibrose Lésion vasculaire	Histologie, Histologie et transcriptomie	Augmentation des collagènes à 3 mois dans le muscle avec fibrose et surexpression du gène TGF-β à 3 mois.

								Diminution du nombre de vaisseaux sanguins à 1,5 et 3 mois préférentiellement dans le dôme, sans augmentation de l'expression du gène VEGF.
Zwaans B M M (Zwaans et al. 2016)	2016	Souris femelle C3H/HeN	Dose unique de 20 Gy	Small Animl Radiation Research Plateforme (SARRP), 2 Gy/min 220 kV et 13 mA	19 semaines	Mictions Fibrose Urothelium Inflammation	Cage métabolique Histologie Immunohistologie Histologie	Augmentation de la fréquence urinaire avec diminution du volume par miction. Augmentation de la fibrose. Diminution de l'expression d'Upk III, de l'E-cadhérine et de CD31, hyperplasie. Augmentation des mastocytes.
Ikeda Y (Ikeda et al. 2018)	2018	Souris femelle C57Bl/6	Dose unique de 10 Gy, vessie extériorisée	X-RAD 320 biological irradiator (Precision X-Ray, North Branford, CT), debit dose non donné	1, 2, 4, 6 et 9 et 12 semaines	Mictions Contraction de la vessie Fibrose	Papier-filtre Whatman Electromyogramme Histologie	Augmentation de la fréquence urinaire / incontinence 9 semaines après irradiation. Diminution de la contractilité et de la compliance, augmentation de la tension passive 9 semaines après irradiation. Augmentation du dépôt de collagène (modifie la relaxation de la paroi).
Zwaans B M M (Zwaans et al. 2020)	2020	Souris femelle C57BL/6, C3H et BALB/c	Dose unique de 40 Gy	Small Animl Radiation Research Plateforme (SARRP), 2 Gy/min 220 kV et 13 mA	12 mois	Mictions Fibrose Vasculaire	Cage métabolique Histologie, immunohistologie Photos	Augmentation de la fréquence urinaire avec diminution du volume par miction plus important chez C57BL/6. Augmentation de la fibrose, densification des collagènes chez C57BL/6 et BALB/c, augmentation des collagènes I et III que chez C57BL/6. Lésions avasculaires pâles, hémorragies et télangiectasies.
Kowaliuk (Kowaliuk et al. 2020)	2020	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique de 14 à 23 Gy (14, 17, 19, 21, 23 Gy); Traitement à base de thalidomide (inhibiteur de la voie NF-κB)	YXLON MG325 X ray, (YXLON International GmbH, Hambourg, Allemagne), 200 kV, 20mA, vessie à 0,9 cm du champ d'irradiation 1Gy/min à une distance de 45,5 cm	12 mois (analyse une fois par mois)	Fréquence urinaire Inflammation	Cystométrie Immunohistochimie	Diminution proportionnelle de la capacité vésicale en fonction de la dose d'irradiation. Augmentation de l'expression de p50 et p65 au début de la phase de cystite radiologique (jour 1-30). En chronique diminution de l'expression de p65 avec un retour presque à la condition contrôle (légèrement supérieur). Expression continue de p50 en phase chronique à des niveaux identique à la phase aiguë.
Krischak (Krischak et	2021	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique de 23 Gy. Traitement à base de thalidomide (inhibiteur de la	YXLON MG325 X ray, (YXLON	12 mois (analyse une	Urothélium	Immunohistochimie	Augmentation de l'E-cadhérine et de la β-caténine en phase précoce, puis diminution à la fin de la

al. 2021)			voie NF-κB)	International GmbH, Hambourg, Allemagne), 200 kV, 20mA, vessie à 0,9 cm du champ d'irradiation 1Gy/min à une distance de 45,5 cm	fois par mois)			phase précoce pour la β-caténine seulement (30 jours). Augmentation en phase chronique de l'E-cadhérine avec un plateau à 240 jours avec relocalisation dans le cytoplasme. Augmentation de la β-caténine à partir de 180 jours avec un plateau à 240 jours. En phase précoce la thalidomide augmente plus rapidement l'expression de l'E-cadhérine et de la β-caténine pour arriver au même plateau que les irradiés, En phase chronique une augmentation de l'expression de l'E-cadhérine avec expression plus forte sur la paroi cellulaire, peu de différence pour la β-caténine.
Zwaans B M M (Zwaans et al. 2022)	2022	Souris femelle C57BL/6	Dose unique de 40 Gy	Small Animl Radiation Research Plateforme (SARRP), 2 Gy/min 220 kV et 13 mA	3 et 6 mois	Elasticité de la matrice extra cellulaire	Test mécanique de résistance	Des coupes latérales de la partie centrale de la vessie, puis une décellularisation est effectuées. L'irradiation induit une augmentation de la rigidité de la MEC à 6 mois post-irradiation (tendance à 3 mois). Diminution du volume par miction et augmentation de la fréquence urinaire à partir de 3 mois (non significatif) et s'accentue à 6 mois (significatif).

C.4 La cystite interstitielle et hémorragique : Deux cystites aux mécanismes similaires à la CRC : Potentielle explication sur le fonctionnement de la CRC

La cystite interstitielle est une maladie idiopathique à caractère inflammatoire chronique affectant la vessie (tableau 7) dont l''étiologie exacte est inconnue. L'apparition des symptômes et le diagnostic de CI est variable et peut aller de un mois à 30 ans, avec une moyenne d'environ 5 ans (Alagiri et al. 1997; Driscoll and Teichman 2001; Ito et al. 2007; Koziol et al. 1993; Marcu et al. 2018; Peters et al. 2011). La cystite hémorragique est due à une grande variété d'étiologies, notamment la chimiothérapie ou d'autres médicaments, la radiothérapie, les infections bactériennes/virales/fongiques/parasitaires, les toxines, les maladies systémiques et les transplantations d'organes. Pour ces deux pathologies, les principaux symptômes sont la douleur, la pollakiurie diurne et nocturne et les urgences urinaires.

Tableau 7 : Principales caractéristiques de chaque cystite

Pathologies	**Cystite interstitielle**	**Cystite hémorragique** (pas une forme distincte de cystite)	**Cystite radique chronique**
Causes	Maladie idiopathique	Radiothérapie, chimiothérapie (cyclophosphamide et ifosfamide), infections (bactériennes, virales, fongiques et parasitaires), médicaments, toxines, transplantation d'organes	Irradiation pelvienne
Signes	Douleur, Pollakiurie diurne et nocturne, Urgence urinaire		
		Dysurie, Incontinence, hématurie (microscopique à macroscopique grave avec caillots)	
Symptômes	Dyspareunie Troubles digestifs	Forme grave : obstruction urinaire et insuffisance rénale aiguë	
Diagnostique	Examen cytobactériologique, physique ou biopsie		
	Examen urodynamique Cystomanométrie Journal mictionnel Questionnaires	Ultrasons	
Traitements	Médicaments (pentosan polysulfate de sodium, anti-inflammatoire, analgésique ...), injection de toxine botulique A, oxygénothérapie hyperbare, chirurgie.		
	Cystoscopie avec hydrodistension Thérapie comportementale Neuromodulation	Cystoscopie avec fulguration, Instillation intra-vésicale (alun et formol), Évacuation des caillots.	
	Instillation intra-vésicale (DMSO, sulfate de chondroïtine et acide hyaluronique)		Instillation intra-vésicale (DMSO, sulfate de chondroïtine et acide hyaluronique)

C.4.1 Les atteintes de l'urothélium

Au cours de la cystite interstitielle, la muqueuse vésicale subit des modifications telles qu'un amincissement, ainsi qu'une dégradation partielle de la couche de GAG. Ces modifications altèrent la perméabilité, permettant aux solutés urinaires tels que le potassium de s'infiltrer dans la paroi vésicale (Parsons et al. 2005). Une augmentation de la concentration d'ATP ou une diminution du NO peut altérer la fonction de contraction de la vessie (Patnaik et al. 2017). Ces altérations entraînent une augmentation de l'expression du facteur antiprolifératif (APF) et de l'apoptose cellulaire (Homma et al. 2016). Les fonctions de l'APF sont de réguler l'expression de certaines cytokines. L'APF inhibe la prolifération cellulaire et empêche la réparation de la muqueuse vésicale endommagée (Keay et al. 1999). Ces fonctions contribuent à l'augmentation de la perméabilité. L'APF peut également diminuer la formation de jonctions serrées dans les cellules urothéliales (Zhang et al. 2005). Plusieurs études ont montré que les patients atteints de CI ont une muqueuse vésicale réduite ou endommagée (Elbadawi and Light 1996; Hurst et al. 2015; Keay et al. 2014; Lai et al. 2013; Tomaszewski et al. 2001), ainsi qu'une expression réduite des protéines de jonction serrée comme la zona occludens 1 et la E-cadhérine (Liu et al. 2012).

Dans la CH, un dysfonctionnement de la muqueuse vésicale est observé, cependant le mécanisme est différent. Pendant la chimiothérapie, une partie de la cyclophosphamide ou de l'ifosfamide est métabolisée dans le foie en acroléine, qui est ensuite excrétée par le rein et stockée dans la vessie jusqu'à la miction (Lee et al. 2014). Ce métabolite est connu pour être l'agent causal de l'HC induite par la CP (Cox 1979). L'acroléine provoque des dommages qui se manifestent par un œdème sous-épithélial et une ulcération.

Les mécanismes en commun avec la CRC sont l'hyperplasie, l'érosion urothéliale et l'œdème cellulaire. Tous altèrent l'imperméabilité de l'urothélium et permettent à l'urine de s'infiltrer dans le tissu. Dans la CI ces atteintes libèrent du NO et de l'ATP, induisant de l'APF. Ces mêmes facteurs devrait être sécrétées dans la CRC.

C.4.2 L'inflammation et la neuroinflammation

Dans la CI, L'urothélium endommagé déclenche la production de cytokines et de chimiokines inflammatoires tel le facteur des cellules souches (SCF), IL-8, IL-1β, IL-6, TNF-α, NGF et CCL2 (Homma et al. 2016; Jiang et al. 2013; Wang et al. 2017b). Les télocytes sont des acteurs actifs et interviennent précocement dans l'inflammation. Les télocytes et les myofibroblastes produisent des cytokines et d'autres molécules capables de recruter des cellules immunitaires (Albulescu et al. 2015; Cretoiu et al. 2012; Manole et al. 2011).

L'urothélium endommagé provoque une infiltration d'urine et notamment de potassium qui entraîne la dépolarisation des cellules nerveuses et musculaires et l'activation des mastocytes (Parsons et al. 2001). Au cours de ce processus, la libération de neurotransmetteurs par l'urothélium, tels que l'adénosine triphosphate (ATP), l'acétylcholine et l'oxyde nitrique (NO), induit une communication défectueuse entre la muqueuse, la couche musculaire et le système neuronal afférent. Le SCF stimule la prolifération et l'activation des mastocytes (Sant et al. 2007). Cette libération de médiateurs peut expliquer les symptômes douloureux de la CI (Peeker et al. 2000; Theoharides et al. 2001). La tryptase peut provoquer une fuite microvasculaire et réactiver les mastocytes (He and Walls 1997), entraînant des lésions urothéliales supplémentaires, une inflammation chronique et des douleurs (Vanderwinden et al. 2002). L'inflammation induit un œdème, générant une augmentation de volume dans la lamina propria, en particulier dans l'ULP (Gevaert et al. 2011; Gevaert et al. 2015). Ces altérations influenceraient la sensibilité aux modifications de volume et la capacité de réponse aux molécules libérées par les terminaisons nerveuses et par l'urothélium. Cependant, l'épaississement de l'ULP est hétérogène, principalement dans la partie inférieure de l'ULP (Gevaert et al. 2015; Traini et al. 2018; Vannucchi and Traini 2018) et des foyers d'hypersensibilité peuvent alterner avec des foyers d'hyposensibilité, compromettant l'intégration correcte des stimuli associés (Fry and Vahabi 2016). L'augmentation de l'épaisseur de l'ULP oblige le réseau de mailles à s'élargir et pourrait entraîner une augmentation de la distance entre les cellules et les terminaisons nerveuses. L'inflammation chronique est associée à des taux élevés de CRP sérique et à des symptômes du bas appareil urinaire (Chung et al. 2011).

La CH induite par l'acroléine provoque une augmentation des médiateurs pro-inflammatoires (Dantas et al. 2010), de la Cyclooxygénase-2 (COX-2) et des espèces réactives d'azote (NOS pour Nitric Oxide Synthases) dans l'urothélium (Hu et al. 2003b). L'acroléine provoque chronologiquement la production de ROS dans l'épithélium de la vessie (Korkmaz et al. 2007) et induis iNOS, ce qui entraîne une surproduction de NO. La toxicité du NO résulte de la formation de RNS (Virag et al. 2003). La conséquence de la surproduction de ROS et de RNS au cours de l'inflammation est un stress oxydatif, un dommage cellulaire et une mort cellulaire (apoptose/nécrose) (Abo-Salem 2013). NF-κB et la protéine activatrice 1 (AP-1) sont alors induits (Korkmaz et al. 2007). Leur activation induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1β), l'induction d'iNOS et augmente la production de ROS. Ces cytokines provoquent une infiltration de neutrophiles au niveau du site inflammatoire, ce qui peut potentialiser l'inflammation (Dornelas-Filho et al. 2018).

Parmi les mécanismes en commun on retrouve une augmentation du nombre de mastocytes et de l'expression de NF-κB ainsi que des œdèmes.

Les mécanismes étudiés dans la CI permettent de poser des hypothèses de mécanismes pour la CRC. Les lésions de l'urothélium et l'infiltration de l'urée et potassium pourraient induire les cytokines SCF (pouvant favoriser l'hyperplasie), IL-8, IL-1β, IL-6, TNF-α, CCL2. Les mastocytes produiraient du NGF induisant une neuroinflammation et de la tryptase induisant une augmentation de la perméabilité vasculaire et des microhémorragies. Ces microhémorragies induiraient la production de cytokines pro-inflammatoire par l'endothélium favorisant le recrutement de nouveaux mastocytes. Dans la CH des ROS et RNS sont produit induisant une augmentation d'iNOS, de NO et d'AP-1. Dans la CRC aucun des articles trouvés étudies les ROS. Cependant, les irradiations sont connues pour produire des ROS. Si une augmentation des ROS dans la CRC est validée alors il est possible qu'une augmentation d'iNOS, de NO et d'AP-1 soit possible comme dans la CH. Les télocytes pourraient aussi jouer un rôle essentiel dans l'inflammation et la neuroinflammation. Ceux-ci, comme dans la CI, pourrait produire des cytokines et favoriser les atteintes neurales conduisant à des incontinences et des spasmes. De plus, cette action pourrait être renforcée par l'altération du réseau télocyte/myofibroblaste/neurone visible dans la CI.

C.4.3 La réponse vasculaire

Au cours de la CI, le VEGF est fortement concentré dans la vessie. Il provoque une vasodilatation et une angiogenèse immature qui pourrait être responsable de l'hypervascularisation et des glomérulations (Oscarsson et al. 2019). Les glomérulations sont associées à une surexpression de HIF-1α (Patnaik et al. 2017). L'expression de l'IL-16, de l'IL-18, du facteur de croissance β des cellules souches (SCGFβ pour Stem Cell Growth Factor), de la chimiokine attirant les cellules T cutanées (CTACK pour CC chemokine, cutaneous T cell-attracting chemokine), du ligand induisant l'apoptose liée au facteur de nécrose tumorale (TRAIL pour Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand), de la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1), de la protéine 3 de chimiotactisme des monocytes (MCP-3) et de la molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1 (VCAM-1) augmente significativement dans la paroi de la vessie des patients atteints de CI (Corcoran et al. 2013).

Dans le cas d'une cystite hémorragique, une concentration élevée de VEGF a été soulignée, ainsi qu'une régulation positive significative de l'expression du gène ICAM-1 (Sherif et al. 2016). De plus, des niveaux accrus de MCP-1 et de VCAM ont été observés dans un modèle de cystite aiguë induite par la cyclophosphamide chez les rats (Auge et al. 2013).

La réponse vasculaire est un facteur central commun à ces trois pathologies, mais le mécanisme sous-jacent semble différent. Dans ces trois pathologies, l'augmentation d'ICAM-1 est observée ainsi qu'une vasodilatation (associé à des télangiectasies dans la CRC). VEGF et HIF-1α sont des acteurs majeurs de l'angiogenèse retrouvés dans la CI, mais ceux-ci n'ont pas été étudiés dans la CRC. Une des hypothèses pour la CRC serait la production de VEGF pour favorisant les télangiectasies accompagnées d'une augmentation de HIF-1α qui pourrait aussi diminuer les ROS. L'augmentation des mastocytes observé dans les 3 pathologies pourrait, dans la CRC, conduire à la production de tryptase et de PGP-2 (p-GlycoProtein related) favorisant la vasodilatation et la perméabilité vasculaire comme c'est le cas dans la CI et la CH.

C.4.4 La fibrose

La fibrose a été bien décrite dans la CI, mais pas dans la CH. Nous détaillerons donc ci-dessous la fibrose dans la CI.

Les changements profibrotiques progressifs dans la vessie sont médiés par la sécrétion de TGF-β1 qui induisent la transdifférenciation des fibroblastes en myofibroblastes médiant un dépôt excessif de la matrice extracellulaire (collagène I et III, fibronectine) dans la lamina propria et le muscle lisse (Tyagi et al. 2018). Ces changements sont associés à la régulation positive des gènes du collagène I et III (Shen et al. 2016), de la fibronectine (Choi et al. 2018), du TGF-β1 (Tyagi et al. 2009; Wang et al. 2017b), de YKL-40 (Bouchelouche and Nordling 2003; Hanno and Sant 2001; Persu et al. 2010) et à la régulation négative de Sonic haedgeHog (Shh), gènes de la famille WNT (Choi et al. 2018). YKL-40 (également connu sous le nom de CHL3L1 pour chitinase-3-like protein 1) est exprimé dans les granules des mastocytes du détrusor et les macrophages sous-muqueux, amplifiant la fibrose (Bouchelouche and Nordling 2003; Hanno and Sant 2001; Persu et al. 2010). En outre, les télocytes exprimant à la fois PDGFRα et α-SMA sont significativement augmentées, ce qui suggère un changement vers un phénotype myofibroblastique (Cretoiu D 2019; Faussone-Pellegrini and Gherghiceanu 2016). Ce changement pourrait contribuer à la production de la matrice extracellulaire renforçant alors la fibrose. La fibrose et l'inflammation (avec œdème) contribuent à cet élargissement des mailles du réseau, ce qui favorise les spasmes et l'incontinence en raison d'une communication perturbée entre les télocytes et les fibres nerveuses.

De nombreux mécanismes de la fibrose sont en commun avec la CRC. L'augmentation de TGF-β est un acteur majeur de la réponse pro-fibrotique en induisant les myofibroblastes. Ceux-ci n'ont pas été étudiés dans la CRC, mais il s'agit d'un mécanisme très connu dans d'autres fibroses et la CRC devrait suivre ce même schéma, ce qui est conforté par l'augmentation de la production de collagène I et III dans la CI et la CRC. Une accumulation de la MEC est visible conduisant à une fibrose. La fibrose rigidifie le tissu et provoque des contractions plus difficiles induisant des dommages aux vaisseaux sanguins qui sont fragilisés, renforçant les hématuries.

Pour aller plus loin dans les mécanismes potentiels de la CRC, la production d'YKL-40 par les mastocytes renforcerait le phénomène de fibrose comme observé dans la CI. Dans la CI, la production de la substance P (induit par mastocytes et la libération de NGF) induit une neuroinflammation importante pouvant renforcer les phénomènes de spasme et participer indirectement à la fibrose. Dans la CRC l'augmentation des mastocytes devrait également libérer du NGF et suractivé les fibres nerveuses libérant ainsi de la substance P et induire la même cascade d'événement. Les télocytes participent à la régulation des contractions, ce qui pourrait contribuer à l'incontinence et aux spasmes. Les spasmes favorisent la rupture des vaisseaux entraînant d'abord une hématurie microscopique puis une hématurie macroscopique favorisant l'inflammation et la fibrose puis les lésions vasculaires.

Les mécanismes de la CRC, CI et CH sont résumés dans le tableau 8 et les interactions sont schématisées dans la figure 14 et les hypothèses de mécanisme de la CRC dans la figure 15.

Tableau 8 : Tableau synthétisant les données principales sur chaque étude en fonction des mécanismes

<table>
<tr><th>Mécanismes</th><th>Cystite interstitielle</th><th>Cystite hémorragique
(n'est pas une forme distincte de cystite)</th><th>Cystite radique chronique</th></tr>
<tr><td>Atteintes de l'urothélium</td><td>Dégradation de la couche de GAG
Altération de la perméabilité provoquant une infiltration de potassium urinaire conduisant à l'activation des mastocytes et à la dépolarisation des fibres nerveuses et musculaires
Altération du rapport ATP / NO
Expression anormale de l'APF inhibant la prolifération cellulaire et la formation des jonctions serrées et empêchant la réparation de l'urothélium.
Apoptose cellulaire</td><td>Dégradation de l'urothélium, œdème sous-épithélial et ulcération
Altération de la perméabilité</td><td>Diminution de l'expression de l'uroplakine III et de l'E-cadhérine conduisant à une diminution de l'imperméabilité
Hyperplasie, atrophie et/ou érosion de l'urothélium.
Œdème cellulaire (principalement dans les cellules basales)</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Inflammation</td><td colspan="3">Production d'IL-1β, IL-6, TNF-α</td></tr>
<tr><td>Production de SCF, IL-8 et CCL2 par l'urothélium.
Prolifération et activation des mastocytes stimulées par le SCF.
Dégranulation des mastocytes libérant de l'histamine, de l'IL-6, de l'IL-8, des prostaglandines, du VEGF, du NGF et des tryptases.
Fuite microvasculaire et activation des tryptases des mastocytes.
Vasodilatation et angiogenèse immatures causées par le VEGF. Couverture insuffisante des péricytes entraînant des vaisseaux hémorragiques et une hypoxie.
Surexpression de HIF-1α</td><td>Augmentation de la COX-2 au niveau de l'urothélium
Stress oxydatif, dommages cellulaires et apoptose/nécrose dus à la surproduction de ROS et de RNS.
Induction de NF-κB et AP-1 dans les cellules résidentes de la vessie en raison de la production de ROS, IL-1β et TNF-α
Induction d'iNOS entraînant une surproduction de NO et une production de ROS causée par NF-κB</td><td>Augmentation du nombre de mastocytes dans les tissus
Aucune étude sur les mécanismes moléculaires</td></tr>
</table>

	Augmentation de l'expression d'IL-16, IL-18, SCGFβ, CTACK, TRAIL, ICAM-1, MCP-3 et VCAM-1 dans la paroi de la vessie.	et AP-1 Recrutement de neutrophiles	
Régulation neuronale	Libération de la substance P (SP) par les fibres C, entraînant une vasodilatation et une dégranulation des mastocytes. Augmentation de la prolifération des fibres nerveuses causée par le NGF. Surexpression de l'ARNm du récepteur de la SP.	Pas de donnée	Pas de donnée
Vasculaire	Forte concentration de VEGF Surexpression d'ICAM1, VCAM1		
	Vasodilatation et angiogenèse immature Hypervascularisation Glomérulations Surexpression de HIF-1α , IL-16, IL-18, SCGFβ,CTACK, TRAIL, MCP-3	Surexpression de MCP-1	Télangiectasies Fuite d'albumine Micro et macro-hématurie
Fibrose	Augmentation de l'expression du TGF-β1 Dépôt excessif d'ECM dans la lamina propria (sous-muqueuse) et les muscles lisses. Régulation positive du collagène I et III,		
	Formation de myofibroblastes		
	Régulation positive de la fibronectine Régulation négative de WNT11 Production d'YKL-40 entraînant une accumulation de la MEC. Diminution de la capacité contractile de la vessie et raidissement de la vessie		

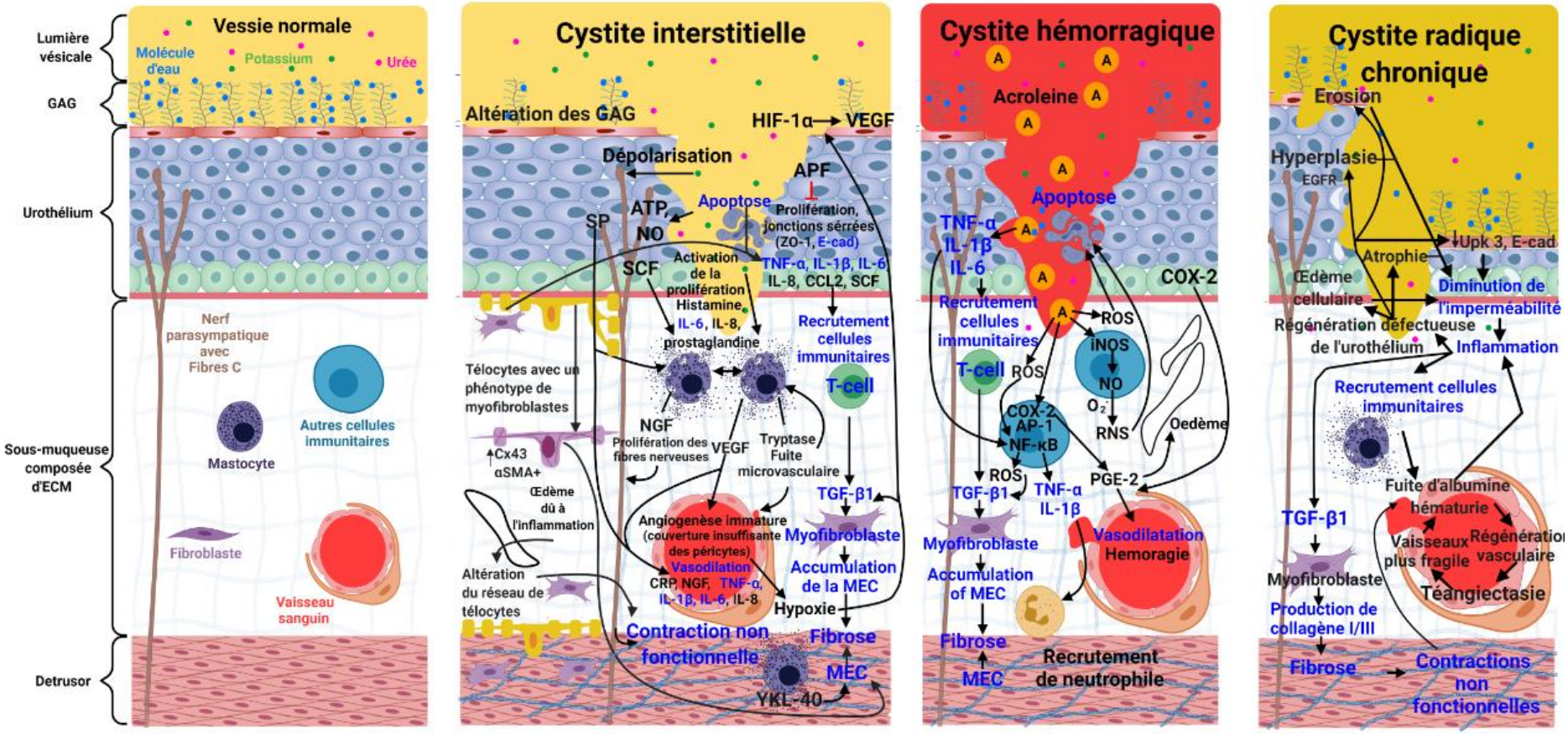


Figure 14 : Schéma récapitulatif des principales atteintes dans la cystite interstitielle (CI), dans la cystite hémorragique et dans la cystite radique chronique. En bleu sont représentés les mécanismes communs entre les 3 pathologies.

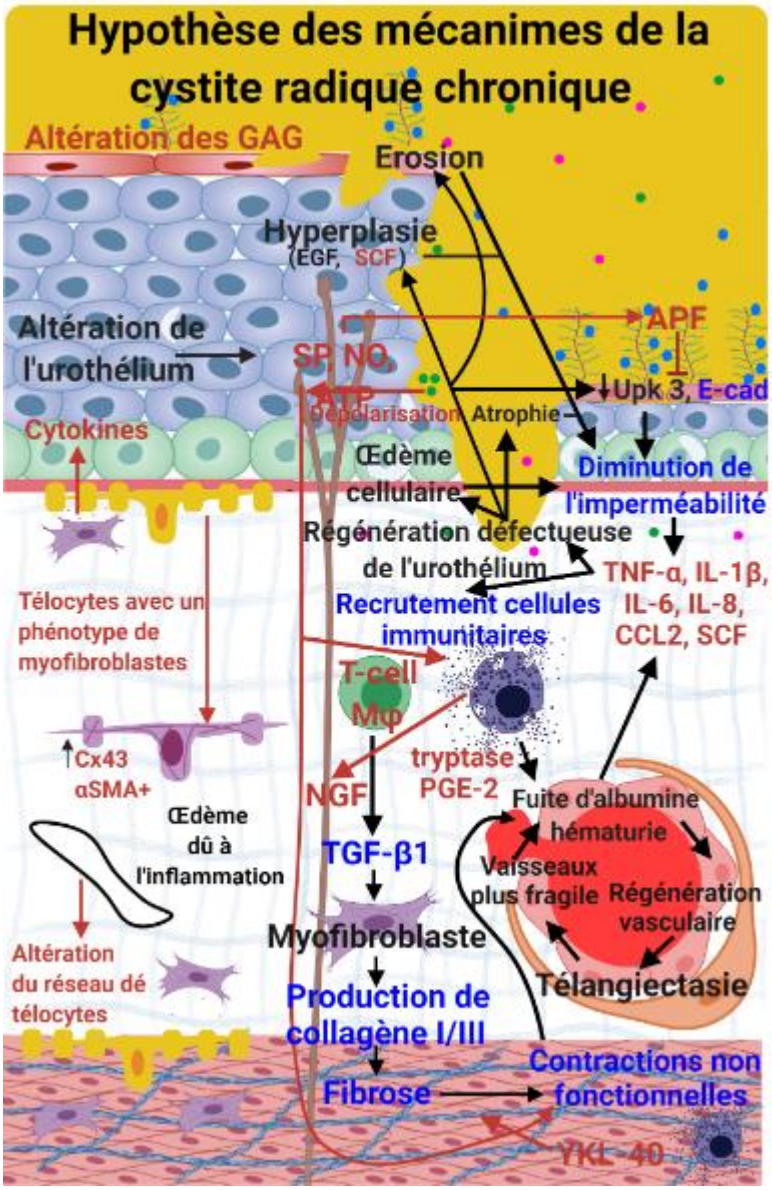
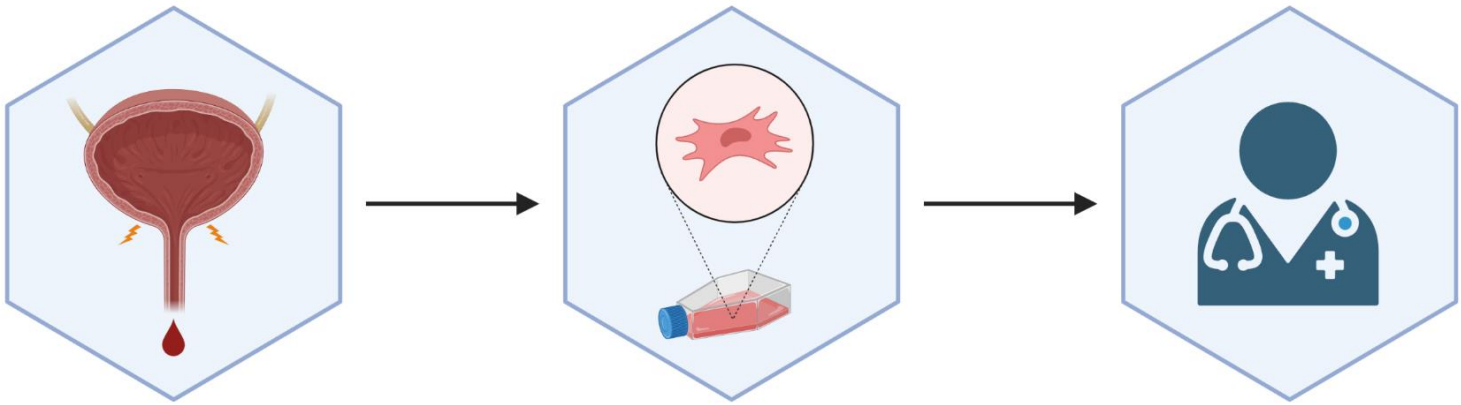


Figure 15 : Schéma représentant les mécanismes spécifiques à la CRC (en noir), communs avec la cystite interstitielle et/ou la cystite hémorragique (en bleu) et les mécanismes potentiels en se basant sur la CI et la CH (en rouge)

Partie D : Application clinique des cellules souches mésenchymateuse dans le traitement des cystites



D.1 : Généralités.

Les cellules souches contribuent au développement des organes et à leur homéostasie. La division asymétrique permet à la fois le maintien d'un pool de cellules souches grâce à l'auto-renouvellement et la production de cellules filles qui se différencieront pour assurer l'homéostasie de l'organe (figure 16). Les tissus sont classés en tissu à renouvellement rapide, tels que l'épithélium intestinal et ceux à renouvellement lent, tel que l'épithélium vésical.

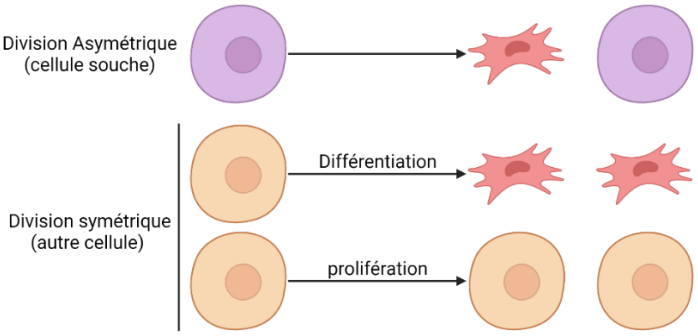


Figure 16 : Représentation de la division asymétrique des cellules souches comparée aux autres types cellulaires

Les cellules souches sont classées en cellules totipotentes, pluripotentes, multipotentes et unipotentes (figure 17).

Les cellules totipotentes sont les premières cellules de l'ovocyte avant l'étape de blastomère (jusqu'à j4). Elles sont capables de se différencier en tous les types cellulaires de l'organisme et peuvent redonner un organisme entier avec le placenta.

Les cellules pluripotentes sont les cellules de la masse interne du blastocyste avant la phase de gastrulation (j5-6 à j14). Ces cellules peuvent se différencier en cellules des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) et peuvent donner tous les types cellulaires de l'organisme, mais ne peuvent pas donner les annexes embryonnaires.

Les cellules souches multipotentes sont présentes chez l'embryon et chez l'adulte. Elles ont un potentiel de différenciation plus réduit que les cellules souches pluripotentes. Les cellules souches multipotentes ont la capacité de se différencier en tous les types de cellules

au sein d'une lignée. Par exemple, les cellules souches hématopoïétiques peuvent se différencier en toutes les cellules de la lignée sanguine, mais elles ne peuvent pas se différencier naturellement en cellules nerveuses (Smith 2006).

Les cellules unipotentes : Ce sont des cellules qui ne sont capables de donner qu'un seul type cellulaire. Par exemple, les cellules souches basales de l'urothélium ne peuvent donner que des cellules intermédiaires.

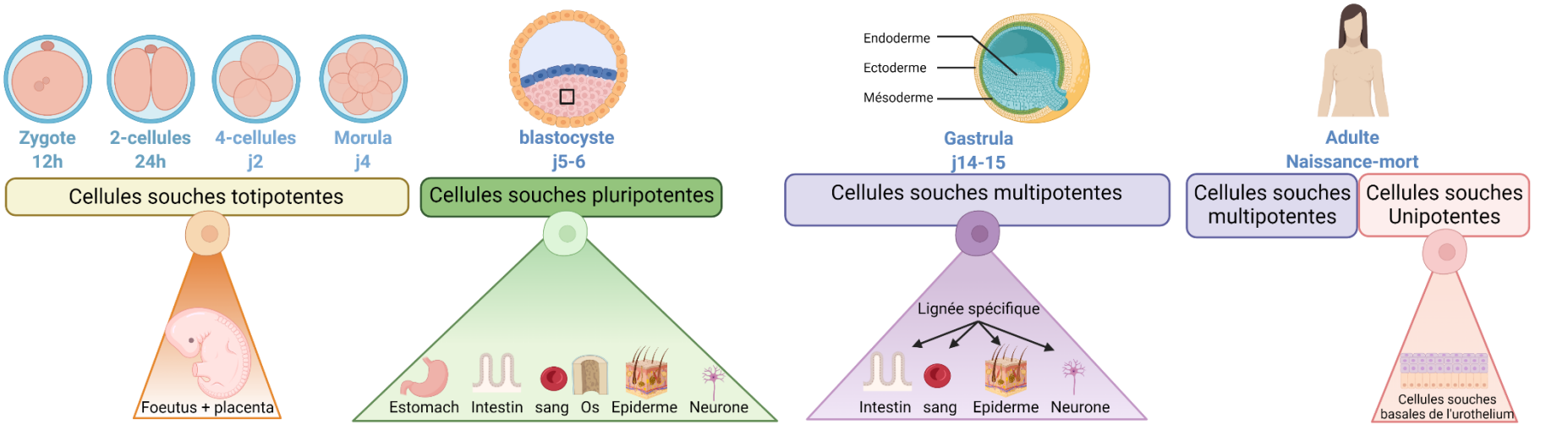


Figure 17 : Représentation de l'évolution des différentes cellules souches dans l'organisme en fonction du temps et leurs devenirs

Travail inspiré de Michèle Dehoky pour science et avenir : les 4 types de cellules souches ; publié le 08/10/2012

D.2 : Les différents types de cellules souches

D.2.1 Les cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires sont obtenues à partir du stade blastocyste de l'embryon. Elles présentent une capacité d'auto-renouvellement théoriquement infinie *in vitro* et peuvent se différencier en l'ensemble des cellules de l'organisme adulte. L'isolement de ces cellules nécessite la destruction de l'embryon et pose donc des questions éthiques identiques à celles soulevées par l'IVG (Interruption Volontaire de Grossesse), (Thomson et al. 1998).

D.2.2 Les cellules induites à la pluripotence iPSc

Les iPSc (induced Pluripotent Stem cells) sont obtenues à partir de cellules différenciées qui ont été reprogrammées en cellules pluripotentes à l'aide de 4 facteurs de transcription tel Oct3/4 (Octamer-binding transcription factor 3 et 4), Sox2 ((Sex determining region Y)-box 2), Klf4 (Kruppel-like factor 4) et c-Myc (v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog) (Takahashi and Yamanaka 2006). Ces cellules possèdent des caractéristiques analogues aux cellules souches embryonnaires. Les iPSc sont une alternative à l'utilisation des cellules souches embryonnaires.

D.2.3 Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont présentes dans un grand nombre de tissus (Macrin et al. 2017). L'étude de Friedenstein et al., de 1966, est la première à décrire ces cellules dans la fraction stromale de la moelle osseuse. Les CSM sont capables de former des os hétérotopiques et un microenvironnement médullaire après transplantation chez la souris (Friedenstein et al. 1966), ainsi que de former des colonies de fibroblastes (Friedenstein et al. 1987). Elles furent baptisées « cellules souches mésenchymateuses » par l'équipe de Caplan et al., (Caplan 1991). Elles sont responsables de la formation de l'os et du cartilage ainsi que de la réparation et du renouvellement tissulaire durant le développement embryonnaire et à l'âge adulte. Le terme « cellules souches mésenchymateuses » est

actuellement remplacé par le terme "cellules stromales mésenchymateuses" (Caplan 2017; de Windt et al. 2017).

D.2.4 Intérêt de l'utilisation des CSM en clinique

Les CSM présentent un faible taux de HLA (Human Leucocyte Antigen) de type I et une absence de HLA de type II (Klyushnenkova et al. 2005; Wang et al. 2019), leurs conférents une faible immunogénicités, les rendant particulièrement intéressantes pour les greffes. Ces caractéristiques permettent l'établissement de banques de CSM bien caractérisé et diminue les risque de rejet (Li et al. 2021a).

Les CSM ont la capacité de migrer aux sites lésés (Chapel et al. 2003) dans les jours suivant l'injection et d'y demeurer jusqu'à plusieurs semaines. Lorsque l'injection des CSM est locale, les CSM restent plus longtemps dans le tissu (Garcia-Bernal et al. 2021), par exemple dans la vessie, les CSM peuvent demeurer jusqu'à un mois après injection locale dans un modèle préclinique (Ryu et al. 2018).

D.3 : Origine et caractérisation des CSM

De nombreuses sources de CSM sont retrouvées dans l'organisme. Les plus fréquentes sont les CSM issues de la moelle osseuse, les CSM issues du cordon ombilical (également du placenta et de la membrane amniotique), les CSM issues du tissu adipeux (adCSM). D'autres sources moins fréquentes existent comme la pulpe dentaire, les CSM dérivées de l'urine ou encore de la membrane synoviale (figure 18), (Macrin et al. 2017; Pavathuparambil Abdul Manaph et al. 2018). Des cellules similaires ont été retrouvées dans presque tous les tissus de l'organisme (muscle, tendon, ligament parodontal, périoste, cerveau, poumon, ou encore la peau).

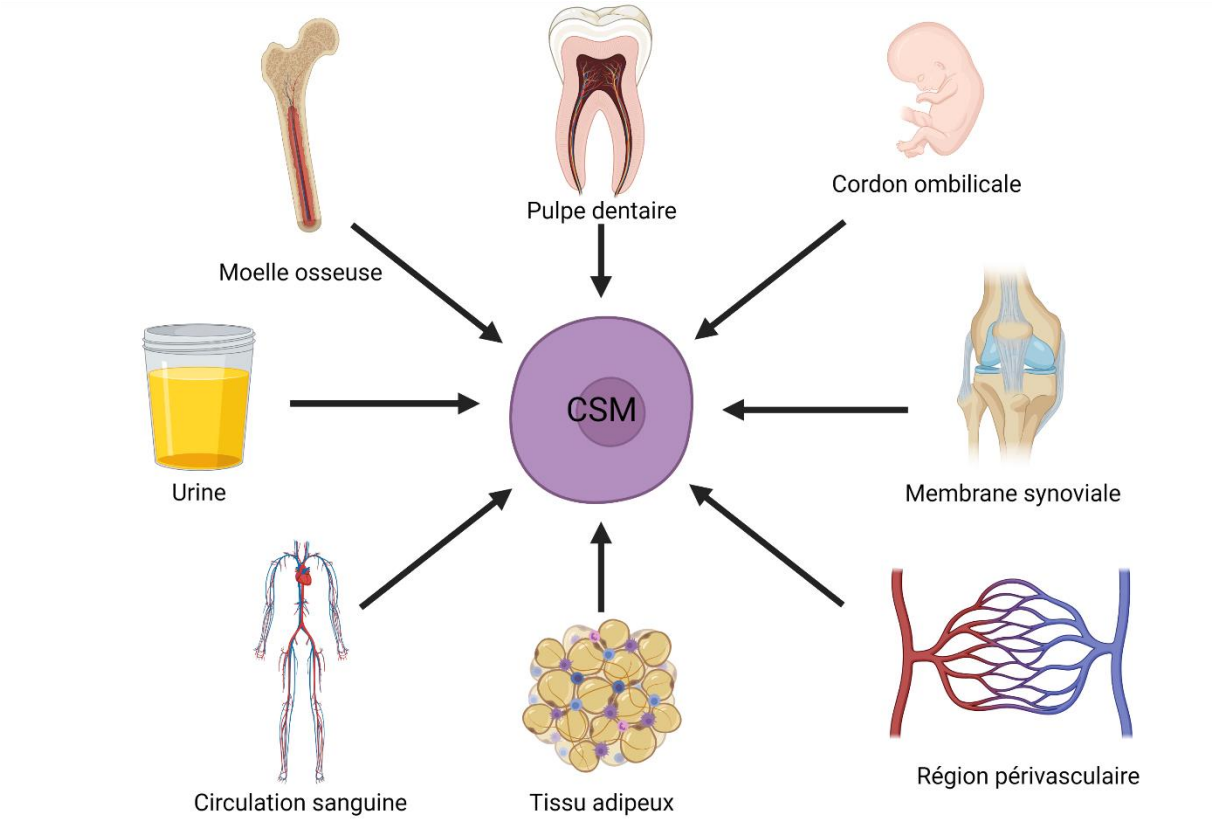


Figure 18 : Sources principales des CSM

Les CSM ont de multiples fonctions dans l'organisme. Elles participent au maintien de l'homéostasie et participent à la régénération des tissus en cas de lésions (figure 19), (Han et al. 2019).

L'International Society for Cellular Therapy (ISCT) a défini des critères minimaux permettant de caractériser les CSM, figure 19 (Dominici et al. 2006).
Adhérence à la surface de culture en plastique non traité, sous des conditions standards de culture.

- Positif à l'expression de CD105, CD73 et CD90
- Négatif à CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79α ou CD19 et HLA-DR (Human Leukocyte Antigen – antigen D Related)
- Différenciation en ostéoblastes, adipocytes ou chondrocytes *in vitro.*

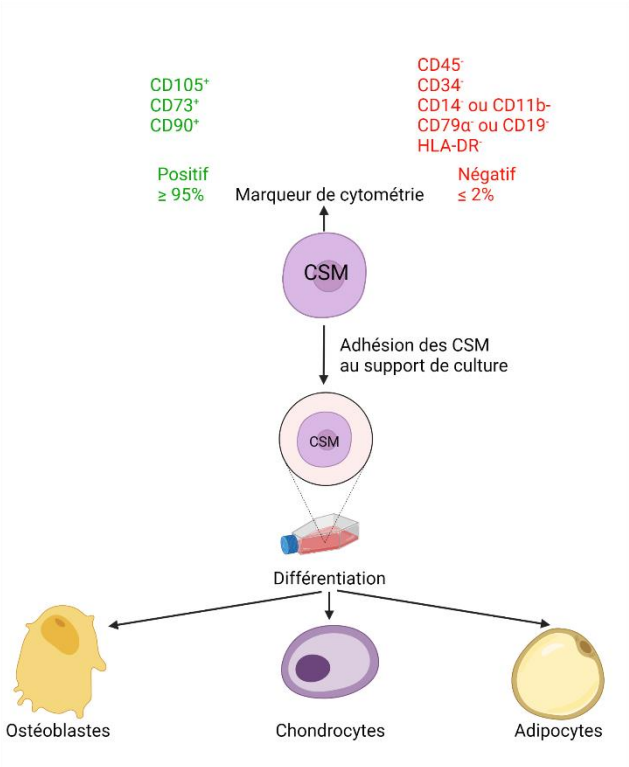


Figure 19 : Caractérisation des cellules souches

D.4 : Utilisation des CSM en thérapie cellulaire

D.4.1 Essais cliniques

Les essais cliniques peuvent être divisés en 5 catégories : Les phases 1 se concentrent sur les effets indésirables les plus fréquents et les plus graves du médicament ainsi que sa biodistribution et son élimination chez des patients sains, il s'agit donc de l'étude de la toxicité du médicament. Les phases 2 recueillent des données préliminaires sur l'efficacité d'un médicament pour un nombre restreint de patients. Les phases 3 permettent de recueillir plus d'informations sur la sécurité et l'efficacité d'un médicament en étudiant différentes populations et différents dosages. Ces études impliquent généralement un plus grand nombre de participants. Enfin les essais cliniques de phase 4 qui ont lieu après la commercialisation du produit. Ils comprennent les études requises après la mise sur le marché et les études d'engagement qui sont exigées ou acceptées par le promoteur de l'étude. Ces essais permettent de recueillir des informations supplémentaires sur la sécurité, l'efficacité ou l'utilisation optimale d'un médicament.

Dans le cadre des CSM, sur les 1079 essais cliniques, 27 sont de phase 1 précoce, 639 de phase 1, 567 de phase 2, 62 de phase 3 et 4 de phase 4 ainsi que 105 sans phase définie (y compris les essais de dispositifs ou d'interventions comportementales), (figure 20). Bien qu'il y ait un grand nombre d'essais cliniques sur les CSM, la majorité des études sont de phase 1 (clinicaltrials.gov).

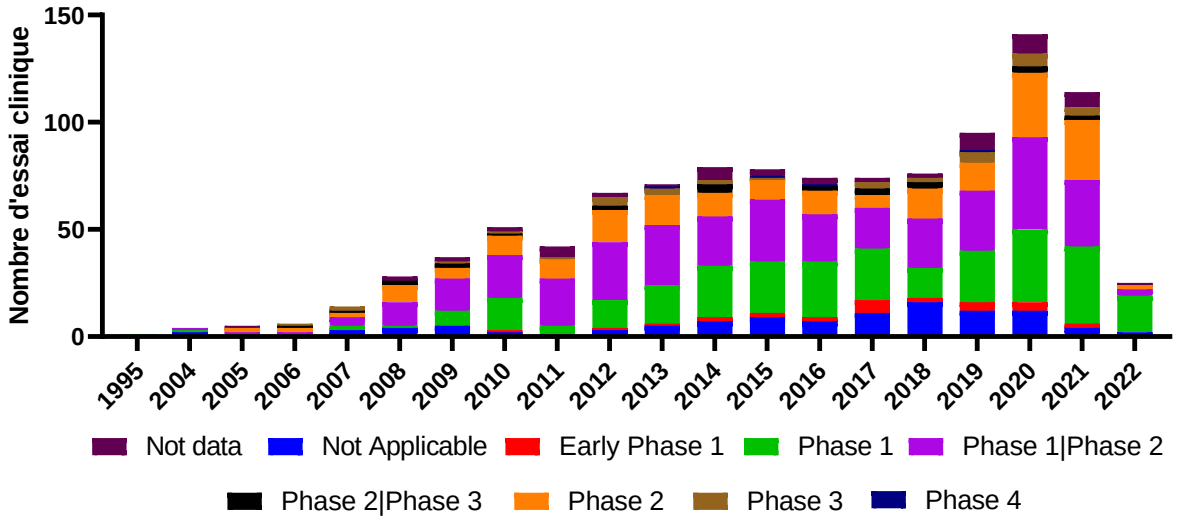


Figure 20 : Nombre d'essais cliniques en fonctions des phases des études

Les essais cliniques portent principalement sur des maladies inflammatoires, sur l'immunomodulation, la régénération vasculaire et la fibrose. Les CSM sont utilisées dans plus de 900 pathologies différentes. Les plus fréquentes sont les maladies de l'appareil locomoteur (172 essais), du système nerveux central (140 essais), de l'appareil respiratoire (134 essais), du système immunitaire (133 essais), pulmonaire (130 essais), les rhumatismes (119 essais), les maladies du collagène (119 essais), les plaies et blessures (116 essais), l'arthrite (116 essais), les maladies articulaires (114) et les maladies vasculaires (109), (clinicaltrials.gov).

D.4.2 Pathologies de la vessie

Douze études cliniques concernent les pathologies de la vessie, dont la majorité porte sur l'incontinence urinaire. Parmi les 12 essais cliniques, 3 sont des essais compassionnels, quatre sont de phase 1, trois sont de phase 1 et 2, 1 de phase 2 et 1 de phase 3.

Deux voies d'injection sont possibles ; les injections en intraveineuse ou dans la paroi de la vessie. Les injections des CSM dans la paroi de la vessie sont toutes réalisées pour traiter des incontinences urinaires. Ces pathologies sont souvent dues à des troubles neurologiques. De ce fait, la vessie est peu dégradée et l'injection des CSM a un faible risque de séquelles. Pour les autres études, elles sont réalisées sur des vessies fibrosées, lors des CH ou des CI. Ces pathologies affectent grandement la vessie, la rendant plus fragile à une intervention chirurgicale. Une injection dans la paroi de la vessie représente un risque important de séquelles et une injection intraveineuse est privilégiée. Pour l'injection en intraveineuse, la quantité de CSM injectée est très variable, allant de 1.5 à 100 millions de CSM/kg. Par contre, pour l'injection dans la paroi de la vessie l'ensemble des essais cliniques semblent s'accorder sur une dose de 20 millions de CSM injectées (au totale).

Les 9 références identifiées en 2022 sur clinicaltrials.gov, sont des essais cliniques de phase 1 et/ou 2 ; il s'agit majoritairement d'étude sur la toxicité des CSM. L'origine des CSM la plus fréquente est le tissu adipeux et la moelle osseuse. Parmi les 3 essais compassionnels, 2 utilisent des CSM originaires de la moelle osseuse et une des CSM dérivées du placenta. Les essais cliniques de Ringden et al., et Arosson-Kuttila et al., concernent le traitement par CSM des cystites hémorragiques consécutives à une transplantation de la moelle osseuse (Aronsson-Kurttila et al. 2018; Ringden et al. 2007). Pour Voswinkel et al. il s'agit du traitement de patients surirradiés lors de l'accident d'Épinal et présentant des cystites et rectites radiques chroniques de grade 3 (Voswinkel et al. 2013). Les essais cliniques se concentrent majoritairement sur la toxicité des CSM, la fonctionnalité de la vessie (incontinence, spasmes, urgence…), les hématuries, la douleur et la qualité de vie des patients. Il s'agit principalement d'étudier l'efficacité des CSM sur les paramètres qui sont les plus relevants pour les patients (tableau 9). L'efficacité des CSM est étudiée à moyen, long-terme avec des études allant d'un suivi post-injection de 1 mois jusqu'à plus de 4 ans (avec une médiane de 12 mois). Parmi l'ensemble de ce corpus, seules 5 études ont des résultats publiés, que nous détaillerons ci-dessous.

Tableau 9 : Liste des essais clinique avec les principaux critères d'étude des effets des CSM sur la vessie.

ND= pas de donnée (no data), CI =Cystite Interstitielle, CH= Cystite Hémorragique

Référence	Pathologie étudiée	Nombre de participants	Origine des CSMs	Quantité de CSM	Méthodes d'injection	Temps d'études	Toxicité du traitement	Qualité de vie	Douleur	Hématurie	Fonctionnalité de la vessie	Inflammation	Donnée
NCT02866721	Fibrose de la vessie	14	Moelle osseuse	5 millions/kg	Intraveineuse	28 jours	X					X	ND
NCT03058068	Fibrose de la vessie	0 (retirée)	Moelle osseuse	20 et 100 millions/kg	Intraveineuse	30 jours	X					X	ND
Ringden 2007	CH	10	Moelle osseuse	0,7-2 millions/kg	Intraveineuse	1 an et 4 mois				X			(Ringden et al. 2007)
Voswinkel 2013	CRC	4	Moelle osseuse	5 millions/kg	Intraveineuse	6 mois			X	X			(Voswinkel et al. 2013)
NCT02334878	Incontinence urinaire	50	Moelle osseuse	20-30 million totale	Paroi de la vessie	12 mois		X			X		ND
NCT04446884	Incontinence urinaire	10	Adipeux	20 millions totale	Paroi de la vessie	12 mois	X				X		ND
NCT04426643	Incontinence urinaire	10	Adipeux	20 millions totale	Paroi de la vessie	12 mois	X				X		ND
NCT01804153	Incontinence urinaire	10	Adipeux	40 millions totale	Paroi de la vessie	12 mois	X	X					(Garcia-Arranz et al. 2020)
NCT01799694	Incontinence urinaire	10	Adipeux	20-40 millions totale	Paroi de la vessie	12 mois							(Garcia-Arranz et al. 2020)
NCT04610359	CI	3	Embryonnaire	20 millions totale	Paroi de la vessie	12 mois	X		X		X		ND
NCT05147779	CI	20	Cordon ombilical	100 millions totale	Intraveineuse	4 ans	X						ND
Aronsson-Kurttila 2018	CH	11	Placenta	1,5 (0,7-2,5) million/kg	Intraveineuse	Jusqu'à 3 ans et 7 mois			X	X			(Aronsson-Kurttila et al. 2018)

Les études NCT01804153 et NCT01799694 sont de phase 1 et 2. Ces études portent sur l'incontinence urinaire avec un traitement par des CSM d'origine adipeuse. L'étude est réalisée chez 8 hommes et 10 femmes. Parmi les hommes, deux des huit patients n'ont reçu que la première injection de 20×10^6 de CSM et les six autres ont reçu une deuxième injection de 40×10^6 de CSM, 3 mois après. Toutes les femmes ont reçu une unique dose de 40×10^6 de CSM. Trois hommes (37,5%) et cinq femmes (50%) ont montré une amélioration objective supérieure à 50% ($P < 0,05$) et une amélioration subjective de 70 à 80 % par rapport à la ligne de base jusqu'à 5 ans après le traitement. Le taux de complications était inférieur à 10% et aucune intervention chirurgicale pour corriger l'incontinence urinaire résiduelle n'a été réalisée (Garcia-Arranz et al. 2020).

L'étude de Ringden et al. de 2007, utilise les CSM pour le traitement de la Cystite Hémorragique (CH) (grade 2 ou plus) chez des patients ayant bénéficié d'un traitement par chimioradiothérapie et allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Dans cette étude, 10 patients ont été traités avec une dose médiane de 1 (plage de 0,7 à 2) $\times 10^6$ CSM/kg d'origine médullaire et injectée par voie intraveineuse. Deux patients ont dû être réinjectés, un avec $0,7x10^6$ CSM/kg après 155 jours à cause d'une rechute des hématuries et l'autre patient a été réinjecté avec $2x10^6$ CSM/kg 1 mois après à cause de la maladie aiguë du greffon contre l'hôte réfractaire. Chez cinq patients, la cystite hémorragique sévère a disparu après une durée médiane de 3 (1-14) jours après le traitement par CSM. Chez deux patients, le traitement par les CSM a permis une réduction des besoins transfusionnels, cependant ces patients sont décédés d'une défaillance multiviscérale. Chez un patient, la perforation de la vessie semblait guérie. Dans cette étude, aucune toxicité des CSM n'a été relevée (Ringden et al. 2007).

L'étude de Voswinkel et al., de 2013 utilise les CSM d'origine médullaire pour le traitement de la CRC pour des patients surirradiés lors de cancer de la prostate. Quatre patients ont été traités avec une médiane de 5 (plage de 0,8 à 5) $\times 10^6$ CSM/kg. L'injection de CSM a entraîné la disparition des douleurs et des saignements chez les patients après 10 à 15 jours ainsi qu'une augmentation de la qualité de vie jusqu'à 6 mois après le traitement (fin de l'étude). Un patient a dû être réinjecté ($0,82\times10^6$ CSM) 6 mois après la première dose à cause de douleurs qui sont réapparues. Un effet à long terme dans l'inhibition de l'inflammation chronique ainsi que l'arrêt de la fistulisation ont été observés chez un patient (Voswinkel et al. 2013).

L'étude d'Aronsson-Kurttila et al. de 2017, utilise les CSM issues du placenta pour le traitement de la cystite hémorragique (grade 3 ou 4) chez des patients ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Onze patients ont été traités avec une dose médiane de 1,5 (plage 0,7-2,5) × 10^6 CSM/kg. Trois patients ont dû recevoir des doses supplémentaires de CSM (1, 2 et 4 doses de CSM entre 0,7 et 1,7 × 10^6/kg). Chez 5 patients, les hémorragies ont disparu dans les 5 jours et la douleur dans les 9 jours suivant le traitement par les CSM. De plus, 9 des 11 patients étaient en vie un an après le traitement. Aucune toxicité des CSM n'a été observée chez aucun des patients (Aronsson-Kurttila et al. 2018).

L'utilisation des CSM pour les syndromes vésicaux reste récente, mais les premières études montrent un effet thérapeutique sur les hématuries, la qualité de vie des patients et la fonctionnalité de la vessie. Ces données sont en accord avec les observations précliniques qui ont démontré une amélioration de la fonctionnalité de la vessie. Les injections de CSM étaient faites à dose unique majoritairement et seuls quelques patients ont reçu une deuxième injection de CSM suggérant une action efficace et à long terme des CSM dès la première injection. L'origine des CSM semble avoir peu d'impact sur leur efficacité, mais sans étude supplémentaire ou comparative, cette question reste en suspens. Les prochaines études cliniques devraient apporter une confirmation des résultats observés. Elles permettront de déterminer si la source des CSM à une action différente comme observée en préclinique. Pour terminer, les études cliniques pourront ou non confirmer si l'injection des CSM localement est une technique sans effet secondaire pour la paroi viscérale et si ce mode d'injection est plus efficace que par voie intraveineuse (tableau 10).

Tableau 10 : Liste des essais précliniques avec les principaux critères d'étude des effets des CSM sur la vessie

Référence	Pathologie étudiée	Modèle	Origine des CSMs	Quantité de CSM	Méthodes d'injection	Temps d'études	Douleur	Hématurie	Fonctionnalité de la vessie	Apoptose	Stress oxydatif	Hypoxie	Autophagie	Lésion de l'urothélium	Inflammation	Vasculaire	Fibrose	Neurologie
Chen 2014	CI	Rat	Adipeux	1,2 million	Intraveineuse	72h			X			X		X	X			
Li 2017	CI	Rat	Urine	1,2 million	Intraveineuse	5 jours			X	X	X		X		X			
Xiao 2017	CI	Rat	Moelle osseuse	0,2 million	Intrapéritonéale	4 semaines			X					X	X		X	
Kim 2016	CI	Rat	Cordon ombilical	1 million	Paroi de la vessie	7 jours			X	X					X		X	
Song 2015	CI	Rat	Cordon ombilical	1 million	Paroi de la vessie	1 semaine			X					X	X	X		X
Ryu 2018	CI	Rat	Embryonnaire	0,1-1 million	Intraveineuse	4 semaines			X	X				X	X		X	
Lee 2018	CI	Rat	Embryonnaire	0,1-1 million	Paroi de la vessie	1 semaine			X	X				X	X		X	
Kim 22017	CI	Rat	Embryonnaire et moelle osseuse	0,1-1 million	Paroi de la vessie	1 semaine (6 mois pour la fonctionnalité de la vessie			X	X					X		X	X
Furuta 2018	CI	Rat	Adipeux	1 million	Paroi de la vessie	4 jours			X						X		X	
Kim 2020	CI	Rat	Adipeux	1 million	Paroi de la vessie	14 jours	X								X	X	X	
Chung 2019	CI	Rat	Adipeux, urine, moelle osseuse, liquide amniotique	1 million	Paroi de la vessie	14 jours			X					X	X	X		
Xuefeng	CI	Rat	Adipeux	1 million	Paroi de la vessie	12 semaines			X						X	X	X	
Xu 2021	CI	Rat	Cordon ombilical	1 million	Intraveineuse	1 semaine			X						X	X		

D.5 Mécanismes d'action des CSM

Les CSM sécrètent des facteurs paracrines, dont des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance et des miARN (micro Acide RiboNucléique). Ces facteurs jouent un rôle dans l'immunomodulation (Luz-Crawford et al. 2016; Melief et al. 2013), la régénération des tissus (Tang et al. 2011; Wang et al. 2012), l'anti-fibrose (Hu et al. 2019; Liu et al. 2018), l'anti-apoptose (Faezi et al. 2018) et l'angiogenèse (Kwon et al. 2014).

Les CSM réduisent le stress oxydatif, l'apoptose et l'hypoxie. Les CSM réduisent le stress oxydatif en produisant diverses molécules comme SOD-1 et 2, CAT (Catalase), GPx (Glutathione Peroxidase), SIRT (Sirtuine), GSH et Nrf2 (Gorbunov et al. 2013; Valle-Prieto and Conget 2010; Xia et al. 2021). Les CSM agissent également sur l'apoptose en produisant du VEGF, HGF (Hepatocyte Growth Factor), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), IGF-1, Stanniocalcine-1, TGF-β, FGF-2 (Fibroblast Growth Factor), GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), (Block et al. 2009; Rehman et al. 2004; Togel et al. 2007; Wu et al. 2013). Ces protéines vont activer différentes voies métaboliques comme mTOR (mammalian target of rapamycin)/AKT, PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/AKT et ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases)/GATA4 qui vont diminuer l'expression des protéines pro-apoptotiques Bax et de la caspase 9 (par l'action de Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra Large)) et activer les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl2 (Huang et al. 2007; Kitta et al. 2003; Liu 1999; Okada et al. 2019; Wang et al. 2020). Les CSM peuvent aussi diminuer l'hypoxie en produisant HIF1 ainsi que SOD et Nrf2, voir figure 21 (Bernard et al. 2018; Ejtehadifar et al. 2015; Li et al. 2017a; Palomaki et al. 2013).

Les CSM agissent également sur l'inflammation. Sur des environnements pro-inflammatoires, les CSM pourront sécréter des facteurs anti-inflammatoires comme PGE-2 (ProstaGlandine E-2), TGF-β, HGF, mpCCL2 (mp : MMP-processed), IDO ((Indoleamine-pyrrole 2,3-DiOxygenase), iNOS, HLA-G5, LIF (Leukemia inhibitory factor), IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15) (Di Nicola et al. 2002; Gieseke et al. 2013; Kim et al. 2005; Meisel et al. 2004; Nasef et al. 2007; Nemeth et al. 2009; Simovic Markovic et al. 2017; Sotiropoulou et al. 2006). Le recrutement des cellules immunitaires est diminué par l'action des CSM sur la diminution de l'expression des TLR (Linard et al. 2013). Les CSM participent

à la réduction du recrutement des cellules immunitaires en exprimant du PGE-2, de l'IDO, du HGF, du TSG-6 ou encore du TGF-β (Prockop 2016; Yang et al. 2021). Les CSM inhibent la fonction des lymphocytes B et T en bloquant leur cycle en phase G0/G1, inhibant ainsi la production d'immunoglobulines (IgA, IgG et IgM) et la différenciation des lymphocytes B (Le Blanc and Davies 2015). Les CSM induisent le changement de polarité des lymphocytes T et des macrophages vers un état régulateur, c'est-à-dire le passage phénotypique de Th1 et M1 pro-inflammatoire en Th2 et M2 anti-inflammatoire (Corcione et al. 2006; Keating 2008; Prockop 2013). Cet effet semble en partie induit par la production par les CSM de TSG-6, une cytokine anti-inflammatoire. Enfin, la diminution de l'expression des cytokines TNF-α, IFN-γ, IL-1β et IL-10 par les CSM est également observée dans d'autres pathologies comme la maladie de Crohn's (Chinnadurai et al. 2015; Sotiropoulou et al. 2006), voir la figure 21.

Les CSM agissent également sur la fibrose en réduisant le nombre de cellules Th17 d'une manière dépendante de l'IDO ainsi qu'en diminuant l'expression du collagène de type I (Milosavljevic et al. 2018). De plus, les CSM produisent différents facteurs anti-fibrosants comme IL-1Ra, FGF-2, HGF et TSG-6 (Tumor necrosis factor Stimulated Gene-6). Dans les cellules traitées par les CSM, les niveaux de HGF, KGF (Keratinocyte Growth Factor) et BMP-7 (Bone Morphogenetic Protein 7) sont augmentés tandis que les niveaux de TGF-β1 et de TNF-α sont diminués (Choi et al. 2011; Suga et al. 2009).

Les CSM favorisent aussi la régénération et la prolifération tissulaire en sécrétant différents facteurs comme SCF (Stem Cell Factor), LIF, IL-6, M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), SDF-1 (Stromal cell-Derived Factor 1 aussi appelé CXCL12) ou angiopoïétine-1 (Haynesworth et al. 1996; Majumdar et al. 1998; Ohab et al. 2006; Sugiyama et al. 2006). Elles favorisent aussi l'angiogenèse en produisant du FGF-2, VEGF, PIGF (Placental Growth Factor), MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1 = CCL2), IL-6 (Hung et al. 2007; Kinnaird et al. 2004; Sorrell et al. 2009).

Les CSM possèdent également un effet trophique permettant de recruter différentes cellules immunitaires ainsi que des cellules endogènes du tissu notamment grâce à MCP-1, MIP-1α (Macrophage Inflammatory Protein-1α = CCL3), MIP-1β (CCL4), RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted = CCL5), MCP-3 (CCL7),

MIP-3 α (CCL20), éotaxine-3, factalkine, CXCL5, CXCL11, CXCL1, IL-8, CXCL10, SDF-1 (Honczarenko et al. 2006; Ji et al. 2004; Sordi et al. 2005).

L'ensemble de ces actions induit par les CSM augmente la régénération du tissu grâce à une diminution de l'apoptose, de l'hypoxie, du stress oxydatif, de l'inflammation et de la fibrose et une augmentation de l'angiogenèse et de la prolifération des cellules souches endogènes.

En conclusion de cette partie, les CSM agissent sur un ensemble de lésions et visent à retrouver un état d'homéostasie (figure 21). Les CSM permettent de :

- Diminuer l'apoptose et l'hypoxie
- D'induire une meilleure régénération des tissus en stimulant le compartiment des cellules souches
- De réduire l'inflammation en inhibant les cellules pro-inflammatoires et en activant les cellules anti-inflammatoires
- De participer à la neuro-protection
- D'activer une néo-vascularisation et diminuer les lésions vasculaires
- D'inhiber la fibrose

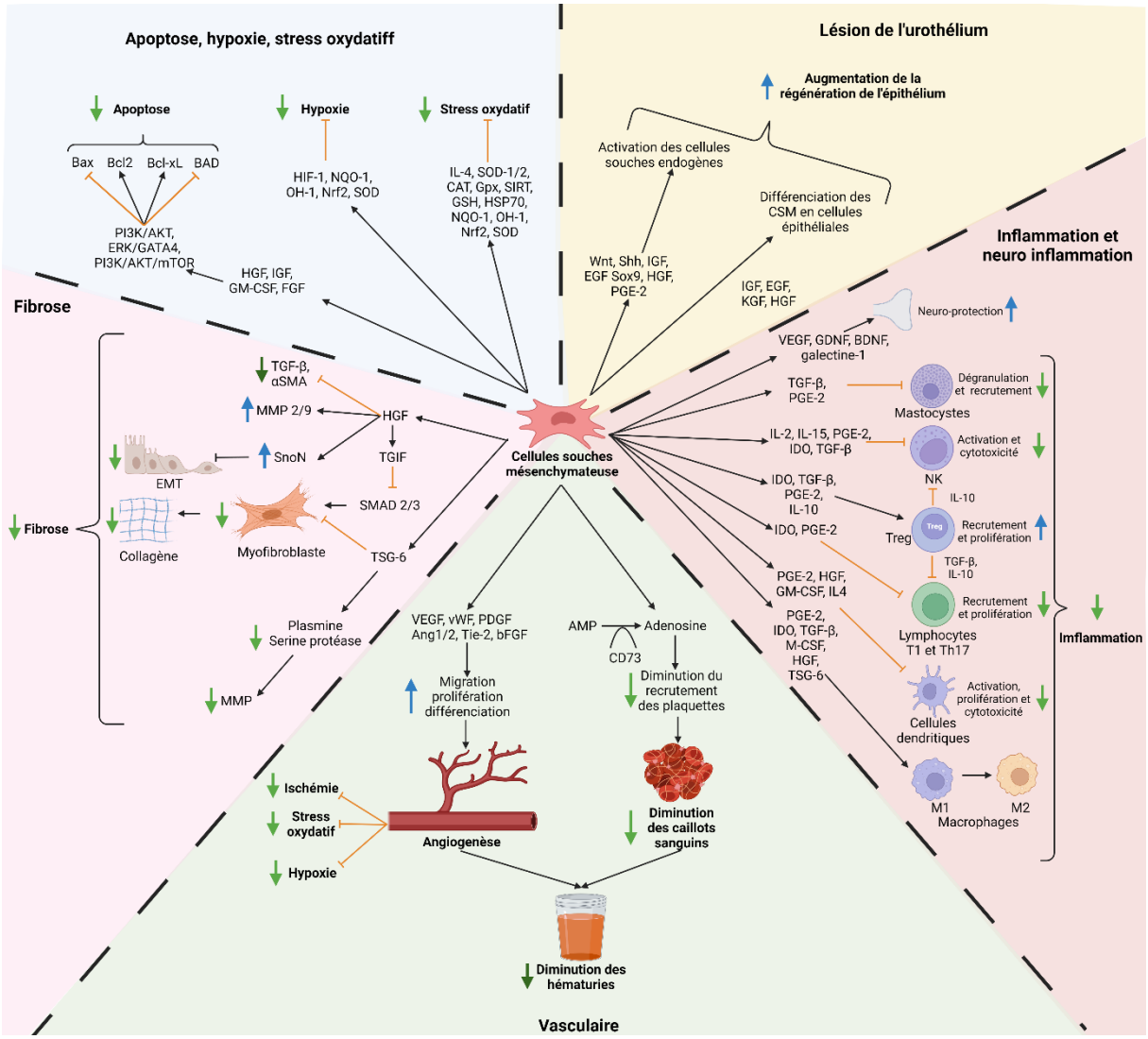


Figure 21 : Ensemble des effets des CSM sur l'apoptose, l'inflammation, la régénération, la vascularisation et la fibrose.

D.6 Mécanismes d'action des CSM dans les cystites

Les études sur les effets des traitements par les CSM sur les cystites sont peu documentées. La majorité des recherches se focalise sur la cystite interstitielle à des temps précoces. L'extrapolation des résultats à des temps tardifs est difficile. Cependant, les mécanismes de la phase aiguë et de la phase chronique semblent similaires, permettant d'ouvrir des pistes de réflexion quant aux traitements des effets des CSM sur les effets chroniques. De plus, la diversité des sources des cellules souches utilisées, les doses de cellule

utilisées ainsi que la méthode d'injection rendent l'efficacité des CSM plus complexe à analyser.

Les mécanismes de la phase aiguë et chronique sont similaires pour l'inflammation, la neuroinflammation et la fibrose. La différence majeure réside au niveau de l'urothélium. La phase aiguë prend fin lorsque l'urothélium redevient transitoirement fonctionnel. En revanche, durant la phase chronique, la régénération de l'urothélium semble imparfaite. Au niveau fonctionnel, la diminution des jonctions serrées et des uroplakines altère l'imperméabilité de l'urothélium. Les lésions vasculaires semblent similaires pour la phase aiguë et la phase tardive. Ces lésions peuvent renforcer, voire induire la CRC. La similitude entre ces mécanismes permet, en partie, d'extrapoler les effets aigus du traitement par les CSM sur les effets chroniques pour la CRC.

D.6.1 Apoptose, stress oxydatif et hypoxie dans la vessie

L'irradiation induit des ROS de façon directe et indirecte dans le tissu, augmentant le stress oxydatif. L'augmentation des ROS dans la vessie est induite par l'instillation de différentes solutions irritantes comme la cyclophosphamide ou la kétamine dans la CI (Jeelani et al. 2017; Liu et al. 2015). Cette augmentation des ROS peut conduire à une apoptose des cellules de l'urothélium qui est visible dans la CI et dans la CRC (Kim et al. 2016b; Kim et al. 2017; Zwaans et al. 2021). De plus, dans la CRC l'apoptose peut avoir pour origine les effets directs des irradiations sur l'ADN (Harms-Ringdahl et al. 1996).

Après injection des CSM, une diminution des cellules en apoptose dans la paroi de la vessie a été mise en évidence essentiellement au niveau de l'urothélium une semaine après traitement (Kim et al. 2016b; Kim et al. 2017; Lee et al. 2018; Li et al. 2017b). Cette diminution est proportionnelle à la quantité de CSM injectées. La dose de 1 million de CSM permet d'inhiber la CI (Lee et al. 2018). La diminution de l'apoptose par les CSM serait en partie médiée par une diminution de l'expression du gène Card10 (Caspase Recruitment Domain Family Member), (Kim et al. 2016b). Ce gène a un rôle important dans le recrutement des caspases et de Bcl10 activant la voie NF-κB et l'induction de l'apoptose (Wang et al. 2001). Cette diminution de Card10 est accompagnée par une diminution des

protéines Bax et des caspases qui sont pro apoptotiques et l'augmentation de la protéine Bcl2 qui est anti-apoptotique (Li et al. 2017b).

Après traitement par les CSM, une diminution de l'oxydation des protéines oxydées est observée (Chen et al. 2014). Les protéines Nox (NADPH oxydase) 1, 2 et 4 sont diminuées et les protéines NQO-1 (NAD(P)H déshydrogénase quinone 1) et HO-1 (Hème Oxygénase-1) sont augmentées (Chen et al. 2014; Li et al. 2017b).

Les protéines Nox sont connues pour la production de ROS et leur diminution va dans le sens d'une diminution globale du stress oxydatif (Bedard and Krause 2007). De plus, la protéine NQO-1 est une quinone réductase. Elle est antioxydante et favorise donc la diminution du stress oxydatif (Ross and Siegel 2017). Une hypoxie peut induire une augmentation du stress oxydatif dans les tissus (Luo et al. 2020). Plusieurs molécules permettent de diminuer cette hypoxie comme l'HIF-1α ou encore l'OH-1 (Hu et al. 2003a; Pachori et al. 2007). Bien que l'HIF-1α soit un acteur majeur de la réponse à l'hypoxie, l'effet des CSM sur celui-ci n'a pas été étudié dans le cadre des cystites. Cependant une augmentation de OH-1 après traitement par les CSM a été observée (Li et al. 2017b). Cette augmentation serait en faveur d'un rôle anti-hypoxique des CSM. L'OH-1 a également des effets antioxydants, anti-inflammatoires, anti-apoptotiques et immunomodulateurs dans les cellules vasculaires. Elle permet d'inhiber les cytokines pro-inflammatoires comme IL-6, IL-1β, TNFα, CCL2 et induisant les cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 (Araujo et al. 2012).

En résumé, l'action des CSM sur le stress oxydatif et sur l'apoptose permettrait d'avoir un effet protecteur sur l'ensemble de la vessie et majoritairement au niveau de l'urothélium (figure 22).

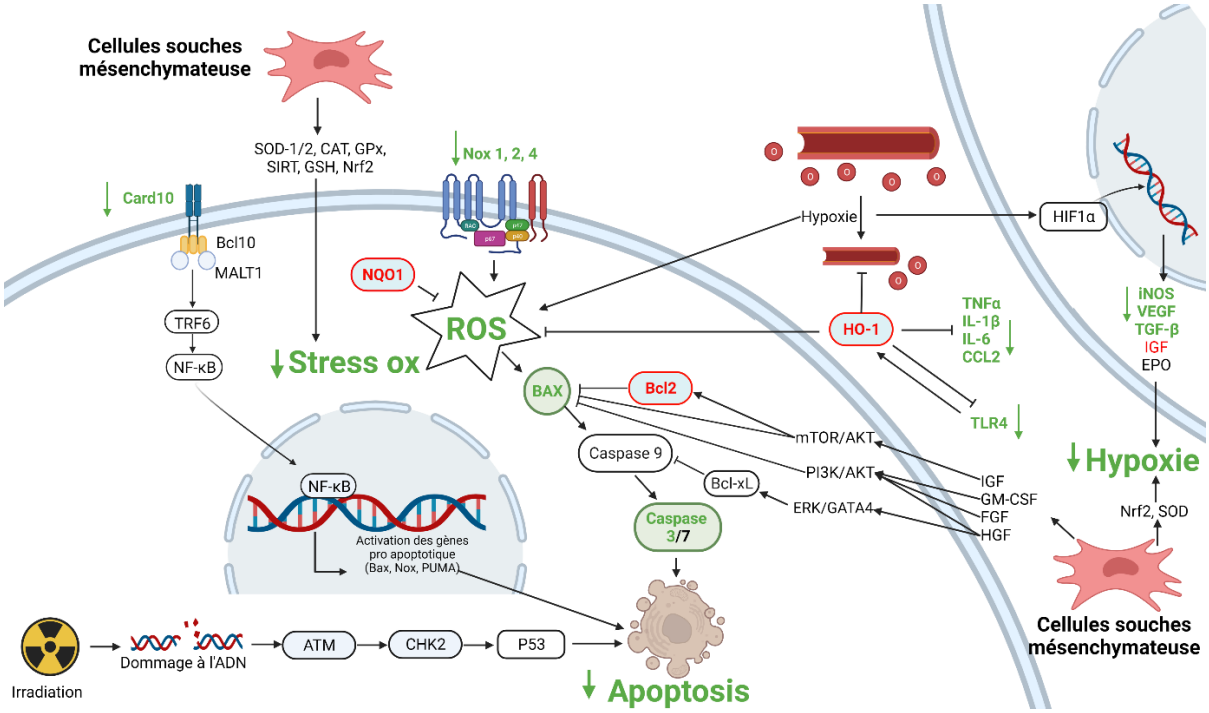


Figure 22: Effet des CSM sur l'apoptose, le stress oxydatif et l'hypoxie. En rouge, sont représentées les molécules surexprimées par le traitement par les CSM pour les cystites. En vert, est représenté les molécules sous exprimé par le traitement par les CSM pour les cystites. En bleu, sont représentées les molécules dont l'expression ne change pas suite au traitement par les CSM pour les cystites. En Noir, sont représentés les mécanismes induits par les CSM, mais non étudiés pour les cystites.

D.6.2 Urothélium

Les CSM ont un rôle important dans le maintien et dans la régénération de l'urothélium. En phase aiguë, la CI et la cystite radique induisent une dénudation de l'urothélium et en phase chronique la CRC peut conduire à une hyperplasie. Les CSM agissent sur plusieurs voies de signalisation de régénération de l'urothélium. Une des voies de signalisation majoritaires est la voie Shh (Sonic hedgehog). Shh est la principale voie de signalisation dans le maintien du pool des cellules souches basales et de leur prolifération (Wang et al. 2017a). Dans la CI, l'expression de Shh est diminuée, mais le traitement par les CSM a permis le maintien de son expression au même niveau que dans les tissus sains (Song et al. 2015). De plus, l'expression des gènes de la voie de signalisation de Shh est augmentée après traitement par les CSM. Ainsi l'expression des gènes Ptc-1 (Protein patched homolog)

et Smo (Smoothened) ont été augmentés induisant une sur-expression de Gli-1 qui est un facteur de transcription induisant différents gènes de prolifération des cellules souches (Song et al. 2015; Wang et al. 2017a). D'autres voies de signalisation comme l'EGF ou la voie Wnt rentrent en jeu dans la prolifération des cellules souches et la régénération de l'urothélium. L'augmentation de l'expression d'EGF après traitement par les CSM induit une cascade de signalisation par la voie PI3K/mTOR, qui à son tour va induire Gli-1 (Song et al. 2015). Les CSM vont également agir sur la voie Wnt. En effet, l'équipe de Song a montré une augmentation de l'expression des gènes Wnt2b, Wnt5a, Wnt8a, Wnt8b, Wnt10a, Wnt11 et une diminution de Wnt4. L'augmentation de la voie Wnt induit la β-caténine qui est un facteur de transcription activant de nombreux gènes du cycle cellulaire et du maintien du pool des cellules souches. De plus Wnt agit également sur Gli-1. Enfin, une autre voie de signalisation peut agir sur la régénération de l'urothélium dans le cadre des cystites, il s'agit de la voie IGF. Après traitement par les CSM, il y a une augmentation de l'expression des gènes IGF 1 et 2 (Kim et al. 2017). L'augmentation d'IGF va également activer la voie β-caténine et la voie PI3K/MAPK induisant la prolifération cellulaire au niveau de l'urothélium.

En conclusion, l'ensemble de la littérature montre une régénération complète de l'urothélium avec une diminution des œdèmes, de la dénudation et une régénération de la lamina propria et de la membrane basale (Chen et al. 2014; Chung et al. 2019; Kim et al. 2017; Lee et al. 2018; Ryu et al. 2018; Song et al. 2015; Xiao et al. 2017). Cette régénération de l'urothélium est accompagnée d'une augmentation des protéines ZO-1 et de l'uroplakine III qui participe à l'augmentation de l'imperméabilité urothéliale. De plus cette imperméabilité urothéliale est renforcée par la régénération de la couche des glycosaminoglycanes (Chen et al. 2014; Chung et al. 2019; Kim et al. 2020). Les CSM participent à la régénération de l'urothélium en induisant la prolifération des cellules souches basales de l'urothélium. Cette prolifération passe par les voies Shh, EGF, IGF et Wnt qui semblent toutes activer la protéine Gli-1 qui est un facteur de transcription important dans la prolifération et le maintien des cellules souches en activant les gènes Ptc-1, Myc, SOX2, NANOG ou encore Bcl2 (figure 23).

Les CSM peuvent aussi agir par d'autres voies de signalisation. Elles peuvent induire la prolifération des cellules souches par la production de Sox9, HGF, PGE-2 et TSG-6 et participer à la régénération de l'urothélium (Guillamat-Prats 2021; Semont et al. 2013). En

plus des facteurs produits par les CSM, celles-ci peuvent directement se différencier en cellules épithéliales par l'induction d'IGF, EGF, KGF et HGF (Herzog et al. 2003; Paunescu et al. 2007; Zhang et al. 2021). Ces différentes actions des CSM permettent d'induire une meilleure régénération de l'urothélium et ainsi diminuer l'émission de facteur pro inflammatoire, figure 23.

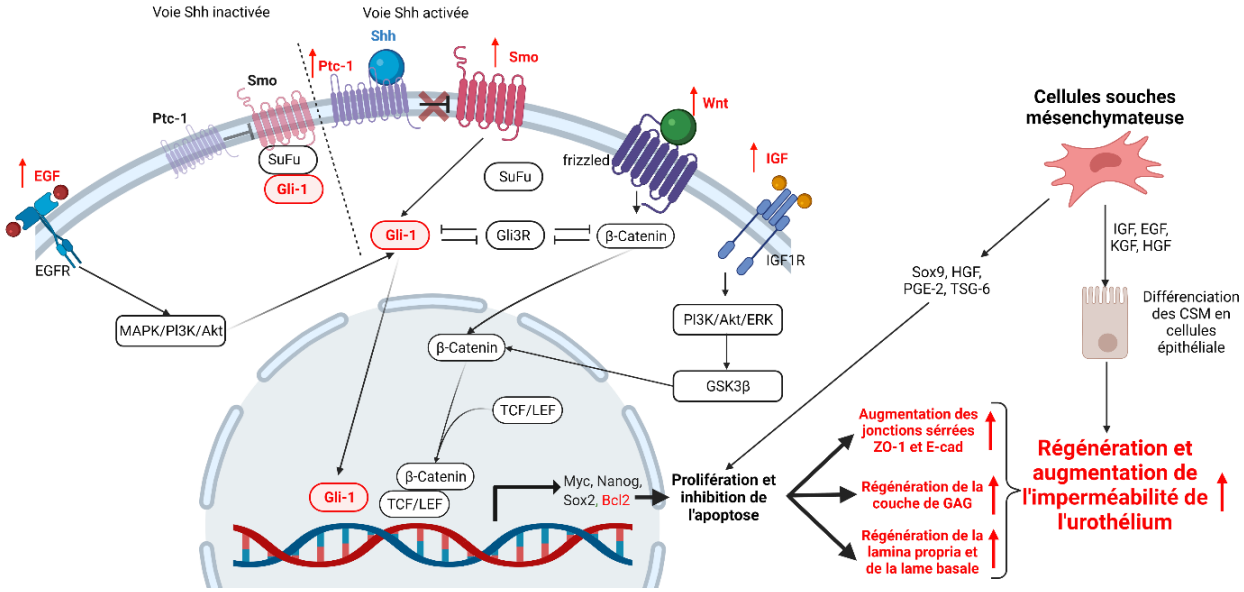


Figure 23 : Effet des CSM sur la régénération de l'urothélium.
En rouge, sont représentées les molécules surexprimées par le traitement par les CSM pour les cystites. En vert, sont représentées les molécules sous exprimées par le traitement par les CSM pour les cystites. En bleu, sont représentées les molécules dont l'expression ne change pas suite au traitement par les CSM pour les cystites. En Noir, sont représentés les mécanismes induits par les CSM, mais non étudiés pour les cystites.

D.6.3 Compartiment vasculaire

Une des cibles de l'irradiation est l'endothélium. L'irradiation peut induire une apoptose, de la sénescence, du stress oxydatif et une activation des cellules endothéliales. Ces différents mécanismes vont participer à l'augmentation de la perméabilité vasculaire, au recrutement des cellules inflammatoires ainsi qu'à l'activation du système de coagulation (Guipaud et al. 2018). Les atteintes de l'endothélium irradié vont induire la thromboxane et le VWF (Von Willebrand factor) et inhiber la prostacycline, la thrombomoduline et l'ADPase. Ces changements vont favoriser l'adhésion des plaquettes à l'endothélium favorisant les caillots sanguins et entrainant la production de cytokines par l'endothélium. Ces différents

mécanismes contribuent à la progression des lésions tissulaires radio-induites. Dans le cadre des cystites, les lésions sont renforcées par l'activation des mastocytes qui contribuent à la perméabilité vasculaire et aux recrutements des cellules immunitaires. Plus particulièrement pour la CRC, des atteintes vasculaires des hématuries et des télangiectasies (Pascoe et al. 2019) ont été mises en évidence ; cependant les mécanismes sous-jacents ont été peu étudiés. Les mastocytes qui vont produire différentes protéines comme NGF et Cox2 entrainant la production de PGE2 favorisant la perméabilité vasculaire. Cette perméabilité facilite le recrutement de cellules immunitaires. Lorsque cette perméabilité devient excessive, elle peut entrainer des micro-hémorragies puis des macro-hémorragies (Aronsson-Kurttila et al. 2018; Jaal and Dorr 2006a; Ringden et al. 2007). Le traitement par les CSM induit une diminution de Cox2 dans les CI (Chen et al. 2014) diminuant la perméabilité vasculaire et donc diminue les hématuries. Les essais cliniques de traitement par les CSM chez les patients atteints de cystite hémorragique confirment le rôle des CSM sur la vascularisation, car elles permettent de diminuer ou de stopper les hématuries à long terme chez ces patients (Aronsson-Kurttila et al. 2018; Ringden et al. 2007).

De plus, les études du traitement par les CSM des CI ont montré une diminution de l'expression des gènes NGF, PDGF et VEGFa (Song et al. 2015). NGF et PDGF sont des effecteurs du VEGF. NGF active la voie PI3K/AKT qui induit la production de VEGFa. PDGF active la voie de signalisation JAK (Just Another Kinase)/STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) puis p38/MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) qui à son tour active la production des VEGF. La diminution de l'expression de NGF et de PDGF après traitement par les CSM pourrait participer à la diminution de l'expression de VEGFa. Les travaux de chen et al. de 2014 confirment que l'effet du traitement par les CSM diminue l'expression de VEGFa (Chen et al. 2014; Xiao et al. 2017). VEGFa active les voies de signalisation PLCγ (Phospholipase C)/MAPK et PI3K/AKT. La voie PLCγ/MAPK induit la vasodilatation. La voie PI3K/AKT induit la survie et la migration des cellules endothéliales. Par conséquent, le traitement par les CSM devrait diminuer la survie et la migration des cellules endothéliales. Ce qui est contradictoire avec les résultats de Chung et al., de Qiu et al., et de Kim et al. qui montrent une augmentation de la vascularisation dans la CI et la cystite radique avec un nombre plus important de cellules endothéliales (CD31 positive) dans la sous muqueuse (Chung et al. 2019; Kim et al. 2020; Qiu et al. 2016) bien que l'expression de VEGFa soit diminuée conformément aux autres études. Cette contradiction entre la

diminution de l'expression du VEGFa et l'augmentation de l'angiogenèse après traitement par les CSM n'est pas justifiée par les auteurs. La comparaison de l'origine tissulaire des CSM montre que les CSM dérivées de l'urine et de la moelle osseuse induisent une augmentation plus importante des cellules CD31 que les CSM provenant du tissu adipeux ou du liquide amniotique (Chung et al. 2019).

Pour conclure, l'action des CSM au niveau vasculaire est démontrée dans les atteintes de la vessie. Le traitement par les CSM diminue la sécrétion de Cox2 par les mastocytes permettant de restaurer la perméabilité vasculaire, ce qui est cohérent avec la diminution des hématuries observée chez les patients traités par CSM. En revanche, le traitement par les CSM diminue l'expression de NGF et du PDGF qui à leur tour diminue l'expression du VEGFa et devrait donc diminuer l'angiogenèse. Ces résultats sont contradictoires avec l'angiogenèse visible après le traitement par les CSM pour les cystites.

L'augmentation de l'angiogenèse n'est pas expliquée par les marqueurs étudiés dans les cystites. Cependant, d'autres études démontrent que les CSM sécrètent du vWF, Ang1 et 2, du Tie-2 (tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains) et du bFGF qui participe à l'angiogenèse, pouvant expliquer le paradoxe observé dans les cystites (Gu et al. 2017; Huang and Li 2008). La diminution des hématuries dans la cystite est expliquée par la diminution de Cox-2. D'autres études font également part de l'action des CSM dans les thromboses en transformant l'AMP en adénosine par l'action de CD73. L'adénosine permet de réduire le recrutement des plaquettes diminuant ainsi les thromboses et donc les hématuries (Hashi et al. 2007; Netsch et al. 2018), voir figure 24.

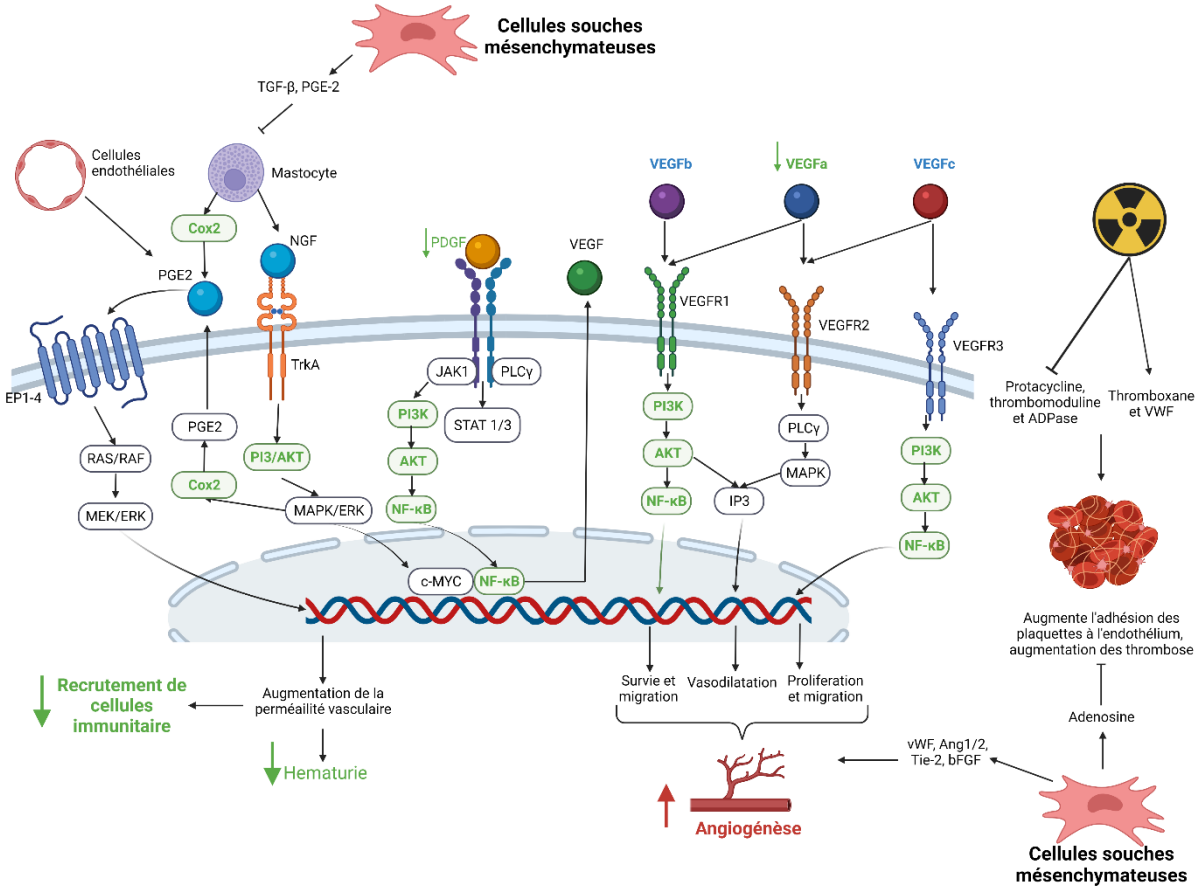


Figure 24: Effet des CSM sur le compartiment vasculaire.

En rouge, sont représentées les molécules surexprimées par le traitement par les CSM pour les cystites. En vert, est représenté les molécules sous exprimé par le traitement par les CSM pour les cystites. En bleu, sont représentées les molécules dont l'expression ne change pas suite au traitement par les CSM pour les cystites. En noir, sont représentés les mécanismes induits par les CSM, mais non étudiés pour les cystites.

D.6.4 L'inflammation

L'inflammation est un acteur important des cystites. Elle participe à l'induction de nombreux processus physiologiques comme la fibrose, les lésions vasculaires et la neuro-inflammation. Lorsque l'urothélium est lésé, différentes molécules vont pénétrer dans le tissu comme l'urée ou le potassium favorisant l'inflammation et activant la production de cytokines pro-inflammatoires. L'activation de l'inflammation est renforcée par la production de cytokines provenant des cellules endothéliales lésées. Pour la cystite radique, l'irradiation

induit l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induisant le recrutement et l'activation des cellules immunitaires. Les neutrophiles sont les premières cellules inflammatoires recrutées, suivis des lymphocytes et des monocytes, en particulier grâce aux signaux produits par les neutrophiles (Abreu et al. 2005). L'interaction des monocytes avec les lymphocytes entraine la différenciation des monocytes en macrophages, puis leur polarisation en macrophages pro-inflammatoires (M1) (Atri et al. 2018).

Après traitement par les CSM, une réduction du nombre de mastocytes, de macrophages, de monocytes et de lymphocytes T est observée dans les cystites. La diminution de l'infiltration des mastocytes est dépendant de la quantité de CSM injectée (Chen et al. 2014; Chung et al. 2019; Furuta et al. 2018; Kim et al. 2016b; Kim et al. 2016a; Kim et al. 2020; Lee et al. 2018; Li et al. 2017b; Ryu et al. 2018; Song et al. 2015; Xiao et al. 2017). Cette diminution est médiée par les TLR 2, 4, 5 et 11 (Chung et al. 2019; Kim et al. 2020). Le traitement par les CSM pour la CI diminue la production des cytokines pro-inflammatoires TNFα, CCL5, CXCL10, CCL2, INFγ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12 et induit une augmentation des cytokines anti-inflammatoires IL-17 et IL-10 (Chen et al. 2014; Kim et al. 2016b; Kim et al. 2016a; Lee et al. 2018; Li et al. 2017b; Xiao et al. 2017).

En conclusion, le traitement par les CSM permet une réduction de l'inflammation en diminuant le nombre de cellules immunitaires pro-inflammatoires présentes dans le tissu. Il en résulte une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, ainsi qu'une activation de l'expression de cytokines anti-inflammatoires. De plus, une inhibition de certaines voies de signalisation comme NF-κB est observée. La réduction globale des facteurs agissant sur l'inflammation contribuerait à limiter les lésions vésicales ainsi que la fibrose lors des cystites (figure 25).

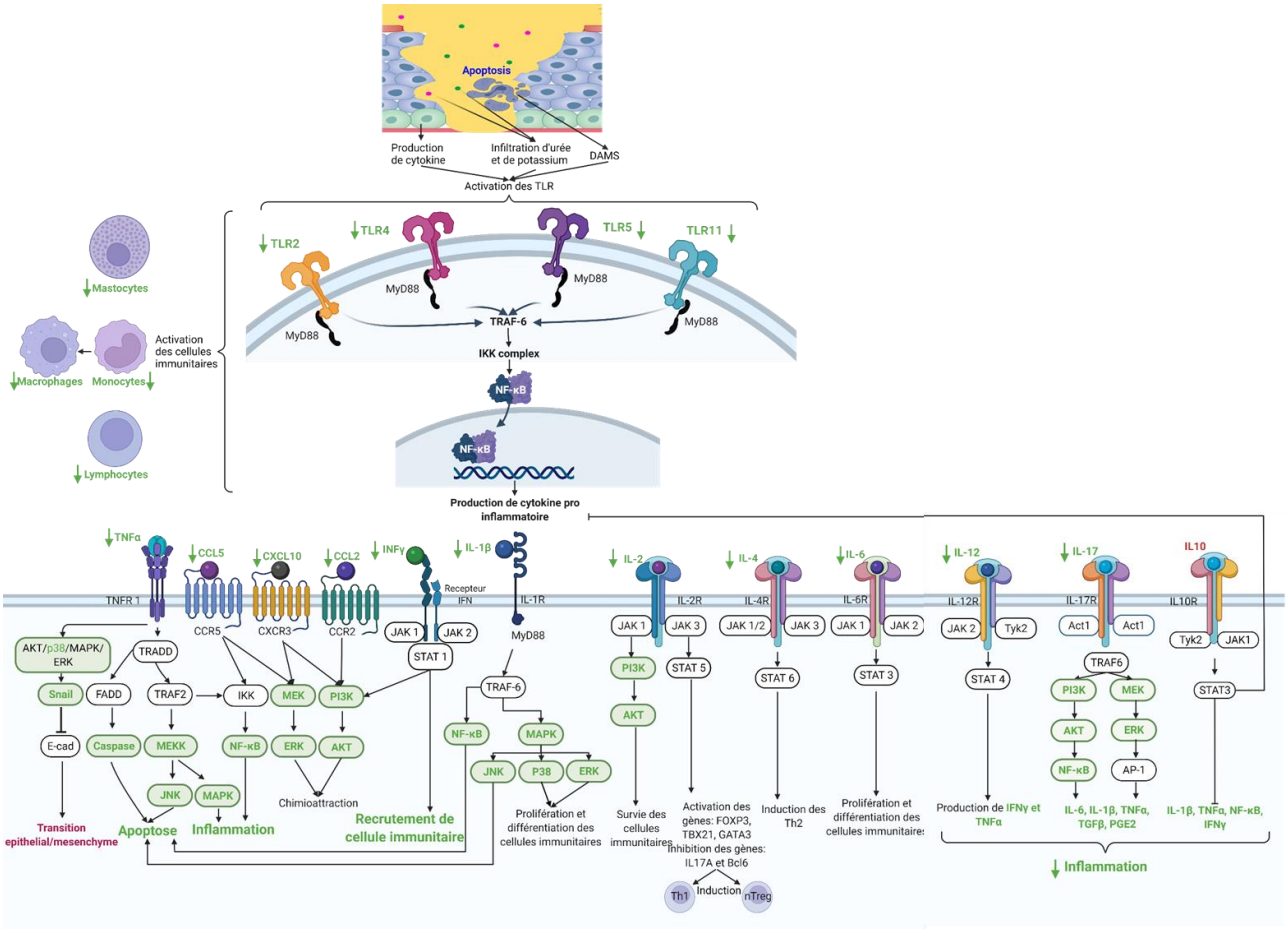


Figure 25 : Effet des CSM sur l'inflammation.

En rouge, sont représentées les molécules surexprimées par le traitement par les CSM pour les cystites. En vert, sont représentées les molécules sous exprimées par le traitement par les CSM pour les cystites. En bleu, sont représentées les molécules dont l'expression ne change pas suite au traitement par les CSM pour les cystites. En noir, sont représentés les mécanismes induits par les CSM, mais non étudiés pour les cystites.

D.6.5 Neuroinflammation

La neuroinflammation contribue aux douleurs vésicales et à la perte de neurorégulation induisant des incontinences chez les patients. Dans la CI, la neuroinflammation est principalement due aux mastocytes qui forment des clusters autour des fibres nerveuses et produisent du NGF (Theoharides et al. 1995). Le NGF agit sur les fibres nerveuses en se fixant sur les récepteurs Trka (Tropomyosin receptor kinase A) et p75. Trka peut jouer sur trois voies de signalisation. La voie NF-κB qui va induire la survie, la voie JNK

(c-Jun N-terminal Kinases) qui va induire l'apoptose et la voie AKT/MAPK qui va induire la prolifération. Le récepteur p75 va agir sur l'apoptose par la voie Jnk/cJun.

En plus du NGF, les chimiokines CCL2, 5 et CXCL1 vont se fixer sur le récepteur GPCR (G Protein-Coupled Receptors), tandis que les cytokines IL-1β et TNFα vont se fixer sur des récepteurs des cytokines. Ces deux récepteurs sont présents à la surface des neurones et vont induire de la neuro-inflammation (Ji et al. 2014).

La neuro-inflammation induit une hypersensibilisation et une hyperactivation des fibres nerveuses conduisant à une sensibilité à la douleur accrue ainsi qu'a des spasmes (Ji et al. 2014). L'hypersensibilité des neurones, et principalement des neurones afférents, induit la production de la substance P, un polypeptide neuro-modulateur et neurotransmetteur. Elle participe à la transmission des signaux nociceptifs (Zieglgansberger 2019). De plus, la substance P est un vasodilatateur (Newby et al. 1999). Ce peptide participe aussi à l'activation et au recrutement des mastocytes.

Dans la CI, une diminution des mastocytes dans le tissu et plus particulièrement autour des fibres nerveuses est observée. De plus, l'expression de NGF diminue après traitement par les CSM favorisant la diminution de la neuro-inflammation (Kim et al. 2017).

Une diminution du nombre de neurofilaments dans le tissu est également observée après traitement par les CSM, limitant ainsi les effets de la neuro-inflammation (Song et al. 2015). Une diminution de la production de substance P ainsi que la douleur chez les rats ont été observées après le traitement par les CSM (Chen et al. 2014; Kim et al. 2020). Une autre voie peut également jouer, il s'agit d'IGF. Celui-ci à un rôle sur les neurones en participant à la prolifération (MEK/ERK), à la croissance des axones (PI3K/mTOR) et à la survie des neurones (PI3K/ AKT). Or l'IGF est augmenté, ce qui peut participer à la neuro-protection (Kim et al. 2017; Song et al. 2015).

En conclusion, la diminution de la neuro-inflammation induite par le traitement par CSM résulte de la réduction de l'infiltration des cellules pro-inflammatoire, de la répression du NGF ainsi que des cytokines et de la diminution du nombre des neurofilaments. L'effet observé est une diminution des contractions involontaires. La diminution de la neuro-

inflammation réduit l'hyperactivation des neurones limitant l'apparition des spasmes, les incontinences et de la douleur (Furuta et al. 2018; Kim et al. 2016b; Kim et al. 2016a; Lee et al. 2018; Li et al. 2017b; Qiu et al. 2016; Ryu et al. 2018; Song et al. 2015; Xiao et al. 2017).

D'autres études relèvent l'action neuro-protectrice des CSM par la production de VEGF, GNDF, BNDF et par la galectine-1 principalement dans les maladies neuro-dégénératives (Baez-Jurado et al. 2019), voir figure 26.

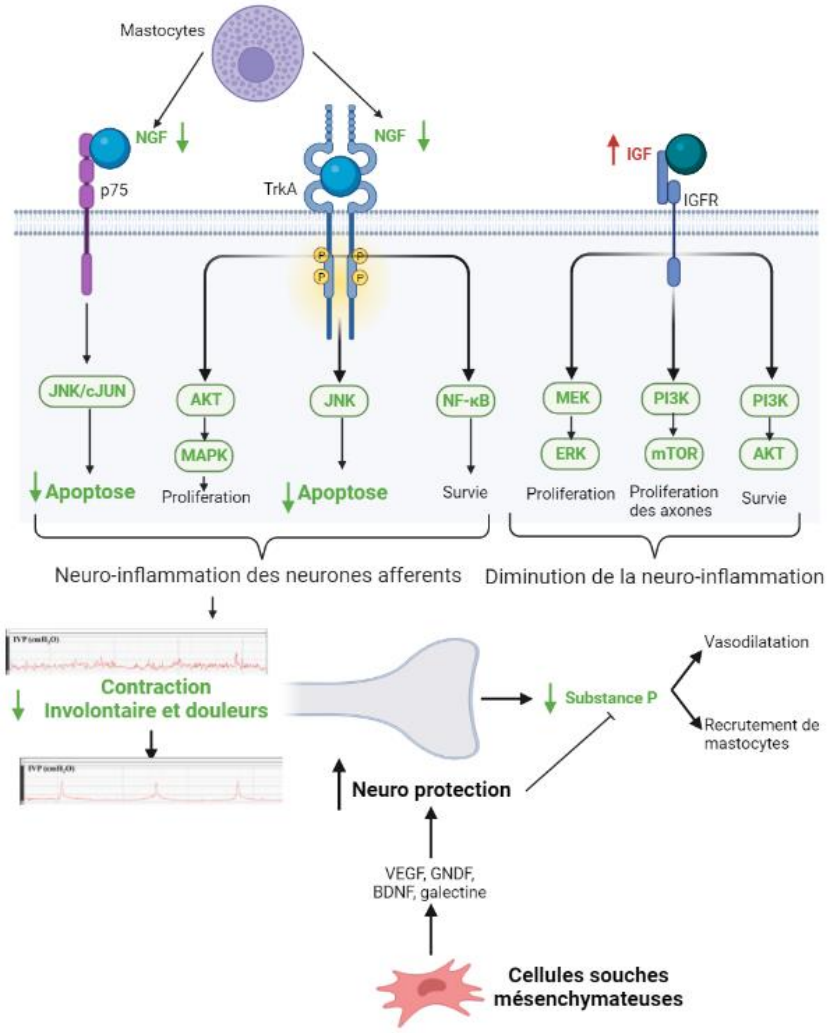


Figure 26 : Effet des CSM sur la neuroinflammation.

En rouge, sont représentées les molécules surexprimées par le traitement par les CSM pour les cystites. En vert, sont représentées les molécules sous exprimées par le traitement par les CSM pour les cystites. En bleu, sont représentées les molécules dont l'expression ne change pas suite au traitement par les CSM pour les cystites. En noir, sont représentés les mécanismes induits par les CSM, mais non étudiés pour les cystites.

D.6.6 Fibrose

Dans la CI et la CRC, après traitement par les CSM, il y a une diminution globale de la fibrose avec une augmentation du ratio muscle/MEC et une diminution des fibres de collagènes accompagnés d'une diminution du nombre de cellules TGFβ2 et Smad 1 et 2 positifs (Kim et al. 2016a; Kim et al. 2017; Kim et al. 2020; Ko et al. 2016; Lee et al. 2018; Ryu et al. 2018; Song et al. 2015). La diminution des collagènes a été reliée à la diminution de l'expression des TGFβ 1, 2 et 3 des SMAD et des Snail ainsi que du CTGF. De plus, le remodelage semble diminuer avec la baisse de MMP9 (Chen et al. 2014). La régression de la fibrose permet à la vessie de retrouver une « souplesse » normale diminuant ainsi la pression maximale (Kim et al. 2016b; Li et al. 2017b; Ryu et al. 2018; Xiao et al. 2017).

Les résultats observés dans les cystites sont cohérents avec la littérature. La diminution de la fibrose est une des actions majeures du traitement par les CSM et elle est observée dans de nombreux autres modèles comme la fibrose pulmonaire ou la rectite radique (Li et al. 2021b; Usunier et al. 2021). L'action des CSM sur la fibrose est renforcée par la diminution de l'inflammation chronique.

L'action des CSM sur la fibrose est principalement induite par les facteurs HGF et TSG-6. HGF va inhiber la production de TGF-β et par l'inhibition de SMAD 2 et 3 (par TGFI). Ces deux voies d'action vont inhiber la transition fibroblaste en myofibroblaste et donc la fibrose. HGF inhibe également la transition épithélium et mésenchyme par l'action de SnoN participant de fait à la diminution de la fibrose (Dai and Liu 2004; Liu 2004; Mizuno et al. 2005; Yang et al. 2003, 2005). TSG-6 inhibe directement les myofibroblastes et participe à la diminution du remodelage de la matrice en inhibant les MMP par l'action de la plasmine serine protéase. L'ensemble de ces actions par les CSM diminue durablement la fibrose, voir la figure 27.

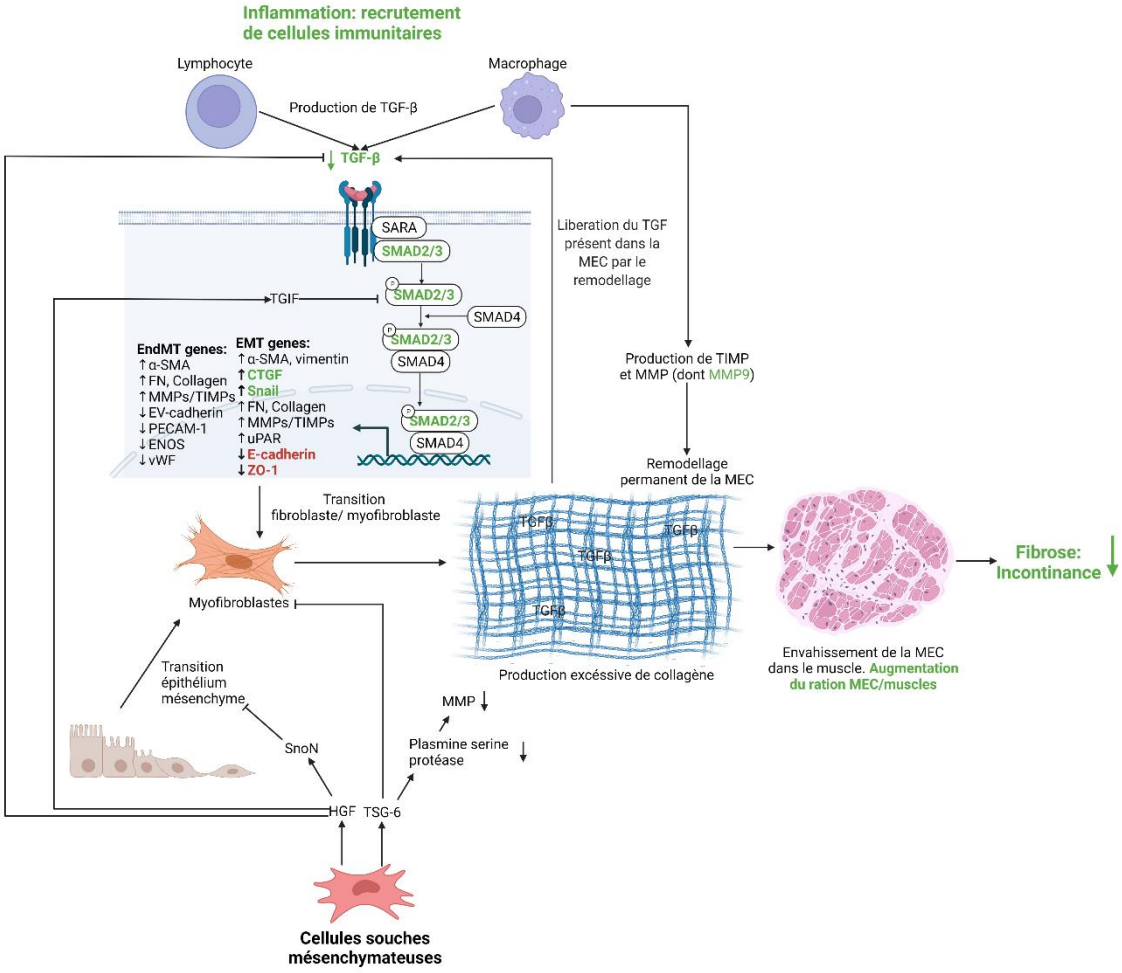


Figure 27 : Effet des CSM sur la fibrose.

En rouge, sont représentées les molécules surexprimées par le traitement par les CSM pour les cystites. En vert, sont représentées les molécules sous exprimées par le traitement par les CSM pour les cystites. En bleu, sont représentées les molécules dont l'expression ne change pas suite au traitement par les CSM pour les cystites. En noir, sont représentés les mécanismes induits par les CSM, mais non étudiés pour les cystites.

D.6.7 Conclusion

Ces résultats suggèrent la capacité des CSM à inhiber les processus physiopathologiques. Les effets des CSM sont multi-ciblés et comprennent la réduction de l'inflammation chronique par la diminution du recrutement des cellules immunitaires ainsi que la diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et l'augmentation de l'expression des cytokines anti-inflammatoires. Les CSM diminuent la neuroinflammation ce

qui a pour conséquence de réduire les douleurs et les spasmes. En diminuant l'ischémie du tissu, les CSM permettent une régénération vasculaire. Par ces actions anti-fibrotiques, les CSM induisent une augmentation des fibres musculaires, réduisant ainsi les incontinences. De plus, les CSM diminuent l'apoptose et favorisent la régénération de l'urothélium permettant une augmentation de l'imperméabilité des tissus.

D.7 Identification des mécanismes et effecteurs permettant l'action des CSM sur la CRC

Bien que les voies d'action des CSM n'aient pas été décrites dans la CRC, les nombreuses données de la littérature sur la CI et les autres pathologies radio-induites, suggèrent une action globale des CSM, en agissant sur de multiples compartiments dont l'urothélium, le réseau vasculaire, l'inflammation et la neuro-inflammation. En nous basant sur les mécanismes communs aux différentes cystites, nous pouvons émettre un certain nombre d'hypothèses afin d'étudier les modes d'action des CSM sur les mécanismes de progression de la CRC. Les principaux mécanismes mis en jeu sont la protection de l'urothélium et de la vascularisation en accord avec les résultats sur les autres types de cystites (figure 28 à la fin de la partie D.7).

La régénération de l'urothélium passerait par la voie paracrine avec l'émission des facteurs tels HGF, EGF, IGF, Wnt et Shh. La production de ces facteurs induit l'expression de gène lié à la prolifération des cellules souches (Myc, Nanog ou Sox2) favorisant une régénération de l'urothélium, de la lamina propria et de la lame basale. Cette régénération induit une augmentation des jonctions serrées et des GAG permettant de régénérer un urothélium fonctionnel. HGF, EGF, IGF, Wnt et Shh semblent les effecteurs principaux de la régénération de l'urothélium. Un biomarqueur potentiel de cette régénération serait l'APF (AntiProliferating Factor). L'APF est un sialoglycopeptide (avec une séquence d'acides aminés identique au sixième domaine transmembranaire de Frizzled-8, un récepteur du ligand Wnt) qui inhibe la prolifération des cellules épithéliales. Celle-ci est augmentée dans l'urine des patients avec une CI (Chavda et al. 2017; Zwaans et al. 2018). Cette augmentation induit des altérations dans la régénération de l'urothélium et donc de l'érosion. Cette protéine est un

biomarqueur efficace dans la CI, mais n'a, à notre connaissance, jamais été décrite dans la CRC. Dans la CRC d'autres biomarqueurs ont été mis en évidence dans les urines avec l'augmentation de HGF (Zwaans et al. 2018). Les effets de ces CSM sur l'APF ne sont pas connus à ce jour, mais il a été démontré que les CSM induisaient HGF et PIGF (Matsumoto and Nakamura 1993; Park et al. 2014). L'étude de ces trois protéines dans les urines permettrait d'identifier des biomarqueurs ainsi que de mieux comprendre les mécanismes induits par les CSM dans la CRC.

L'action des CSM sur le compartiment vasculaire dans la CRC demeure partielle. Mais les CSM induisent une diminution des hématuries. Dans la CI, les CSM ont diminué l'expression de différents effecteurs comme Cox 2 par l'action de PGE-2 (Chen et al. 2014) ainsi que de NGF, PDGF et VEGFα (Song et al. 2015). Les CSM dans la CRC devraient agir par des mécanismes similaires. L'induction de PGE-2 par les CSM devrait diminuer l'expression de Cox-2 et donc diminuer l'imperméabilité vasculaire réduisant ainsi les hématuries. Les CSM émettent d'autres effecteurs comme vWFn Ang1/2 et Tie-2 qui peuvent favoriser l'angiogenèse et diminuer les lésions vasculaires comme les télangiectasies (Ge et al. 2018; Gu et al. 2017). L'étude de ces différents effecteurs permettrait d'améliorer la compréhension des mécanismes d'action des CSM. De plus, dans la CRC, la concentration de VEGF et de PlGF (placental growth factor) dans les urines augmente chez les patients la première année avant de diminuer. Pour les patients présentant des hématuries, VEGF est continuellement exprimé. HGF, PIGF et VEGF pourraient être des biomarqueurs de l'efficacité des CSM.

Les CSM ont également une action antioxydante. Les irradiations produisent des ROS, si une augmentation des ROS dans la CRC existe alors il pourrait y avoir une augmentation d'iNOS, de NO et d'AP-1 (protéine activatrice 1). Dans la CI, les CSM ont une action antioxydante par l'induction d'effecteur comme d'OH-1 et NQO-1 (Chen et al. 2014; Li et al. 2017a). Dans d'autres pathologies radio-induites, les CSM permettent la production de SOD, Nrf 2 et d'autres types protéines diminuant le stress oxydatif ce qui pourrait permettre de limiter ce mécanisme, fortement lié à l'inflammation et à l'apoptose. D'autres effecteurs comme HGF ou IGF peuvent induire une diminution de l'apoptose en induisant Bcl2 et en inhibant la caspase 9 (Huang et al. 2007; Kitta et al. 2003; Liu 1999; Okada et al. 2019; Wang et al. 2020).

Au niveau de l'inflammation, les CSM ont une fonction immuno-régulatrice qui peut permettre de limiter la progression de la CRC à plusieurs niveaux. Les CSM induisent la diminution du recrutement de cellules immunitaires principalement par la production d'effecteurs comme PGE-2, IDO, TGF-β, HGF, IL-10 et TSG-6 (Singer and Caplan 2011). Dans la CI il a principalement été démontré que les CSM induisent une diminution des TLR, des cytokines pro-inflammatoires et induites des cytokines anti-inflammatoires (Chen et al. 2014; Kim et al. 2016b; Kim et al. 2016a; Lee et al. 2018; Li et al. 2017b; Xiao et al. 2017). Il en résulte principalement une diminution des mastocytes qui sont fortement lié à l'inflammation dans la CRC. Ces cellules peuvent produire de la tryptase et du PGP-2 qui induit la vasodilatation la perméabilité vasculaire. L'action des CSM sur les mastocytes via PGE-2 et TGF-β pourrait inhiber la sécrétion de tryptase et le PGP-2. De plus en inhibant l'inflammation, au niveau des mastocytes, les CSM pourraient limiter la sécrétion de NGF qui est impliqué dans la neuro-inflammation. Dans la CI les CSM limitent la neuro-inflammation par l'induction d'IGF ce qui a permis de limité les spasmes, les incontinences et les douleurs (Furuta et al. 2018; Kim et al. 2016b; Kim et al. 2016a; Lee et al. 2018; Li et al. 2017b; Qiu et al. 2016; Ryu et al. 2018; Song et al. 2015; Xiao et al. 2017). De plus, les CSM induisent un changement de polarité des macrophages et des lymphocytes favorisant un profil anti-inflammatoire par l'action de TSG-6 (Corcione et al. 2006; Dominici et al. 2006; Prockop 2013). D'autres effecteurs ont été décrits dans la littérature comme GNDF et BDNF (Baez-Jurado et al. 2019).

Les télocytes ont un rôle dans l'inflammation et la neuro-inflammation lors des cystites. Ils produisent des cytokines et favoriseraient les atteintes neurales conduisant à des incontinences et des spasmes. L'altération du réseau télocyte/myofibroblaste/neurone pourrait accroitre ces lésions. L'action des CSM sur ces cellules n'est pas connue à ce jour. Il ne semble pas y avoir d'effecteurs des CSM pouvant agir directement dessus. Mais la diminution de l'inflammation, l'augmentation de la régénération et la diminution de fibroblastes pourraient jouer un grand rôle dans le maintien du réseau télocyte/myofibroblaste/neurone limitant grandement les altérations vésicales. À ce titre, HGF, TSG-6 et PGE-2 semblent être des effecteurs potentiels. En limitant l'inflammation, par les processus de diminution des ROS, de régénération de l'urothélium et du compartiment vasculaire, d'immunomodulation et

de neuroprotection, les CSM pourraient limiter l'apparition des œdèmes dans la sous muqueuse et évier la déstructuration du réseau télocyte/myofibroblaste/neurone.

En ce qui concerne la fibrose, le recrutement des macrophages et des lymphocytes induit l'expression de TGF-β1. Le TGF-β1induit les myofibroblastes et participe à l'acquisition d'un profile similaire aux myofibroblastes par les télocytes. La conséquence est une production excessive de collagène I et III conduisant à la fibrose. Comme nous l'avons vu précédemment, l'effet anti-fibrosant des CSM est médié par HGF et TSG-6, deux effecteurs majeurs dans l'action anti-fibrotique des CSM (Usunier et al. 2021). Ces deux facteurs inhibent la production de TGF-β, la transition épithélium mésenchyme et le remodelage de la MEC (Dai and Liu 2004; Liu 2004; Mizuno et al. 2005; Yang et al. 2003, 2005). De plus, dans la CI, les CSM inhibent la production de CTGF, un autre effecteur de la fibrose. Pour compléter les hypothèses sur les effecteurs mis en jeu par les CSM dans la CRC. La diminution du recrutement des mastocytes par les CSM devrait inhiber la production d'YKL-40 comme observé dans la CI. L'ensemble des effecteurs des CSM pouvant agir sur le CRC est résumé dans la figure 28.

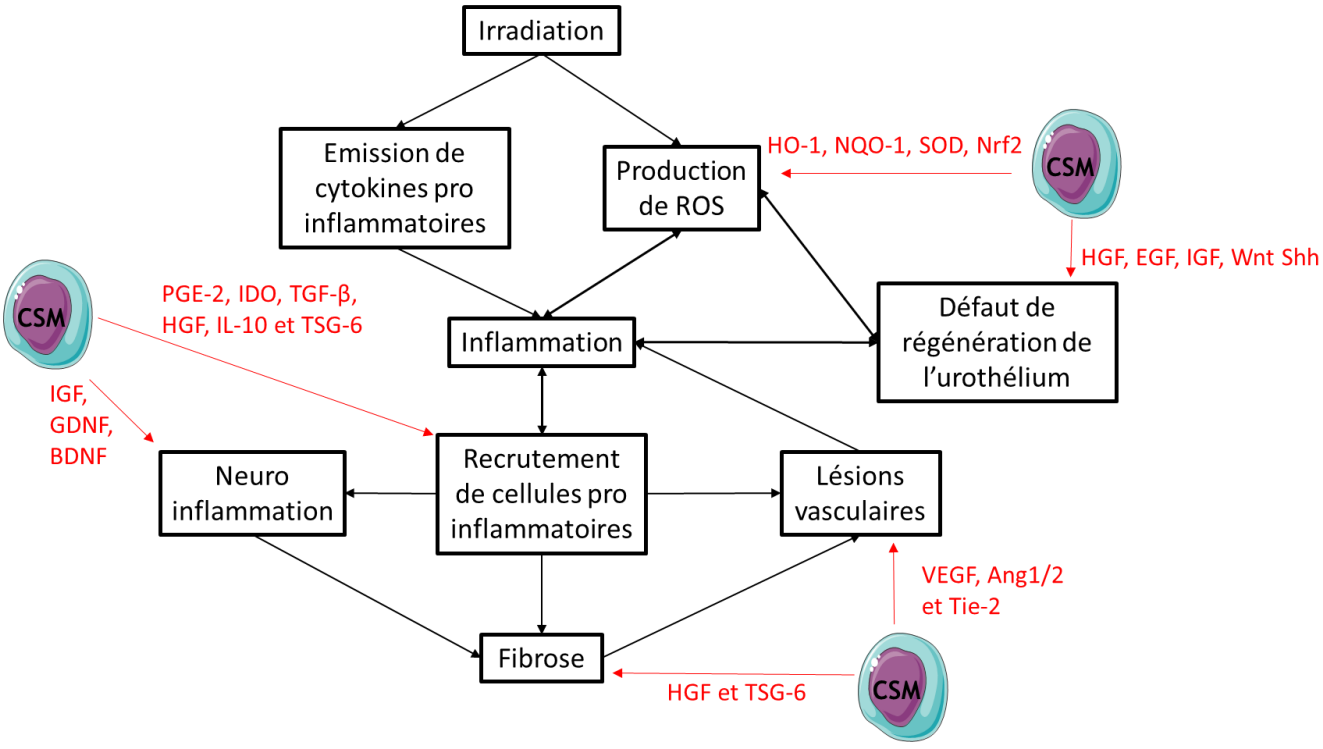


Figure 28 : Schéma synthèse des effecteurs possibles des CSM dans la CRC

Problématique & Objectifs

L'objectif de cette thèse est d'évaluer les bénéfices thérapeutiques du traitement par CSM dans les complications tardives et sévères des lésions radio-induites de la vessie, également appelé cystite radique chronique. Cette pathologie est invalidante, créant des hématuries, des incontinences et des douleurs chez les patients pouvant aller jusqu'au décès des patients. Les mécanismes sous-jacents restent mal connus, mais des lésions de l'urothélium, de l'inflammation, des lésions vasculaires et de la fibrose ont été décrites.

À l'heure actuelle, les traitements sont palliatifs et le taux de survie des patients ne cesse d'augmenter et la proportion des patients atteints de CRC également. De plus, l'accident d'Épinal a mis en exergue le besoin de développer de nouveau traitement. Les pathologies inflammatoires sévères telles que la maladie du greffon contre l'hôte ou les Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin engendrent des dommages tissulaires similaires aux séquelles chroniques des radiothérapies pelviennes. De nombreux essais cliniques ont utilisé les CSM avec succès dans ces maladies. Les CSM semblent donc être un traitement prometteur pour la CRC. Néanmoins, aucune étude à ce jour n'a été menée sur l'efficacité des CSM dans la CRC à l'exception de l'Essai compassionnelle sur les patients d'Épinal, avec un succès important avec la diminution des douleurs et des hématuries.

Le manque de données sur les mécanismes menant à une CRC ainsi que les mécanismes d'actions des CSM ne permettent pas une compréhension globale des phénomènes mis en jeu dans la CRC. De plus, des points d'interrogation restent en suspens sur l'innocuité des CSM. D'une part, la capacité des CSM à produire une large gamme de facteurs de croissance pourrait favoriser la croissance de cellules tumorales résiduelles après radiothérapie. D'autre part, la capacité des CSM à se différencier en cellules productrices de MEC, responsables de la fibrose, pose la problématique d'un possible effet pro-fibrosant des CSM transplantées. Cette étude a donc été développée selon 2 axes principaux :

(i) Créer un modèle de cystite radique chronique cohérent avec les modèles cliniques et étudier les mécanismes de la CRC

(ii) Évaluer l'effet des CSM sur la CRC et comprendre sur quel paramètre elles agissent

Afin de comprendre les mécanismes de la CRC et des CSM, des rats Sprague-Dawley ont été irradiés puis traités ou non avec des CSM.

Dans un premier temps, la dose optimale pour induire une CRC et les paramètres les plus pertinents de suivi de la cystite radique ont été déterminés. Dans un second temps, les effets des CSM ont été étudiés. L'objectif était de faire une preuve de concept de l'efficacité des CSM dans la CRC. Pour cela, les rats ont été irradiés à la dose minimale pour induire une CRC et les CSM ont été injectées juste avant la phase chronique afin de potentialiser leurs effets (3 injections à 15 jours d'intervalle).

Les principaux paramètres étudiés ont été les hématuries, les atteintes de l'urothélium (hyperplasie et perméabilité), l'inflammation et la fibrose.

Résultats

I Article de thèse

Mesenchymal stem cells limit vascular and epithelial damage and restore the impermeability of the urothelium in chronic radiation cystitis

Clément Brossard[1], Anne-Laure Pouliet[1], Anne-Charlotte Lefranc[1], Mohamedamine Benadjaoud[2], Morgane Dos Santos[3], Christelle Demarquay[1], Valerie Buard[1], Marc Benderitter[1], Jean-Marc Simon[4], Fabien Milliat[1] and Alain Chapel[1*]

1 - Service de recherche en radiobiologie et en médecine régénérative (SERAMED), Laboratoire de Radiobiologie des expositions médicales (LRMED), Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), 31 avenue de la division Leclerc, Fontenay-aux-Roses, F-92260 Paris, France; clement.brossard@irsn.fr (C.B.); pouliet.al@orange.fr (A.-L.P); charlotte1810.lefranc@gmail.com (A.-C.L.); mohamedamine.benadjaoud@irsn.fr (M.B); morgane.dossantos@irsn.fr (M.D.-S); marc.benderitter@irsn.fr (M.B.); fabien.milliat@irsn.fr (F.M.)

2 - Service de recherche en radiobiologie et en médecine régénérative (SERAMED), Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), 31 avenue de la division Leclerc, Fontenay-aux-Roses, F-92260 Paris, France

3 - Service de recherche en radiobiologie et en médecine régénérative (SERAMED), Laboratoire de radiobiologie des expositions accidentelles (LRAcc), Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), 31 avenue de la division Leclerc, Fontenay-aux-Roses, F-92260 Paris, France

4 - APHP, Hôpital universitaire Pitié-Salpêtrière, Département de radiothérapie oncologie, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris cedex 13, France.

* Correspondence: alain.chapel@irsn.fr

Abstract:

Background: Cellular therapy seems to be an innovative therapeutic alternative for which mesenchymal stem cells (MSCs) have been shown to be effective for interstitial and hemorrhagic cystitis. However, the action of MSCs on chronic radiation cystitis (CRC) remains to be demonstrated. The aim of this study was to set up a rat model of CRC and to evaluate the efficacy of MSCs and their mode of action.

Methods: CRC was induced by single-dose localized irradiation of the whole bladder using two beams guided by tomography in Sprague-Dawley rat. A dose range of 20 to 80 Gy with follow-up 3 to 12 months after irradiation was used to characterize the dose effect and the kinetics of radiation cystitis in rats. For the treatment, the dose of 40 Gy was retained, and in order to potentiate the effect of the MSCs, MSCs were isolated from adipose tissue. After expansion, they were injected intravenously during the pre-chronic phase. Three injections of 5 million MSCs were administered every fortnight. Follow-up was performed for 12 months after irradiation.

Results: We observed that the intensity and frequency of hematuria are proportional to the irradiation dose, with a threshold at 40 Gy and the appearance of bleeding from 100 days post-irradiation. The MSCs reduced vascular damage as well as damage to the bladder epithelium.

Conclusions: These results are in favor of MSCs acting to limit progression of the chronic phase of radiation cystitis. MSC treatment may afford real hope for all patients suffering from chronic radiation cystitis resistant to conventional treatments.

Keywords: Chronic radiation cystitis, Mesenchymal stem cell, Cell therapy

Background

Interstitial, radiation and hemorrhagic cystitis have high incidence rates and treatments used for the most severe forms may be palliative. Previous studies have shown that mesenchymal stem cells (MSC) therapy is an alternative treatment for interstitial cystitis and hemorrhagic cystitis [1-4]. MSC treatment of radiation cystitis, on the other hand, has not yet been studied. However, the similar mechanisms of these pathologies favor a protective effect

of MSCs on the chronic evolution of radiation cystitis [5]. Interstitial cystitis (IC) is an idiopathic disease which affects over one million people worldwide [6, 7]. Hemorrhagic cystitis (HC) is due to a wide variety of etiologies, including radiotherapy, with a frequency of 5-10% in the 6-20 years after radiation therapy [8] and with an incidence of between 7 and 68% [9-11] for hematopoietic stem cell transplantation. Chronic radiation cystitis (CRC) is a lesion of the bladder resulting from radiation therapy (prostate, colon, or cervix).

The chronic phase of radiation cystitis may appear from 6 months to 20 years in 5 to 10% of patients after radiation therapy [12, 13]. CRC is characterized by vascular damage, epithelial injury, incontinence, hematuria, pelvic pain and, in the most severe cases, fistulas and death [14]. Vascular and urothelial damage contribute significantly to the progression of radiation cystitis in its chronic form. In CRC, as in other chronic radiation diseases, the progression of radiation-induced vascular and tissue damage is due in part to early events in endothelial cells. The slow regeneration of the endothelium could be the reason for the late vascular damage during the chronic phase [15]. These vascular lesions are characterized by telangiectasias and rupture of some blood vessels, creating microhemorrhages [8, 9].

In other types of cystitis, treatment with MSCs induces neovascularization, which could participate in the reduction of hematuria [2, 16-18]. The urothelium is the source of most cystitis in the acute phase. Its loss of impermeability leads to deep damage to the bladder wall. Imperfect repair of the urothelium leads to long-term damage, which is responsible for the chronic phases of cystitis [5]. Lesions of the urothelium are mainly due to decreased uroplakin expression and hyperplasia, both of which promote a loss of permeability of the urothelium [19, 20]. Preclinical studies of MSC treatment of interstitial and hemorrhagic cystitis have shown that MSCs protect the urothelium from these injuries [1, 17, 21-23]. Furthermore, the action of MSCs on regeneration of irradiated epithelia has been demonstrated at the intestinal level [24].

Currently, no effective treatment is available and MSCs could be an alternative treatment. For CRC, a compassionate study of treatment for 4 over-irradiated patients from the Épinal radiotherapy accident supports a reduction in hematuria [2]. These results need to be confirmed by a preclinical study and the action of MSCs on vascular and urothelial damage needs to be characterized during the chronic evolution of radiation cystitis.

Based on the results of previous studies on cystitis and irradiated healthy tissue, we investigated the role of MSCs on vascular and urothelial injury in order to establish whether cell therapy is an effective therapeutic alternative for the treatment of CRC. We have developed

a rat model of chronic radiation cystitis using single dose bladder irradiation. Intravenous MSC treatment was evaluated for urothelial and vascular damage using physiological and tissue approaches.

Methods

Animals

All experiments were performed in compliance with French laws and guidelines relative to animal experiments (French Act No.92–333 of 2 October 2009) and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation [CEEA Number 81 (Protocol numbers: P09–10) (APAFiS: #12922-201801051531419 v1, #17561-201801051531419 v2 (*projet* P17-09) and #20993-201906071027312 v2 (*projet* P19-09)]. To study the dose effect of bladder irradiation on the kinetics of radiation cystitis, 120 rats were irradiated at doses from 20 to 80 Gy (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 Gy) and were followed up over the next 10 months. To evaluate the treatment using MSCs, the rats were then divided into 3 groups of 30 rats each. The animals were housed in double-decker cages, two or three to a cage, with access to food and water ad libitum and with light and dark cycles. Every effort was made to minimize suffering and all experiments were performed under gaseous anesthesia with isoflurane (Aerrane, Baxter SA, Lessines, Belgium). Animal behavioral and physiological parameters (e.g. bleeding and diarrhea) were monitored daily and suffering animals were euthanized. Euthanasia was performed by cardiac puncture under isoflurane anesthesia. Sprague-Dawley (Javier Labs) rats were aged ten weeks (250-300g) at the beginning of the experiment. The protocol is described in further detail below and in Figure 1A.

Radiation schedule

Irradiation was performed using the SARRP (Small Animal Radiation Research Platform) from Xstrahl Life Sciences (XSTRAHL Ltd., Camberley, UK) with a voltage of 220 kV, an intensity of 13 mA, a dose rate of 2.4 Gy per minute, a collimator of 10 x10 mm^2 and a source-sample distance of 35 cm. An inherent filtration of 0.8 mm Beryllium and an additional

filtration of 0.15 mm Copper (half-value layer = 0.667 mm Copper) were used. A CT scan was performed to visualize the position of the bladder and place the isocenter. Segmentations and dose calculations were performed with Muriplan software. Two irradiation beams were used with an angle between 90 and 120°. The animals were anesthetized and maintained with isoflurane (between 2 and 3.5% depending on the animal, with an air flow of 0.4 L/minute) and then placed in the SARRP. The rats were placed on their backs with their legs raised and spread, reminiscent of the supine Mézières position, and then the animals were held in position using adhesive plasters (see Figure 1 A to F).

To determine the optimal irradiation dose and to study the kinetics of radiation cystitis, 120 animals received single dose irradiation of 0, 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80 Gy. For each irradiation dose, 5 animals were euthanized at 3, 6 and 10 months post-irradiation.

To study the effect of MSC treatment on CRC, a group of 30 animals were not irradiated (unirradiated group), a group of 30 rats was irradiated at 40 Gy (irradiated group) and a group of 30 rats was irradiated at 40 Gy and injected with 3 intravenous injections of 5 million of MSC (per rat) at intervals of two weeks, 4.5, 5 and 5.5 months post-irradiation (irradiated treated group). For each group, 10 animals were euthanized at 6, 8 and 12 months post-irradiation. The MSC injection protocol was designed to maximize the treatment effect according to previous studies. Ten animals were euthanized at 6, 8 and 12 months post-irradiation. Cystoscopies at 6 and 12 months were performed to visualize vascular lesions (Figure 1 G). Hematuria was monitored once a month after irradiation (Figure 2).

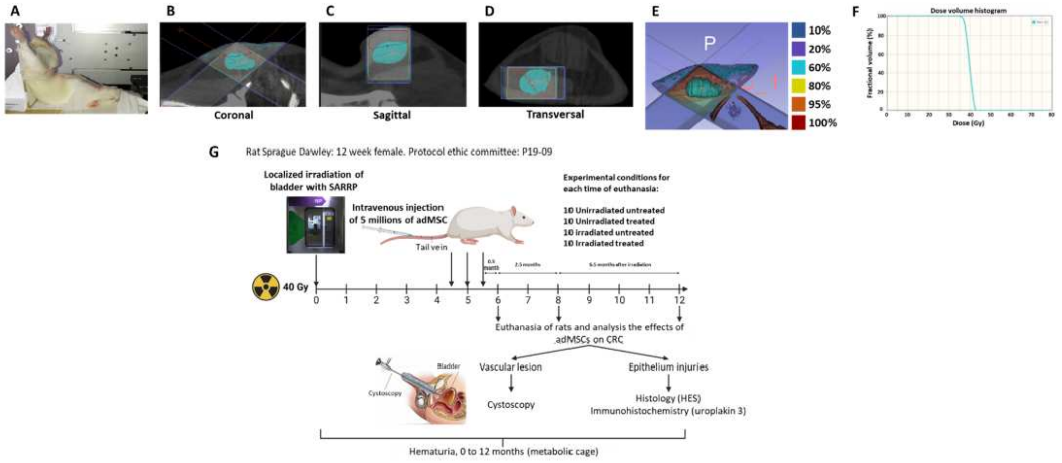


Figure 1: Irradiation configuration with the Small Animal Radiation Research Platform (SARRP) and study of hematuria. In the pictures, the bladder is represented in blue. **A:** Placement of the animal in the SARRP. **B:** Coronal view of the bladder. **C:** Sagittal view of the bladder. **D:** Transverse view of the bladder. **E:** Representation of the isodose distribution in the tissue for a dose of 40 Gy. The bladder is represented in blue and receives 100% of the dose. **F:** Histogram of the dose per volume in the bladder for a dose of 40 Gy. **G:** Experimental design for studies with MSC treatment with a dose of 40 Gy and 12 months follow-up. Injections of 5 millions of MSC are performed at 4.5, 5 and 5.5 months post-irradiation. Euthanasia times are at 6, 8 and 12 months post-irradiation and tissue analyses are performed. Cystoscopies are performed at 6 and 12 months post-irradiation

Analysis of hematuria and vascular lesions

The rats were weighed and then placed in a metabolic cage once a month for 18 hours and their urine was collected (as previously described [25]). The urine was analyzed using urine strips (URITOP 10 parameters, Exacto PRO® from Biosynex). Vascular lesions were analyzed by endoscopy at 6 and 12 months post-irradiation (Karl Storz cystoscope, 11583A).

Isolation, characterization and culture of MSCs

GFP-MSCs were extracted from adipose tissue obtained from seven-week-old eGFP transgenic rats as described previously [26]. Briefly, subcutaneous inguinal adipose tissue was harvested from eGFP-SD rats, finely cut and enzymatically digested with 0.1% type I collagenase (reference: C0130, Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) at 37°C, and then filtered through a 40 µm filter. This process was repeated three times, and the collagenase was neutralized with 10% Fetal Bovine Serum (FBS). Cells were washed with Phosphate Buffered Saline (PBS plus 10% SVF) and suspended in MEM-α containing 20% FBS, 1% penicillin/Streptomycin and 1% L-Glutamine. The cells were seeded at 1000 cells/cm², and the medium was changed every 4 days. After 11-13 days, cells were trypsinized (trypsin-0.25% EDTA, Thermo Fisher Scientific), washed three times with PBS and suspended at 1 million cells/mL. The phenotype of the amplified Ad-MSCs was verified by flow cytometry. The

presence of CD29 (clone Ha2/5; BD Biosciences), CD90 (clone OX-7; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and CD73 (clone 5F/B9; BD Biosciences), and the absence of CD34 (clone ICO115; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA) and CD45 (clone OX-1; BD Biosciences) were analyzed. The ability to form colony-forming unit fibroblasts (CFU-F) was also analyzed. CFU-Fs were stained with crystal violet and counted 11 days after initial seeding.

Immunohistology

Bladders were collected and preserved in PFA (Paraformaldehyde) and incubated for 12 hours (fixation) before being processed for paraffin embedding. Sections of 5 µm were taken. These sections were subjected to hematoxylin and eosin (H&E) staining and immunohistochemistry. On H&E sections, lesions characterized as hyperplasia (abnormal thickening of the urothelium with hyperchromasia) were measured. For this purpose, a ratio of urothelium with hyperplasia to total urothelium length was performed. A ratio of the hyperplastic length to the total length of the urothelium was performed. The superficial cells were labeled with uroplakin III (Abcam, ref: ab78196; dilution: 1/500, citrate buffer pH 6, 1X) and then revealed using the Horse Radish Peroxidase (HRP) System (Zytomed ref: ZUC070-100) and a grading was performed.

Grading of uroplakin III

The uroplakin III labeling was divided into 4 grades based on previous studies [27]. The grades were divided according to the level of intensity of the labeling. Grade 0 corresponds to strong expression of uroplakin III. The labeling is intense, thick and covers the entire surface of the superficial cells. Grade 1 corresponds to thin labeling and only on the apical part of the superficial cells. Grade 3 corresponds to a weak marking, the marking is discontinuous, and not very intense. Grade 4 is an absence of uroplakin III expression (see Figure 3). Grades 0 and 1 correspond to a functional urothelium and Grades 2 and 3 to a urothelium with low uroplakin expression favoring a decrease in urothelial permeability. The entire urothelium was analyzed for each rat. The grading was performed on the whole urothelium, which gives a percentage of each grade for an individual.

Statistical analysis

For the vascular lesions, statistical analyses were achieved using SigmaPlot v11 (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany). Two-group comparisons were performed with t-tests, while two-way ANOVAs followed by Bonferroni t-tests were used for multiple group comparison. Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). A value of $p \leq 0.05$ is considered to be statistically significant. In the Figures, asterisks correspond to $p<0.001$ (***), $p<0.01$ (**) and $p<0.05$ (*).

Results

Irradiation induces an increase in hematuria from 40 Gy upwards as early as 100 days post-radiation

Hematuria is the main symptom used to measure the evolution of CRC. The criterion of the appearance of hematuria was used to evaluate the kinetics of the evolution of the chronic phase of CRC as a function of the radiation dose. Whole bladder irradiation in a dose range of 20 to 80 Gy (20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80 Gy) was used to determine the optimal dose to induce hematuria.

In order to model the bivariate dynamics (in dose and post-irradiation time) of the evolution of CRC, a flexible non-linear regression via spline functions was conducted (REFUND package of the R software). The result of this modeling is represented in Figure 2A as a three-dimensional surface (and its 2D projection as a heat map). On the x-axis is the irradiation dose, on the y-axis the post-irradiation time, and the cumulative dose of erythrocytes per microliter (noted ery/µl) of urine in vertical dimension. In our model, at a dose of 20 Gy, hematuria appears late, beyond 200 days (6 months) after irradiation. At 40 Gy, hematuria appears as early as 100 days post-irradiation (100 ery/µl), indicated by the white arrows. This flexible bivariate modeling thus revealed a significant association between the irradiation dose and the extent of hematuria ($p<0.001$). For doses of 60 to 80 Gy, hematuria also began at 100

230 days post-irradiation and increased up to 300 days post-irradiation (up to 200 ery/µl). Doses
231 above 40 Gy are too deleterious (weight loss, rat grimace scale) to allow long-term follow-up
232 of the rats. Thus, the results of the data modeling described above suggest quite clearly the 40
233 Gy dose for this study, as it induces early hematuria without impacting survival beyond 10
234 months.

235

236 **Reduction of vascular lesions after MSC treatment**

237

238 Cystoscopy is used to describe lesions such as telangiectasias, ulcers, papillae and
239 cancerous lesions in patients. It enables discrimination from other etiologies of hematuria, such
240 as renal lesions, primarily. We used cystoscopy in our study model to objectify vascular lesions,
241 to record the number and severity of vascular lesions and to detect any abnormalities (papilla,
242 ulcer).

243 In Figure 2B, images of cystoscopies (with lesions circled with a black dotted line) at 6
244 and 12 months are shown, and in Figures 2C and D, the number of vascular lesions is shown as
245 a function of the importance of the lesions and the treatment conditions. On the ordinate, the
246 number of vascular lesions is given, and on the abscissa, the different groups as well as the total
247 lesions. A statistical test (ANOVA) was carried out on all the data.

248 Figure 2C, at 6 months post-irradiation, an absence of vascular lesions was observed for
249 unirradiated and untreated rats. For unirradiated and treated rats, 2 ± 1.1 lesions (Figure 2C)
250 were observed on average. For untreated irradiated rats, the animals had an average of 4 ± 4.7
251 lesions. For irradiated and treated rats, on average 5.7 ± 2.9 lesions were observed.

252 At 12 months post-irradiation, we can observe for unirradiated untreated rats an average
253 of 0.7 ± 0.4 lesions (Figures 2B and D). For unirradiated untreated rats, no vascular lesions are
254 observed. For the irradiated untreated rats, the animals have an average of 4.3 ± 2.4 lesions. For
255 irradiated and treated rats, an average of 1.3 ± 0.4 lesions is observed.

256 In conclusion, at 12 months post-irradiation, treatment with MSCs appears to reduce
257 vascular lesions.

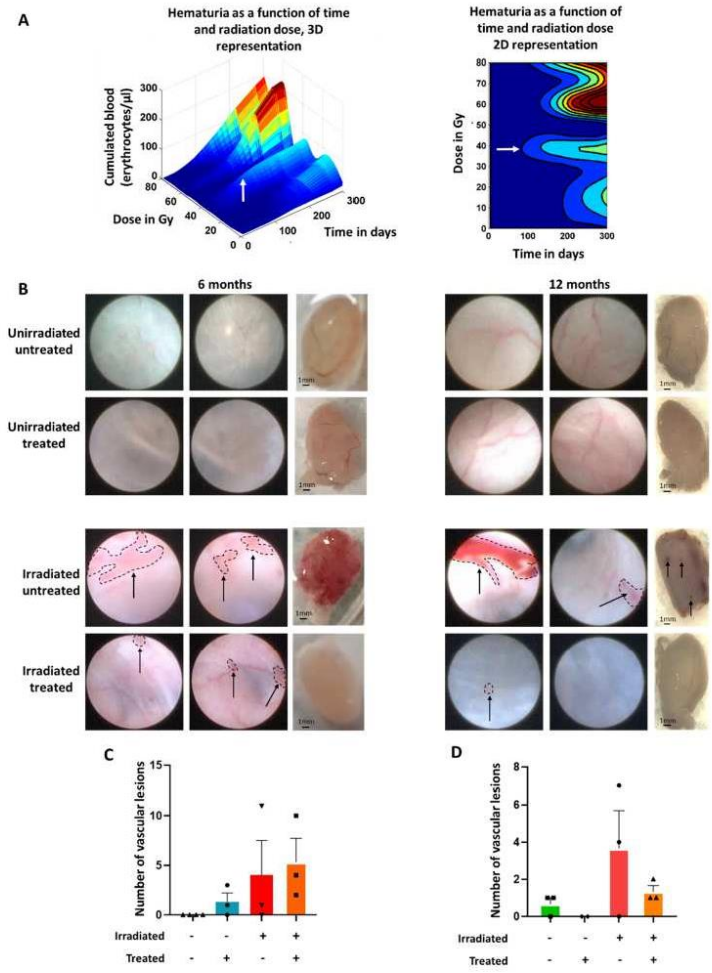


Figure 2: Analysis of hematuria and vascular lesions. **A:** 3D and 2D representations of hematuria accumulation as a function of post-irradiation time and radiation dose. The white arrow indicates the dose threshold of hematuria onset within 100 days (n=5). **B:** Cystoscopic studies of vascular lesions at 6 and 12 months post-irradiation. On the left are shown the rats 6 months post-irradiation and on the right the rats 12 months post-irradiation. Black arrows indicate vascular lesions, and the dotted lines indicate the outline of the vascular lesions **C:** Detail of vascular lesions according to the groups at 6 months post-irradiation (n=3). **D:** Detail of vascular lesions according to the groups at 12 months post-irradiation (n=3). A statistical test (ANOVA) was performed.

MSCs have a protective effect on the impermeability of the urothelium

MSC treatment restores the structure and functionality of the epithelia after irradiation at the intestinal level [24]. In our study model we evaluated whether MSC treatment protects the urothelium from irradiation. The function of the uroplakin complex is to ensure the impermeability of the urothelium. A decrease in uroplakin expression is directly related to a loss of urothelial permeability [28]. Uroplakin III labeling was performed by visible immunohistochemistry. A grading system for uroplakin III expression was set up and measured on the whole urothelium of each animal, as described in the Methods and Materials section. Grade 0 indicates a high level of uroplakin, while Grade 4 indicates no uroplakin (Figure 3A). The lower grades therefore indicate a urothelium that has retained a normal level of uroplakin III while the higher grades indicate a degraded urothelium. Thus, for each animal the percentage of urothelium in Grades 0 to 3 was quantified.

A rigorous statistical analysis of the differences in grade percentages cannot therefore be based on standard analysis tools (ANOVA, t-tests, etc.) due to the very strong constraints of the input data: the percentages of Grades 0 to 3 for each animal are not only data between 0 and 1 but have the additional condition of having a sum equal to 1. In order to take this data format into account, a compositional analysis [29] was conducted, which first consisted in transforming the percentage vectors into unconstrained data in order to deploy the classical analysis tools. Due to the presence of zero percentages, a spherical transformation [30] was used.

Figure 3B is a kinetic study of the evolution of the grades comparing 12 months to 8 months for each condition (e.g. 8 months non-irradiated rats compared 12 months non-irradiated rats). Figure 3C shows the difference in uroplakin III expression grades at 12 months for irradiated untreated rats compared to unirradiated rats (figure 3 left) and for irradiated untreated rats compared to irradiated treated rats (figure 3 right).

When comparing the unirradiated rats at 12 months compared 8 months, there is no change in grades over the course of time (Figure 3B, unirradiated). When comparing the irradiated untreated rats at 12 months compared 8 months a decrease in Grade 1 by 25% (p-value<0.001), an increase in Grade 2 by 10% (p-value=0.031) and Grade 3 by 15% (p-value = 0.001) is observed (Figure 3B, irradiated untreated). In contrast, the analysis revealed no significant changes in uroplakin III grades in irradiated and treated rats over time (Figure 3B,

irradiated treated). In summary, treatment with MSCs inhibited the effects of irradiation over the course of time (no increase in grades).

Comparing irradiated untreated rats with unirradiated rats at 12 months a decrease in Grade 1 of 27.5% (p-value<0.001), an increase in Grade 2 of 14.25% (p-value<0.001) and Grade 3 of 15.5% (p-value = 0.001) is observed (Figure 3C irradiated untreated compared unirradiated). Irradiation therefore induces the loss of uroplakin III expression after irradiation (Figure 3C irradiated untreated compared irradiated treated).

Comparing irradiated untreated rats with irradiated treated rats at 12 months shows, for the treated irradiated rats compared to the irradiated rats, a significant decrease in Grade 1 of 13.5% (p-value = 0.041), and an increase close to significance in Grades 2 and 3 is observed for the untreated rats (8%, p-value = 0.067 and 7.5% p-value = 0.082 respectively). Treatment with MSCs thus appears to limit the loss of uroplakin III expression after irradiation.

In conclusion, irradiation increases the loss of uroplakin III expression (Grade 2 and 3). In contrast, MSC treatment limits the loss of uroplakin III expression (Grades 2 and 3) induced by irradiation. MSCs therefore appear to have a protective effect on uroplakin III expression by maintaining its expression over time in treated irradiated rats compared to untreated irradiated rats. These results suggest a protective effect of MSCs on the maintenance of uroplakin III expression and thus a maintenance of urothelial impermeability.

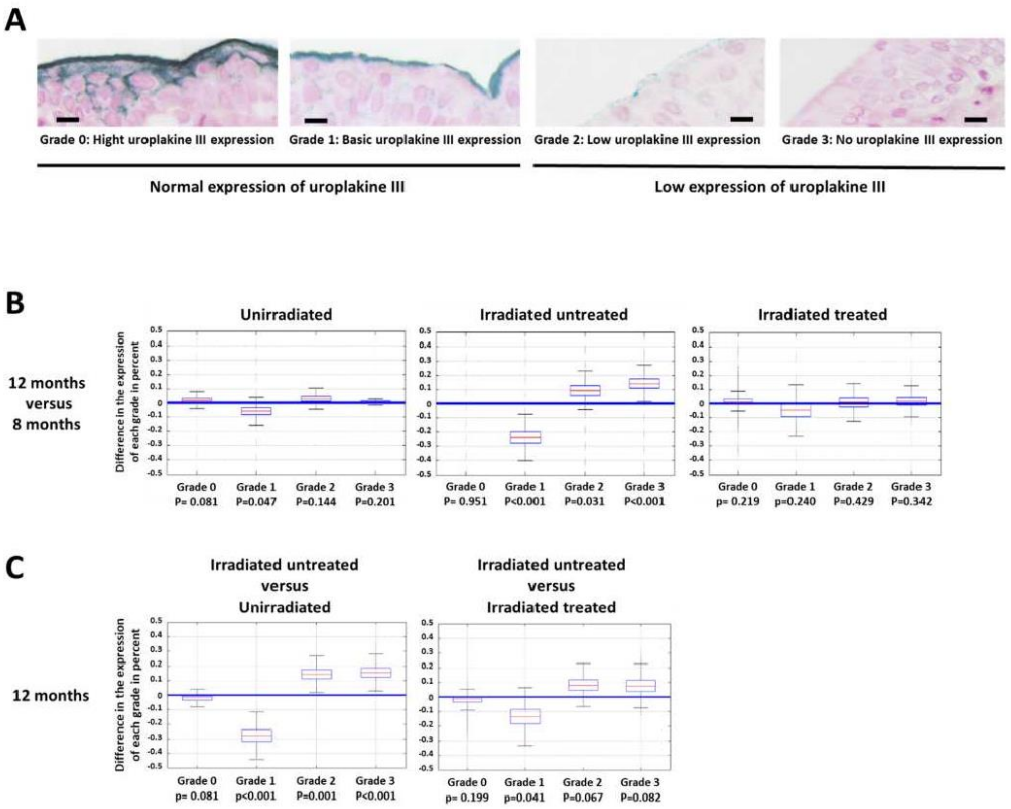


Figure 3: Evolution of uroplakin III grades as a function of time (at 8 and 12 months) and groups (non-irradiated, irradiated untreated and irradiated treated). Uroplakin grading was performed on the entire bladder of each rat. Each grade is expressed as a percentage with a total of 100% (combination of grades 0, 1, 2 and 3). **A:** Representation of the different grades of uroplakin III expression. The black bar represents 10 µm. **B:** Time-dependent variation of uroplakin III grade expression (n=10). **C:** Variation in uroplakin III grade expression between groups (n=10). The Boxplots represent the estimates of the grade probabilities with their associated uncertainties

MSCs allow a reduction in irradiation-induced hyperplasia

Hyperplasia is deleterious in the long term as it permanently reduces permeability and can induce lesions such as metaplasia or pre-cancerous lesions [31]. The aim of the hyperplasia analysis is to assess whether MSC treatment protects the functional integrity of the urothelium as well as preventing regeneration abnormalities. The length of the urothelium with hyperplasia was measured and related to the total size of the urothelium which represents a percentage of the length of the urothelium with hyperplasia, as previously defined [32]. Figure 4A shows representative pictures of the hyperplasia (H) visible on the HES sections. For unirradiated rats (treated or untreated, Figure 4A, to the left), no hyperplasia was noted in the urothelium (U). In contrast, rats irradiated from 8 months of age showed strong hyperplasia (H) which increased at 12 months (Figure 4A, irradiated untreated, on the right). When the rats are treated with MSCs, the hyperplasia is more limited and restricted to limited areas (Figure 4A, irradiated treated, on the right).

As with the uroplakin III grading analyses, compositional analysis based on spherical transformation allows the effect of MSC treatment on urothelial hyperplasia to be assessed (Figure 4B) as a function of time after irradiation. It appears that treatment with MSCs limits hyperplasia over time compared to the untreated irradiated group. Only the 12-month data are significant and show that the untreated irradiated rats have 16% more urothelium with hyperplasia compared to the MSC-treated irradiated rats (p-value = 0.024)

In conclusion, MSCs induce a slight transient hyperplasia at 6 months post-irradiation (not significant) which may be associated with early regeneration of the urothelium. At longer times (8 and 12 months), the group of irradiated rats showed a strong hyperplasia which the MSC treatment seemed to have regulated. These results therefore suggest that MSC treatment reduces the intensity of hyperplasia during the course of CRC.

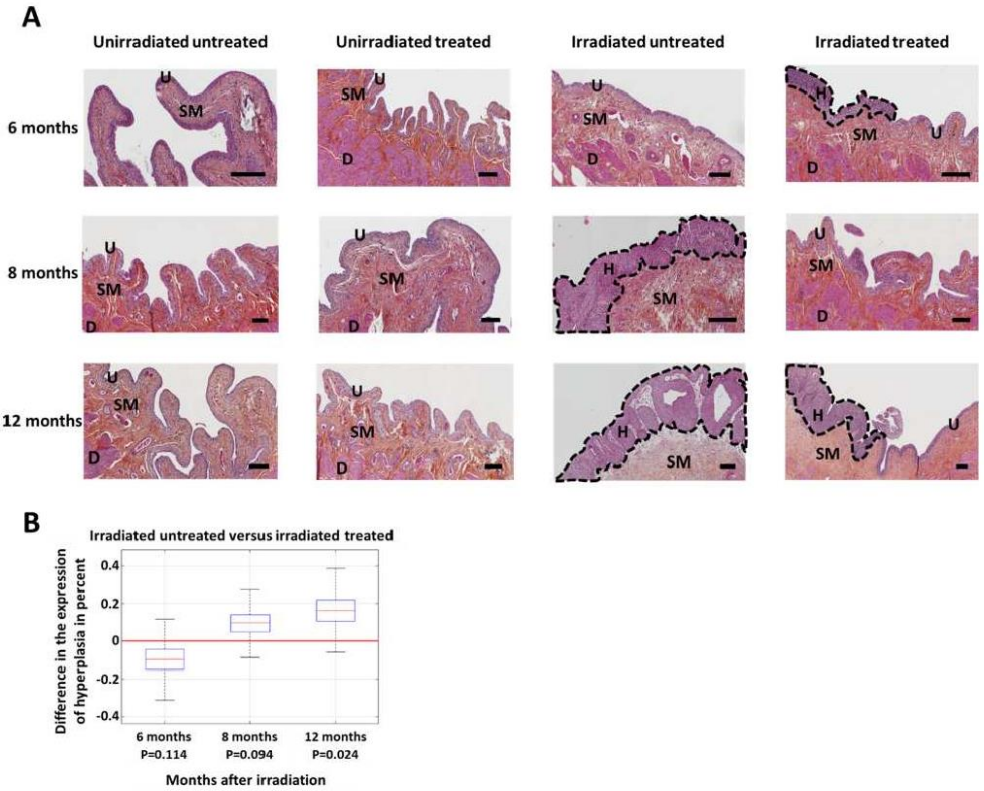


Figure 4: Study of hyperplasia as a function of time and groups. **A:** Representative photo of hyperplasia as a function of time and groups. The black bar represents 100µm. U = Urothelium, SM = SubMucosa, D = Detrusor, H = Hyperplasia (hyperplasias are outlined by the black dotted line). **B:** Difference in the probability of hyperplasia between the group of untreated and treated irradiated rats after irradiation (n=10). The Boxplots represent the estimates of the grade percentages with their uncertainties.

Discussion

The aim of this study was to find out whether MSCs are a therapeutic alternative for limiting the progression of CRC. First, it was necessary to set up a rat model of radiation cystitis. The treatment was then carried out under optimal conditions according to previous studies [24,

33-37]) to study whether the systemic injection of MSCs from adipose tissue can limit the progression of radiation cystitis in the chronic phase. As hematuria is the hallmark of CRC progression, this parameter was chosen to set up the model of CRC. Then, in order to evaluate the effect of MSC treatment, the two compartments responsible for the chronic evolution of radiation cystitis were targeted for the continuation of this study; namely the vascular compartment and the urothelium [38].

For preclinical models of radiation cystitis, there are several irradiation configurations. In the majority of previous studies, exposure of the abdominal area resulted in exposure to irradiation of other organs. These irradiated organs could interact with the bladder [39]. Recent studies using the SARRP platform have allowed irradiation of the bladder only [25, 40, 41]. Based on these recent studies, in order to induce chronic radiation cystitis, a single dose irradiation of the entire bladder was performed using SARRP, with the female Sprague-Dawley rat as an animal model. The use of rats for our study instead of mice is justified by the use of rat MSCs, whose characteristics are closer to human MSCs than to mouse MSCs [42, 43]. We chose female rats in order not to have the prostate in the irradiation field.

To determine the optimal irradiation dose to induce CRC in our model, a dose range of 20-80 Gy was performed. The kinetics of the evolution of hematuria allowed us to determine that its intensity is proportional to the dose received at the bladder, with a threshold at the dose of 40 Gy. The 40 Gy dose has the advantage of inducing vascular lesions without causing deleterious lesions for the animal, unlike higher doses. This dose is consistent with the literature where it is described to induce CRC [25, 40, 41, 44, 45], justifying the 40 Gy dose for the MSC study.

The aim is to evaluate whether MSC treatment limits the progression of radiation cystitis in its chronic phase. Our previous studies have shown that intravenous MSC treatment is optimal with three intravenous injections of 5 million MSCs from adipose tissue [33] at 2-week intervals. This protocol significantly reduced colorectal lesions after irradiation [24, 33-37]. It reduces fibronecrosis and edema if the injection is carried out during the initial fibrous phase. [34]. Based on our previous studies, we studied the role of 3 intravenous injections of MSCs during the phase preceding the chronic phase of cystitis in order to potentiate the effect of MSCs.

Cystoscopy showed that MSC treatment is in favour of reduction of vascular damage 12 months after irradiation to the same level as the non-irradiated control. MSC treatment thus

seems to induce a reduction of vascular lesions in the long term. These results are in agreement with preclinical studies on other types of cystitis, which show that MSC treatment induces neovascularization which may participate in the reduction of hematuria [16, 18]. Clinical trials in HC patients confirm the role of MSCs on vasculature, as they decrease or stop long-term hematuria in patients, thus highlighting the effectiveness of MSCs on the vascular compartment [2-4].

The loss of impermeability of the urothelium, due to defective repair, no longer allows protection of the underlying tissues. This mechanism could be at the origin of the chronic phase of radiation cystitis [14]. At the intestinal level, intravenous injection of MSCs induces proliferation of endogenous progenitor cells of the intestinal crypts allowing colonic epithelial regeneration after irradiation [24, 37, 46-48]. Based on the literature results showing that MSC treatment accelerates epithelial regeneration after irradiation, we investigated whether MSC treatment would enable urothelial regeneration after irradiation.

An increase in the number of hyperplasias was observed in irradiated rats over time, confirming previous studies [19, 25, 45]. Treatment with MSCs induces a slight transient increase in hyperplasia which may be due to regeneration at 6 months after irradiation in the initial phase of CRC [24]. These results suggest that MSCs induce an action as early as 6 months post-irradiation. In the long term, the effect of MSC treatment is a decrease in hyperplasia. Our results are in agreement with previous studies which show that during IC, MSC treatment induces a complete regeneration of the urothelium with a decrease in edema, denudation and regeneration of the lamina propria and the basement membrane [1, 22]. By protecting the urothelium, MSCs could therefore play a major role in limiting the progression of CRC.

The superficial layer of the urothelium is composed of superficial cells which are also called umbrella cells. These have a membrane composed of uroplakins which ensure the impermeability of the bladder. Preclinical studies show, during CRC, lesions of the urothelium in relation to a decrease in the expression of uroplakin III. The consequence is a loss of bladder tightness and impermeability [19, 20, 25]. In our model, treatment with MSCs maintains the level of uroplakin III expression over time from 8 months after irradiation. These results are in agreement with studies on acute interstitial cystitis, where MSC treatment increased uroplakin III expression [22, 23].

Conclusions:

In conclusion, our results support the protective action of MSCs in reducing vascular damage, hyperplasia and restoring permeability of the urothelium.

Abbreviations:

CRC	Chronic radiation cystitis
MSC	Mesenchymal stem cell
Gy	Gray
PFA	Paraformaldehyde
H&E	Hematoxylin eosin
SARRP	Small animal radiation research platform
FBS	Fetal bovine serum
PBS	Phosphate Buffered Saline

Declaration

Ethical approval: The use of animals has been approved by an ethics committee [CEEA Number 81 (Protocol numbers: P09–10), (APAFiS: #12922-201801051531419 v1, #17561-201801051531419 v2 (*projet* P17-09) and #20993-201906071027312 v2 (*projet* P19-09)].

Informed consent for publication: Not applicable.

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

Funding: Funding for this study was provided in full by the French Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety.

Authors' contributions: C.B. and A.C., conception of the study, manuscript writing, and final approval of the manuscript; C.B., study design, data collection, data analysis, interpretation of the data, and animal assistance; A-L.P. and A-C.L., data collection, data analysis; M.D-S., SARRP irradiations; M.B., statistical processing; C.D., V.B., technical support; J-M.S., M.B.,

F.M. and C.B., manuscript revision and final approval of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript

Acknowledgements: .The authors thank the Support Group to Animal Testing (GSEA, Groupe de Soutien à l'Experimentation Animale) of the IRSN for their excellent technical assistance. We would like to express our special appreciation and thanks to Choffel de Witte Ilma and company Caupenne & Co for proofreading and grammatical correction.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

1. Song, M.; J. Lim; H.Y. Yu; J. Park; J.Y. Chun; J. Jeong; J. Heo; H. Kang; Y. Kim; Y.M. Cho, et al., Mesenchymal Stem Cell Therapy Alleviates Interstitial Cystitis by Activating Wnt Signaling Pathway. *Stem Cells Dev*, **2015**. 24(14): p. 1648-57 DOI: 10.1089/scd.2014.0459.
2. Voswinkel, J.; S. Francois; J.M. Simon; M. Benderitter; N.C. Gorin; M. Mohty; L. Fouillard, and A. Chapel, Use of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic inflammatory fistulizing and fibrotic diseases: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*, **2013**. 45(2): p. 180-92 DOI: 10.1007/s12016-012-8347-6.
3. Aronsson-Kurttila, W.; A. Baygan; G. Moretti; M. Remberger; B. Khoein; G. Moll; B. Sadeghi, and O. Ringden, Placenta-Derived Decidua Stromal Cells for Hemorrhagic Cystitis after Stem Cell Transplantation. *Acta Haematol*, **2018**. 139(2): p. 106-114 DOI: 10.1159/000485735.
4. Ringden, O.; M. Uzunel; B. Sundberg; L. Lonnies; S. Nava; J. Gustafsson; L. Henningsohn, and K. Le Blanc, Tissue repair using allogeneic mesenchymal stem cells for hemorrhagic cystitis, pneumomediastinum and perforated colon. *Leukemia*, **2007**. 21(11): p. 2271-6 DOI: 10.1038/sj.leu.2404833.
5. Brossard, C.; A.-C. Lefranc; A.-L. Pouliet; J.-M. Simon; M. Benderitter; F. Milliat, and A. Chapel, Molecular mechanisms and key processes of cystitis *Biology*, **Submit 2022**.
6. Hanno, P.M., Interstitial cystitis-epidemiology, diagnostic criteria, clinical markers. *Rev Urol*, **2002**. 4 Suppl 1: p. S3-8.
7. Jones, C.A. and L. Nyberg, Epidemiology of interstitial cystitis. *Urology*, **1997**. 49(5A Suppl): p. 2-9 DOI: 10.1016/s0090-4295(99)80327-6.
8. Payne, H.; A. Adamson; A. Bahl; J. Borwell; D. Dodds; C. Heath; R. Huddart; R. McMenemin; P. Patel; J.L. Peters, et al., Chemical- and radiation-induced haemorrhagic cystitis: current treatments and challenges. *BJU Int*, **2013**. 112(7): p. 885-97 DOI: 10.1111/bju.12291.
9. deVries, C.R. and F.S. Freiha, Hemorrhagic cystitis: a review. *J Urol*, **1990**. 143(1): p. 1-9 DOI: 10.1016/s0022-5347(17)39848-8.
10. Brugieres, L.; O. Hartmann; J.P. Travagli; E. Benhamou; J.L. Pico; D. Valteau; C. Kalifa; C. Patte; F. Flamant, and J. Lemerle, Hemorrhagic cystitis following high-dose chemotherapy and bone marrow transplantation in children with malignancies: incidence, clinical course, and outcome. *J Clin Oncol*, **1989**. 7(2): p. 194-9 DOI: 10.1200/JCO.1989.7.2.194.
11. Atkinson, K.; J. Biggs; G. Noble; M. Ashby; A. Concannon, and A. Dodds, Preparative regimens for marrow transplantation containing busulphan are associated with haemorrhagic cystitis and hepatic veno-occlusive disease but a short duration of leucopenia and little oro-pharyngeal mucositis. *Bone Marrow Transplant*, **1987**. 2(4): p. 385-94.
12. Crew, J.P.; C.R. Jephcott, and J.M. Reynard, Radiation-induced haemorrhagic cystitis. *Eur Urol*, **2001**. 40(2): p. 111-23 DOI: 10.1159/000049760.

13. Rigaud, J.; J.F. Hetet, and O. Bouchot, [Management of radiation cystitis]. *Prog Urol*, **2004**. 14(4): p. 568-72.
14. Brossard, C.; A.-C. Lefranc; J.-M. Simon; M. Benderitter; F. Milliat, and A. Chapel, Understanding Molecular Mechanisms and Identifying Key Processes in Chronic Radiation Cystitis. *Int J Mol Sci*, **2022**. 23(3): p. 1836.
15. Stewart, F.A.; J. Denekamp, and D.G. Hirst, Proliferation kinetics of the mouse bladder after irradiation. *Cell Tissue Kinet*, **1980**. 13(1): p. 75-89 DOI: 10.1111/j.1365-2184.1980.tb00451.x.
16. Gu, W.; X. Hong; C. Potter; A. Qu, and Q. Xu, Mesenchymal stem cells and vascular regeneration. *Microcirculation*, **2017**. 24(1) DOI: 10.1111/micc.12324.
17. Chen, Y.T.; H.J. Chiang; C.H. Chen; P.H. Sung; F.Y. Lee; T.H. Tsai; C.L. Chang; H.H. Chen; C.K. Sun; S. Leu, et al., Melatonin treatment further improves adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for acute interstitial cystitis in rat. *J Pineal Res*, **2014**. 57(3): p. 248-61 DOI: 10.1111/jpi.12164.
18. Huang, N.F. and S. Li, Mesenchymal stem cells for vascular regeneration. *Regen Med*, **2008**. 3(6): p. 877-92 DOI: 10.2217/17460751.3.6.877.
19. Jaal, J. and W. Dorr, Radiation-induced damage to mouse urothelial barrier. *Radiother Oncol*, **2006**. 80(2): p. 250-6 DOI: 10.1016/j.radonc.2006.07.015.
20. Zwaans, B.M.M.; A.L. Carabulea; S.N. Bartolone; E.P. Ward; M.B. Chancellor, and L.E. Lamb, Voiding defects in acute radiation cystitis driven by urothelial barrier defect through loss of E-cadherin, ZO-1 and Uroplakin III. *Sci Rep*, **2021**. 11(1): p. 19277 DOI: 10.1038/s41598-021-98303-2.
21. Xiao, Y.; Y.J. Song; B. Song; C.B. Huang; Q. Ling, and X. Yu, TGF-beta/MAPK signaling mediates the effects of bone marrow mesenchymal stem cells on urinary control and interstitial cystitis after urinary bladder transplantation. *Am J Transl Res*, **2017**. 9(3): p. 1193-1202.
22. Kim, B.S.; S.Y. Chun; E.H. Lee; J.W. Chung; J.N. Lee; Y.S. Ha; J.Y. Choi; P.H. Song; T.G. Kwon; M.H. Han, et al., Efficacy of combination therapy with pentosan polysulfate sodium and adipose tissue-derived stem cells for the management of interstitial cystitis in a rat model. *Stem Cell Res*, **2020**. 45: p. 101801 DOI: 10.1016/j.scr.2020.101801.
23. Chung, J.W.; S.Y. Chun; E.H. Lee; Y.S. Ha; J.N. Lee; P.H. Song; E.S. Yoo; T.G. Kwon; S.K. Chung, and B.S. Kim, Verification of mesenchymal stem cell injection therapy for interstitial cystitis in a rat model. *PLoS One*, **2019**. 14(12): p. e0226390 DOI: 10.1371/journal.pone.0226390.
24. Semont, A.; C. Demarquay; R. Bessout; C. Durand; M. Benderitter, and N. Mathieu, Mesenchymal stem cell therapy stimulates endogenous host progenitor cells to improve colonic epithelial regeneration. *PLoS One*, **2013**. 8(7): p. e70170 DOI: 10.1371/journal.pone.0070170.
25. Zwaans, B.; S. Krueger; S.N. Bartolone; M.B. Chancellor; B. Marples, and L.E. Lamb, Modeling of chronic radiation-induced cystitis in mice. *Adv Radiat Oncol*, **2016**. 1(4): p. 333-343 DOI: 10.1016/j.adro.2016.07.004.
26. Bessout, R.; C. Demarquay; L. Moussa; A. Rene; B. Doix; M. Benderitter; A. Semont, and N. Mathieu, TH17 predominant T-cell responses in radiation-induced bowel disease are modulated by treatment with adipose-derived mesenchymal stromal cells. *J Pathol*, **2015**. 237(4): p. 435-46 DOI: 10.1002/path.4590.
27. Matsumoto, K.; A. Irie; T. Satoh; J. Ishii; K. Iwabuchi; M. Iwamura; S. Egawa, and S. Baba, Expression of S100A2 and S100A4 predicts for disease progression and patient survival in bladder cancer. *Urology*, **2007**. 70(3): p. 602-7 DOI: 10.1016/j.urology.2007.04.007.
28. Hu, P.; S. Meyers; F.X. Liang; F.M. Deng; B. Kachar; M.L. Zeidel, and T.T. Sun, Role of membrane proteins in permeability barrier function: uroplakin ablation elevates urothelial permeability. *Am J Physiol Renal Physiol*, **2002**. 283(6): p. F1200-7 DOI: 10.1152/ajprenal.00043.2002.
29. Aitchison, J., The Statistical Analysis of Compositional Data. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, **1982**. 44(2): p. 139-177.

30. Wang, H.; Q. Liu; H.M.K. Mok; L. Fu, and W.M. Tse, A hyperspherical transformation forecasting model for compositional data. *European Journal of Operational Research*, **2007**. 179(2): p. 459-468 DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejor.2006.03.039.
31. Visnjar, T.; P. Kocbek, and M.E. Kreft, Hyperplasia as a mechanism for rapid resealing urothelial injuries and maintaining high transepithelial resistance. *Histochem Cell Biol*, **2012**. 137(2): p. 177-86 DOI: 10.1007/s00418-011-0893-0.
32. Iatropoulos, M.J.; A.J. Newman; A.D. Dayan; M. Brughera; G. Scampini, and G. Mazue, Urinary bladder hyperplasia in the rat: Non-specific pathogenetic considerations using a beta-lactam antibiotic. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **1994**. 46(4): p. 265-274 DOI: https://doi.org/10.1016/S0940-2993(11)80098-9.
33. Linard, C.; E. Busson; V. Holler; C. Strup-Perrot; J.V. Lacave-Lapalun; B. Lhomme; M. Prat; P. Devauchelle; J.C. Sabourin; J.M. Simon, et al., Repeated autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell injections improve radiation-induced proctitis in pigs. *Stem Cells Transl Med*, **2013**. 2(11): p. 916-27 DOI: 10.5966/sctm.2013-0030.
34. Usunier, B.; C. Brossard; B. L'Homme; C. Linard; M. Benderitter; F. Milliat, and A. Chapel, HGF and TSG-6 Released by Mesenchymal Stem Cells Attenuate Colon Radiation-Induced Fibrosis. *Int J Mol Sci*, **2021**. 22(4) DOI: 10.3390/ijms22041790.
35. Francois, M.; R. Romieu-Mourez; M. Li, and J. Galipeau, Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther*, **2012**. 20(1): p. 187-95 DOI: 10.1038/mt.2011.189.
36. Francois, S.; M. Mouiseddine; B. Allenet-Lepage; J. Voswinkel; L. Douay; M. Benderitter, and A. Chapel, Human mesenchymal stem cells provide protection against radiation-induced liver injury by antioxidative process, vasculature protection, hepatocyte differentiation, and trophic effects. *Biomed Res Int*, **2013**. 2013: p. 151679 DOI: 10.1155/2013/151679.
37. Francois, S.; B. Usunier; M.E. Forgue-Lafitte; B. L'Homme; M. Benderitter; L. Douay; N.C. Gorin; A.K. Larsen, and A. Chapel, Mesenchymal Stem Cell Administration Attenuates Colon Cancer Progression by Modulating the Immune Component within the Colorectal Tumor Microenvironment. *Stem Cells Transl Med*, **2019**. 8(3): p. 285-300 DOI: 10.1002/sctm.18-0117.
38. Helissey, C.; S. Cavallero; C. Brossard; M. Dusaud; C. Chargari, and S. Francois, Chronic Inflammation and Radiation-Induced Cystitis: Molecular Background and Therapeutic Perspectives. *Cells*, **2020**. 10(1) DOI: 10.3390/cells10010021.
39. Inokuchi, H.; T. Mizowaki; Y. Norihisa; K. Takayama; I. Ikeda; K. Nakamura, and M. Hiraoka, Correlation between urinary dose and delayed radiation cystitis after 78 Gy intensity-modulated radiotherapy for high-risk prostate cancer: A 10-year follow-up study of genitourinary toxicity in clinical practice. *Clin Transl Radiat Oncol*, **2017**. 6: p. 31-36 DOI: 10.1016/j.ctro.2017.09.005.
40. Zwaans, B.M.M.; K.A. Wegner; S.N. Bartolone; C.M. Vezina; M.B. Chancellor, and L.E. Lamb, Radiation cystitis modeling: A comparative study of bladder fibrosis radio-sensitivity in C57BL/6, C3H, and BALB/c mice. *Physiol Rep*, **2020**. 8(4): p. e14377 DOI: 10.14814/phy2.14377.
41. Rajaganapathy, B.R.; J.J. Janicki; P. Levanovich; P. Tyagi; J. Hafron; M.B. Chancellor; S. Krueger, and B. Marples, Intravesical Liposomal Tacrolimus Protects against Radiation Cystitis Induced by 3-Beam Targeted Bladder Radiation. *J Urol*, **2015**. 194(2): p. 578-84 DOI: 10.1016/j.juro.2015.03.108.
42. Johnson, L.D.V.; M.R. Pickard, and W.E.B. Johnson, The Comparative Effects of Mesenchymal Stem Cell Transplantation Therapy for Spinal Cord Injury in Humans and Animal Models: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biology (Basel)*, **2021**. 10(3) DOI: 10.3390/biology10030230.
43. Scuteri, A.; E. Donzelli; D. Foudah; C. Caldara; J. Redondo; G. D'Amico; G. Tredici, and M. Miloso, Mesengenic differentiation: comparison of human and rat bone marrow

mesenchymal stem cells. *Int J Stem Cells*, **2014**. 7(2): p. 127-34 DOI: 10.15283/ijsc.2014.7.2.127.
44. Zwaans, B.M.M.; M. Grobbel; A.L. Carabulea; L.E. Lamb, and S. Roccabianca, Increased extracellular matrix stiffness accompanies compromised bladder function in a murine model of radiation cystitis. *Acta Biomater*, **2022** DOI: 10.1016/j.actbio.2022.03.017.
45. Kohler, M.; H.M. Eppenberger; I. Cordt-Riehle, and C. Michel, Urination frequency and cystic pressure resistance after fractionated whole or partial irradiation of the rabbit urinary bladder. *Acta Oncol*, **1992**. 31(6): p. 673-7 DOI: 10.3109/02841869209083852.
46. Gong, W.; M. Guo; Z. Han; Y. Wang; P. Yang; C. Xu; Q. Wang; L. Du; Q. Li; H. Zhao, et al., Mesenchymal stem cells stimulate intestinal stem cells to repair radiation-induced intestinal injury. *Cell Death Dis*, **2016**. 7(9): p. e2387 DOI: 10.1038/cddis.2016.276.
47. Kudo, K.; Y. Liu; K. Takahashi; K. Tarusawa; M. Osanai; D.L. Hu; I. Kashiwakura; H. Kijima, and A. Nakane, Transplantation of mesenchymal stem cells to prevent radiation-induced intestinal injury in mice. *J Radiat Res*, **2010**. 51(1): p. 73-9 DOI: 10.1269/jrr.09091.
48. Semont, A.; S. Francois; M. Mouiseddine; A. Francois; A. Sache; J. Frick; D. Thierry, and A. Chapel, Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury. *Adv Exp Med Biol*, **2006**. 585: p. 19-30 DOI: 10.1007/978-0-387-34133-0_2.

II Résultats complémentaires

II.1 Informations complémentaires sur les conditions expérimentales

II.1.1 Résumé des groupes et des expériences

Le tableau 11 résume l'ensemble des conditions expérimentales, le nombre d'animaux utilisés par condition et les résultats analysés en fonction des conditions. Le tableau est divisé par condition expérimentale. Chaque condition expérimentale est divisée en fonction de la dose d'irradiation reçue. Seule l'expérimentation du traitement par les CSM est divisée en 4 groupes en fonction de s'ils ont été irradiés et/ou traités. Puis, chaque condition expérimentale est subdivisée par temps d'analyse et le nombre d'animaux est indiqué pour chaque temps. Les différentes études réalisées sont réparties en fonction des techniques et regroupées par méthodes (transcriptomique, histologique et immunohistologie). Les études réalisées en fonction des groupes sont indiquées par un X.

Tableau 11 : Récapitulatif des conditions, du nombre d'animaux et des expériences réalisées

	Type de l'étude	**Effet dose 20 à 40 Gy**											
	Dose irradiation	**0 Gy**			**20 Gy**			**30 Gy**			**40 Gy**		
	Temps	**3 mois**	**4 mois**	**6 mois**	**3 mois**	**4 mois**	**6 mois**	**3 mois**	**4 mois**	**6 mois**	**3 mois**	**4 mois**	**6 mois**
	Nombre animaux	N=5	N=5	N=5	N=5	N=5	N=5	N=5	N=5	N=5	N=5	N=5	N=5
Hématurie et lésions vasculaires	Bandelette urinaire (1 fois/mois)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Cystoscopie												
Etude transcriptomique	Inflammation	X	X	X							X	X	X
	Régénération	X	X	X							X	X	X
	Fibrose	X	X	X							X	X	X
	Remodelage de la MEC	X	X	X							X	X	X
Histologie	Hyperplasie (HES)			X									X
	Fibrose (Rouge Sirius)												X
	Mastocytes (Bleu de toluidine)												
Immunohistologie	Uroplakine III			X									X

	Type de l'étude	**Effet dose 50- 80 Gy**									
	Dose irradiation	**0 Gy**		**50 Gy**		**60 Gy**		**70 Gy**		**80 Gy**	
	Temps	**6 mois**	**10 mois**	**6 mois**	**10 mois**	**6 mois**	**10 mois**	**6 mois**	**10 mois**	**6 mois**	**10 mois**
	Nombre animaux	N=10	N=10	N=5	N=5	N=5	N=5	N=5	N=5	N=5	N=5
Hématurie et lésions vasculaires	Bandelette urinaire (1 fois/mois)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Cystoscopie										
Etude transcriptomique	Inflammation										
	Régénération										
	Fibrose										
	Remodelage de la MEC										
Histologie	Hyperplasie (HES)										
	Fibrose (Rouge Sirius)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Mastocytes (Bleu de toluidine)										
Immunohistologie	Uroplakine III	X	X								

	Type de l'étude	**Cinétique**									
	Dose irradiation	**0 Gy**					**40 Gy**				
	Temps	**6 mois**	**8 mois**	**10 mois**	**12 mois**	**15 mois**	**6 mois**	**8 mois**	**10 mois**	**12 mois**	**15 mois**
	Nombre animaux	N=10	N=10	N=10	N=10	N=10	N=10	N=10	N=10	N=10	N=10
Hématurie et lésions vasculaires	Bandelette urinaire (1 fois/mois)										
	Cystoscopie										
Etude transcriptomique	Inflammation										
	Régénération										
	Fibrose										
	Remodelage de la MEC										
Histologie	Hyperplasie (HES)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

	Fibrose (Rouge Sirius)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Mastocytes (Bleu de toluidine)				X					X	
Immunohistologie	Uroplakine III	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

	Type de l'étude	**Traitement par les CSM**											
	Conditions	**Non irradiés non traités**			**Non irradiés traités**			**Irradiés non traités**			**Irradiés traités**		
	Temps	**6 mois**	**8 mois**	**12 mois**	**6 mois**	**8 mois**	**12 mois**	**6 mois**	**8 mois**	**12 mois**	**6 mois**	**8 mois**	**12 mois**
	Nombre animaux	N=10	N=10	N=10	N=10	N=10	N=10	N=10	N=10	N=10	N=10	N=10	N=10
Hématurie et lésions vasculaires	Bandelette urinaire (1 fois/mois)			X			X			X			X
	Cystoscopie	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Etude transcriptomique	Inflammation Régénération Fibrose Remodelage de la MEC												
Histologie	Hyperplasie (HES)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Fibrose (Rouge Sirius)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Mastocytes (Bleu de toluidine)			X			X			X			X
Immunohistologie	Uroplakine III	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

II.1.2 Analyses Statistiques

Les analyses statistiques pour les PCR et le comptage des mastocytes ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9. Le test utilisé est un Anova two way suivis d'un test par comparaison multiple.

Les analyses statistiques pour la fibrose ont été réalisées avec un test de Fischer exact.

Les * indique la p-value avec : *P < 0.05, **P< 0.01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001.

II.2 Résultats complémentaires de l'analyse de l'uroplakine III

II.2.1 Marquage de l'uroplakine III

L'uroplakine III a été marquée avec un anticorps spécifique (Abcam, réf : ab78196 ; dilution : 1/500, tampon citrate pH 6, 1X) puis révélées à l'aide du système Horse Radish Peroxidase (HRP) (Zytomed réf : ZUC070-100) et un grading a été réalisé

II.2.2 Grading de l'uroplakine III

Le marquage de l'uroplakine III a été divisé en 4 grades sur la base d'études précédentes (Matsumoto et al. 2007). Les grades ont été divisés selon le niveau d'intensité du marquage. Le grade 0 correspond à une forte expression de l'uroplakine III. Le marquage est intense, épais et couvre toute la surface des cellules superficielles. Le grade 1 correspond à un marquage fin et uniquement sur la partie apicale des cellules superficielles. Le grade 3 correspond à un marquage faible, le marquage est discontinu, et peu intense. Le grade 4

correspond à une absence d'expression de l'uroplakine III. Les grades 0 et 1 correspondent à un urothélium fonctionnel et les grades 2 et 3 à un urothélium avec une faible expression de l'uroplakine favorisant une diminution de l'imperméabilité urothéliale (illustré dans l'article). L'ensemble de l'urothélium a été analysé pour chaque rat. Le classement a été effectué sur l'ensemble de l'urothélium, ce qui donne un pourcentage de chaque grade pour un individu.

II.2.1 Analyse de l'uroplakine III

Les résultats complémentaires (par rapport à l'article) de l'analyse de l'uroplakine III sont montrés ci-dessous. Cette analyse comprend la comparaison des temps 6 et 8 mois en fonction des groupes (figure 29 A) ainsi que la comparaison des groupes irradiés non traités/non irradiés et irradiés non traités/irradiés traités à 6 et 8 mois post-irradiation (928 B).

Pour les rats non irradiés à 8 mois post-irradiations, une diminution du grade 0 de 11% (p-value=0.002) et une augmentation du grade 1 de 11 % (p-value=0.003) est observée comparée à 6 mois post-irradiation (figure 29 A gauche). Pour les rats irradiés non traités (figure 29 centre), une diminution du grade 0 de 5% (p-value=0.005) et une augmentation du grade 2 de 5% (p-value=0.045) sont observées comparées à 6 mois post-irradiation. Pour les rats irradiés traités à 8 mois post-irradiation (figure 29 droite), une diminution du grade 1 de 18% (p-value=0.003), une augmentation du grade 2 de 11% (p-value=0.005) et une augmentation du grade 3 de 7% (p-value<0 .001) comparé à 6 mois post-irradiation (figure 29 A) est observée.

La différence de chaque grade entre le groupe des rats irradiés non traités et les rats irradiés traités a été analysée à 6 et 8 mois post-irradiation, voir figure 29 B.

À 6 mois post-irradiation, une légère augmentation du grade 3 de 2% (p-value=0.004) est observée chez les rats irradiés non traités comparés aux rats non irradiés. À 6 mois post-irradiation, une diminution du grade 1 de 11% (p-value = 0.021), une augmentation du grade 2 de 5% (non significatif ; p-value=0.083) et du grade 3 de 2,5% (p-value=0.003) est observés dans le groupe des rats irradiés non traités comparés aux rats irradiés traités.

À 8 mois post-irradiation, une diminution de 10% du grade 1 (p-value=0.005), une augmentation du grade 2 de 8% (p-value=0.011) et du grade 3 de 2% (p-value=0.056) est observée dans le groupe des rats irradiés non traités comparés aux rats non irradiés. A 8 mois

post-irradiation, une diminution de 5% du grade 3 (p-value=0.035) est observée dans le groupe des irradiés non traités comparés aux rats irradiés traités.

En conclusion, dans le groupe des rats non irradiés l'expression de l'uroplakine III reste stable dans le temps, tandis que pour les rats irradiés non traités l'expression de l'uroplakine III diminue dans le temps et pour les rats irradiés traités l'expression de l'uroplakine diminue entre 6 et 8 mois, puis reste stable entre 8 et 12 mois post-irradiation. De plus, le groupe des rats irradiés non traités présente systématiquement plus de grades 2 et 3 que les rats non irradiés. Les rats irradiés non traités présentent plus de grade 2 et 3 à 6 mois post-irradiation et une nette tendance à 12 mois comparé aux rats irradiés traités.

Après irradiation une diminution de l'uroplakine III est observée avec une accentuation dans le temps. Le traitement par les CSM permet de conserver l'expression de l'uroplakine III après 8 mois post-irradiations.

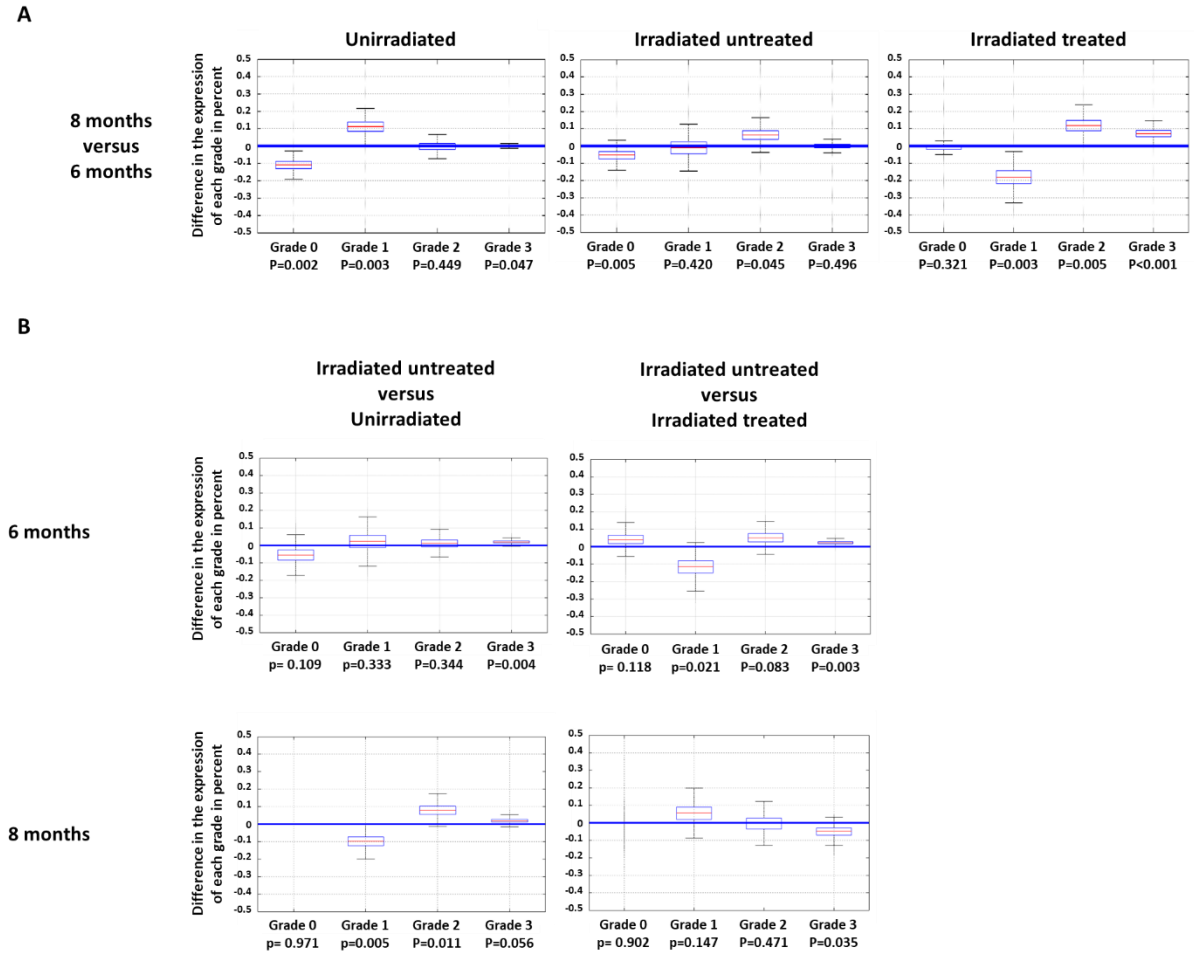


Figure 29 : Évolution des grades d'uroplakine III en fonction du temps (à 6 et 8 mois) et des groupes (non irradiés, irradiés non traités et irradiés traités).

Le grading de l'uroplakine a été effectué sur l'ensemble de la vessie de chaque rat. Chaque grade est exprimé en pourcentage avec un total de 100% (combinaison des grades 0, 1, 2 et 3). **A :** Variation en fonction du temps de l'expression du grade de l'uroplakine III. **B :** Variation de l'expression du grade de l'uroplakine III entre les groupes irradiés non traités et les contrôles non irradiés ainsi qu'entre les groupes irradiés non traités et irradiés traités. Les Boxplots représentent les estimations des probabilités de grade avec leurs incertitudes associées. Nombre d'animaux pour les rats non irradiés à 6 mois N= 45, à 8 mois N= 30. Nombre d'animaux pour les rats irradiés non traités à 6 mois N= 25, à 8 mois N= 20. Nombre d'animaux pour les rats irradiés traités à 6 mois N= 10, à 8 mois N= 10.

II.3 Etudes histologiques

II.3.1 Coloration au Rouge Sirius et Bleu de toluidine

Les tissus conservés en PFA sont incubés 12 heures (fixation) avant d'être traités pour inclusion en paraffine. L'appareil utilisé lors de cette opération est le VIP tissue Tek® qui permet la déshydratation progressive des organes et l'imprégnation de la paraffine nécessaire à l'inclusion. Un deuxième appareil (Sakura Tissue Tek®) est utilisé pour l'inclusion. Des coupes de 5µm sont effectuées à l'aide d'un microtome (Leica RM2155®). Ces coupes ont été soumises à une coloration soit avec du Rouge Sirius afin de marquer les fibres de collagènes, soit avec du bleu de toluidine pour marquer les mastocytes. Les coupes au rouge Sirius ont été réalisées sur les animaux issus de l'effet dose et sur les effets du traitement par les CSM et la cinétique, un comptage des animaux présentant des plaques de fibrose a été réalisé. Sur les coupes en bleu de toluidine, seuls les animaux issus de la procédure 2 (effets du traitement et cinétique) à 12 mois ont été réalisés. Les mastocytes ont été comptés à l'aide du logiciel Histolab (version : 12.1.1°). Le nombre de mastocytes a été rapporté à la surface totale de la vessie (sans prendre en compte l'urothélium qui aurait pu fausser les résultats en raison d'un épaississement anormal) puis normalisé avec les animaux non irradiés non traités.

II.3.2 La fibrose

La fibrose est visualisée grâce à une coloration au rouge Sirius. Cette coloration marque les fibres de collagènes en rouge. Le marquage a été réalisé sur les rats irradiés à 40,

50, 60, 70 et 80 Gy pour les temps 6 et 10 mois post-irradiation ainsi que sur les rats issus de l'étude cinétique et du traitement par les CSM (40 Gy, 6, 8 et 12 mois). Une analyse sur l'intensité du rouge Sirius a été effectuée sans donner de résultats significatifs. Cependant, certains rats présentaient des plaques de fibrose. Le nombre d'animaux présentant des plaques a été compté. Les plaques de fibrose se caractérisent par un envahissement de la MEC dans le détrusor, désorganisant les fibres musculaires (flèche noire, figure 30 A) jusqu'à leur disparition totale dans les cas les plus avancés.

L'étude sur l'effet dose d'irradiation à 6 mois post-irradiation (figure 30 B gauche) montre que 15 % des rats irradiés à 40 Gy (2 rats sur 15) présentaient des plaques de fibrose et 20 % des rats 60 Gy (1 rat sur 5). À 6 mois post-irradiation, les animaux ayant reçu des doses de 50, 70 et 80 Gy ne présentent pas de plaque de fibrose. A 6 mois le nombre d'animaux par groupe présentant des zones de fibrose est faible (< à 20%). De plus, les groupes pour les doses supérieur à 40 Gy ont peu d'animaux (4 à 5 par groupe). Ces deux facteurs expliquent l'absence d'animaux avec des zones de fibrose pour les doses de 50, 70 et 80 Gy.

À 10 mois post-irradiation (figure 30 B droite), les rats irradiés à 40 et 50 Gy présentaient significativement plus de plaque de fibrose avec 20 % (40 Gy, N = 10 et 50 Gy N = 5 ; p-value = 0,05) par rapport aux rats non irradiés non traités. Pour les doses de 60 et 70 Gy, 50% des rats (2 rats sur 4) avaient un nombre de plaques des fibroses significativement plus élevé par rapport aux rats non irradiés non traités (p-value = 0,05). Pour la dose de 80 Gy, 75% des rats (3 rats sur 4) présentaient significativement plus de plaques de fibrose (p-value = 0,01) que les rats non irradiés non traités. En conclusion à 10 mois post-irradiation, une augmentation du nombre d'animaux présentant des plaques de fibroses dose dépendante semble être observée. Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution, car le nombre d'animaux par dose est relativement faible.

Pour l'évaluation du traitement par les CSM (figure 30 C), les rats contrôles non irradiés traités ou non traités ne présentaient jamais de plaque de fibrose. À 6 mois post-irradiation, le nombre de rats irradiés non traités présentant des plaques de fibrose est de 15% (3 rats sur 20), tandis que les rats irradiés traités avaient une fréquence de 12.5% (1 rat sur 8), cependant ces données ne sont pas significatives par rapport aux rats non irradiés non traités. À 8 mois post-irradiation, les rats irradiés non traités présentaient significativement plus de plaque de fibrose que les rats non irradiés non traités avec près d'un tiers (5 rats sur 16 ; p-

value < 0,0001) des animaux qui avaient des plaques de fibrose. Pour les rats irradiés traités, 44% des rats (4 rats sur 9) présentaient des plaques de fibrose avec une p-value < 0,01 par rapport aux rats non irradiés non traités. Cependant, il n'y avait pas de différence statistique entre les rats irradiés non traités et les rats irradiés traités. À 12 mois post-irradiation, les rats irradiés non traités ne présentaient pas de différence statistique avec les rats non irradiés non traités (2 rats sur 15 avec des plaques de fibrose soit 13% environ). Les rats irradiés traités présentaient significativement plus de plaque de fibrose avec les rats contrôles non irradiés non traités avec un taux de 40% (4 rats sur 10 ; p-value <0,01). Cependant, il n'y a pas de différence statistique entre les rats irradiés non traités et les rats irradiés traités (figure 30 B).

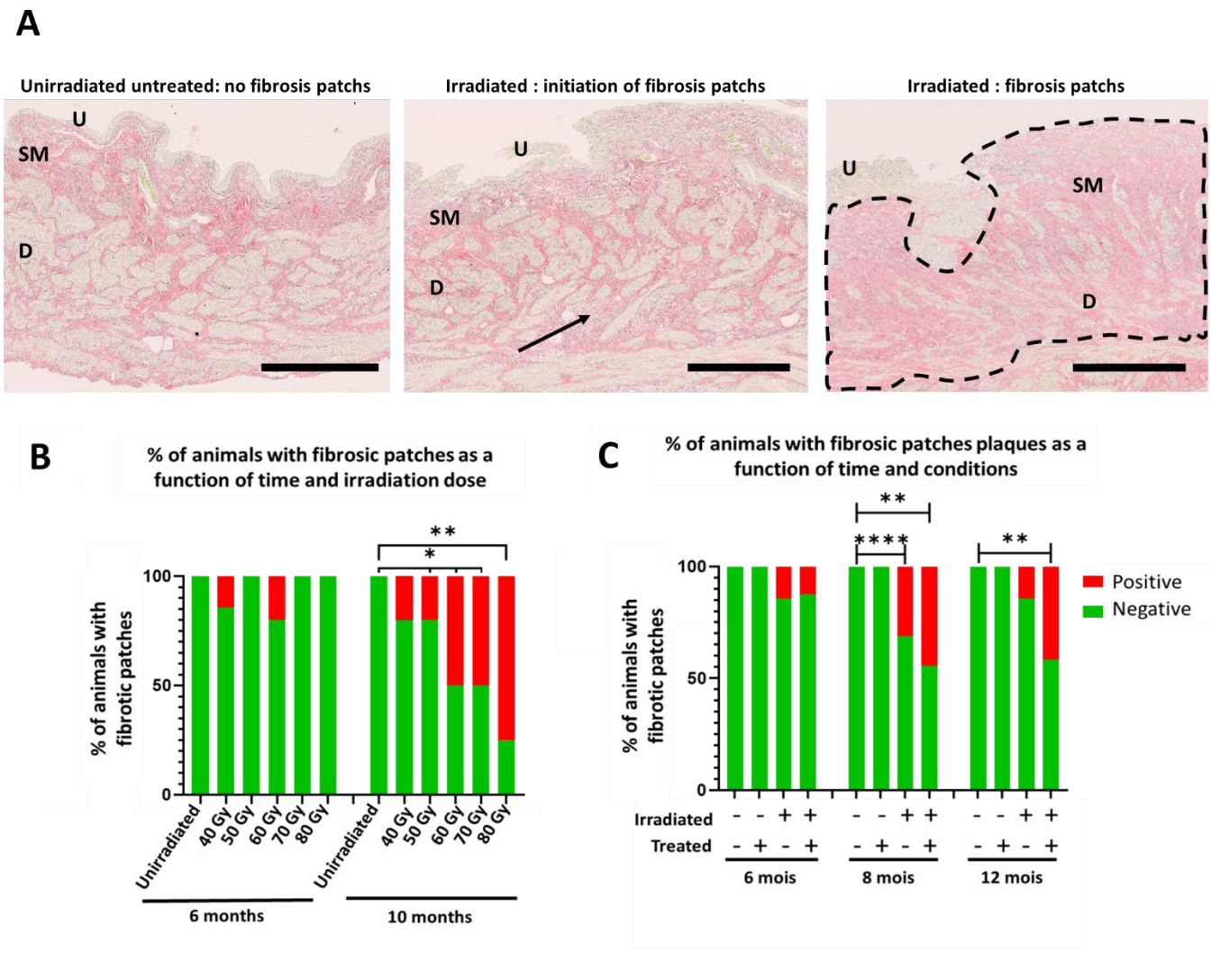


Figure 30 : Analyse des plaques de fibrose en fonction de la dose et du temps post-irradiation **A :** Représentation de coupe histologique avec à gauche un rat non irradié ne présentant pas de plaque de fibrose, au milieu un rat présentant un début de plaque de fibrose et à droite un rat irradié avec une plaque de fibrose. Les plaques de fibrose sont indiquées par les pointillés

noirs. Les flèches noires indiquent une désorganisation du muscle par l'envahissement de la MEC. U= Urothélium ; SM= Sous-muqueuse ; D= Détrusor. **B :** Pourcentage d'animaux présentant des plaques de fibrose en fonctions de la dose d'irradiation (40-80 Gy) et du temps post-irradiation (6 et 10 mois). À 6 mois, pour les rats non irradiés le nombre d'animaux est de 30, pour les animaux 40 Gy le nombre d'animaux est de 15 (les rats issus du traitement par les CSM n'ont pas été pris en compte), pour les doses de 50 à 80 Gy le nombre d'animaux est compris entre 4 et 5. À 10 mois post-irradiation le nombre d'animaux non irradiés est de 20, les rats irradiés pour la dose de 40 Gy est de 10 et les rats pour les doses de 50 à 80 Gy est compris entre 4 et 5 **C :** Pourcentage d'animaux présentant des plaques de fibrose en fonctions du temps et des traitements. À 6 mois le nombre d'animaux pour les rats non irradiés non traité est de 30. Pour les rats non irradiés traités CSM, le nombre de rats est compris entre 7 et 10 pour les temps 6, 8 et 12 mois. Pour les rats irradiés non traités à 6, 8 et 12 mois, le nombre de rats est compris entre 15 et 20. Pour les rats irradiés traités, le nombre de rats est compris entre 8 et 10 pour les temps 6, 8 et 12 mois. Pour les figures C et D, le pourcentage d'animaux présentant des plaques de fibroses est indiqué en rouge, les animaux sans plaque de fibrose en vert.

II.3.3 Analyse du nombre de mastocytes à 12 mois

L'objectif est de déterminer si l'irradiation induit une augmentation du nombre de mastocytes, ces cellules étant décrites comme participant activement à l'inflammation et à la neuroinflammation. Une coloration au bleu de toluidine pour colorer les mastocytes (figure 31 A), suivie d'un comptage à l'aide du logiciel histolab ont été réalisés sur l'ensemble des échantillons à 12 mois post-irradiation pour les rats issus du protocole cinétique et effet du traitement par les CSM. Afin de normaliser nos résultats, le nombre de mastocytes est rapporté à la surface de la coupe (sans prendre en compte l'urothélium, qui pourrait fausser nos résultats en raison de l'hyperplasie). Puis une dernière étape de normalisation a été réalisée en se basant sur le système de fold change. Ce système est défini comme le rapport entre les deux quantités, dans notre cas entre les rats irradiés non traité (référence) et les autres groupes de rats. Le nombre de cellules par unité de surface a été calculé et un ratio entre les rats irradiés non traités et les autres groupes a été réalisé suivi d'un test statistique (Anova).

Pour les rats irradiés non traités, une augmentation du nombre de mastocytes (fold change = 1.5 ; p-value$<0.05 \pm 0.56$) par rapport aux rats non irradiés non traités est observée.

Pour les rats irradiés traités, le nombre de mastocytes semble augmenté, mais n'est pas significatif (fold change 1.52 ± 0.68 ; p-value = 0.32). En conclusion, après irradiation, il y a une augmentation des mastocytes chez les rats irradiés non traités. Il n'y a pas d'effet observable du traitement par les CSM après irradiation par rapport aux rats irradiés non traités. Ce résultat pourrait être dû à une forte hétérogénéité de deux points aux valeurs les plus élevés.

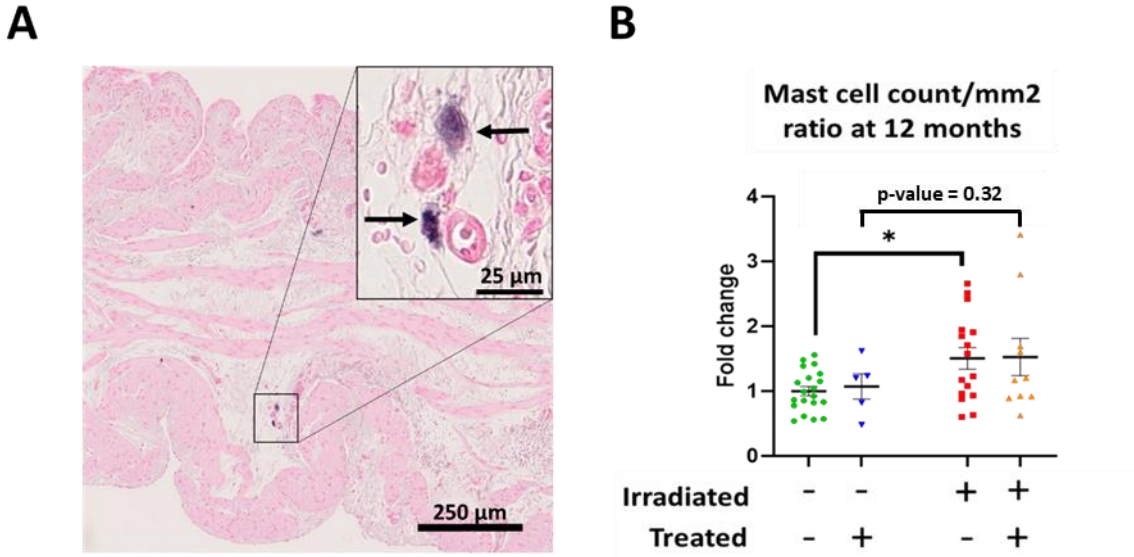


Figure 31 : Ratio du nombre de mastocytes par unité de surface à 12 mois pour la dose de 40 Gy.

A : Image de la coloration en bleu de toluidine. Les mastocytes sont indiqués par les flèches noires. **B :** Fold change du nombre de mastocyte par millimètre carré, normalisé par rapport aux rats non irradiés non traités. Pour les rats non irradiés non traités, N= 20. Pour les rats non irradiés, traités CSM ; N=5. Pour les animaux irradiés non traités, N= 20 et pour les rats irradiés traités N=10

II.4 Étude transcriptomique

II.4.1 Isolement des ARN totaux

Les vessies ont été lysées dans du lysis/Binding buffer et à l'aide du Kit mirVana™ (miRNA Isolation Kit, sans phénol de chez Thermofisher® ; ref : AM1561) en respectant le protocole du fournisseur. La concentration de l'éluat obtenue est mesurée par spectrophotométrie à l'aide du Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific®). Cet appareil

permet la quantification des acides nucléiques sur des volumes limités, à partir de 1µL. La concentration et le rapport de pureté sont calculés automatiquement par les formules suivantes : [ARN] = 40 x DO260 x facteur de dilution, R = DO260 / DO280. Le rapport de pureté doit alors se situer entre 1,7 et 2,1 pour assurer une concentration acceptable de contaminants protéiques.

II.4.2 Transcription inverse

La transcription inverse a été réalisée avec 1 µg d'ARN à l'aide du kit Applied Biosystem (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits ; ref : 4374966). Ce kit permet la conversion de 0,1 à 10 µg d'ARN totaux en ADN. La réaction nécessite l'utilisation de tampon RT, de dNTPs (désoxyribonucléotides), d'oligonucléotides (Random Primers) et de la Multiscribe™ Reverse Transcriptase. Au cours de la réaction, les oligonucléotides s'hybrident aléatoirement aux molécules d'ARN présentes dans l'échantillon à la température d'annealing (25°C pendant 10 minutes), puis la Transcriptase inverse synthétise les brins d'ADN complémentaires à partir des dNTPs (37°C pendant 120 minutes). Après un cycle complet, on considère que la conversion est totale, c'est-à-dire que la quantité d'ARN utilisée (1µg dans notre cas) a été totalement convertie en ADN (environ 1µg d'ADN).

II.4.3 PCR quantitative en temps réel

Après obtention des ADNc, l'expression génique peut être évaluée par PCR en temps réel (suivant les recommandations de Applied Biosystems®). Cette technique utilise la technologie TaqMan™ permettant de déterminer la quantité d'ADN synthétisé par détection de fluorescence. Cette technique repose sur l'utilisation d'une sonde portant un reporter et un quencher, deux fluorophores. Il est conseillé d'utiliser un gène de référence, également appelé gène d'entretien, de ménage, s'exprimant sans mécanisme de régulation et permettant donc de normaliser les résultats et d'écarter les variations d'expression qui ne seraient pas dues au protocole expérimental et risqueraient donc de fausser les résultats. Dans notre protocole le gène de ménage choisi est la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH).

II.4.4 Gènes étudiés

Afin d'évaluer les variations d'expression des gènes impliqués dans le développement de la cystite radique chronique et notamment la mise en place de l'inflammation et de la fibrose, nous avons réalisé des PCR quantitatives sur les vessies prélevées au cours du projet. Toutes les amorces proviennent de chez Life Technologies® (voir tableau 12).

Tableau 12 : Récapitulatif des amorces utilisées pour la qPCR

Catégorie	Nom du gène	Abréviation	Référence
Chimiokine	Chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2	Rn00580555_m1
	Chemokine (C-C motif) ligand 5	CCL5	Rn00579590_m1
Cytokines pro inflammatoires	Interleukine 1 beta	IL1 β	Rn00580432_m1
	Interleukine 6	IL6	Rn01410330_m1
	Tumor Necrosis factor	TNFα	Rn00562055_m1
Hypoxie	Hypoxia-inducible factor 1-alpha	HIF 1α	Rn01472831_m1
Néo vascularisation	Vascular endothelial growth factor alpha	VEGFα	Rn01511602_m1
Régénération épithéliale	Epidermal Growth Factor	EGF	Rn00563336_m1
Fibrose	Small Mothers Against Decapentaplegic homolog 3	SMAD 3	Rn00565331_m1
	Transforming growth factor beta 1	TGFβ1	Rn00572010_m1
Matrice Extra Cellulaire	Collagène de type 1, alpha 2	Col1α2	Rn01526721_m1
	Collagène de type 3, alpha 1	Col3α1	Rn01437681_m1
	Chondroitin sulfate proteoglycan 4	Cspg 4	Rn00578849_m1
Métalloprotéase	Métalloprotéase 2	MMP 2	Rn01538170_m1
	Métalloprotéase 3	MMP 3	Rn00591740_m1
Inhibiteur de métalloprotéase	Tissue Inhibitors of MetalloProteinases 1	TIMP 1	Rn01430873_g1
	Tissue Inhibitors of MetalloProteinases 4	TIMP 4	Rn01459160_m1

II.4.5 Étude transcriptomique sur les gènes liés à l'inflammation, à la régénération et à la fibrose.

L'objectif de l'étude transcriptomique est de pouvoir analyser l'évolution des différents paramètres (inflammation, régénération et fibrose) et ainsi mieux comprendre les mécanismes mis en place dans la CRC. Pour le moment, seuls les temps 3, 4 et 6 mois ont été réalisés sur les rats 40 Gy issus du protocole effets dose. L'efficacité du traitement par les CSM n'a pas encore été évaluée.

À 3 mois, nous avons observé une augmentation de l'expression de CCL2 (2,5 fois plus, p-value<0.05) et de CCl5 (7 fois plus, p-value<0.001). À 6 mois, seul CCl5 est surexprimé (5 fois plus, p-value<0.05), (figure 32). Nous avons également évalué l'inflammation par la mesure de l'expression de gènes de cytokines pro-inflammatoires. À 3 mois, l'expression du gène TNFα est augmentée de 7,5 fois et Il1β de 9,5 fois pour les rats irradiés à 40 Gy comparés au témoin (p-value<0,0001). À 4 et 6 mois pour le TNFα il n'y a pas de différence d'expression des gènes. En revanche, à 6 mois, Il-1β est surexprimé (7 fois plus que les témoins, p-value<0,001) ainsi que l'IL6 (8 fois plus, p-value < 0.01) (figure 32).

Nous avons investigué si l'inflammation est corrélée à une hypoxie tissulaire. Pour cela nous avons étudié l'expression du gène HIF1α (Hypoxia-Inducible Factor-1α) et VEGFα (Vascular Endothelial Growth Factor). VEGFα favorise l'apparition de nouveaux vaisseaux sanguins afin de lutter contre l'hypoxie. Nous avons également mesuré l'EGF (Epithélium Growth Factor), qui favorise la régénération des tissus et en particulier des épithéliums comme l'urothélium. À 3 mois, VEGFα est 6 fois plus exprimé et EGF est 6,5 fois plus exprimé chez les rats irradiés à 40 Gy (p-value<0,01). À 6 mois seul HIF1α est surexprimé (15 fois plus, p-value<0.0001) (figure 32).

Le remodelage de la Matrice extra cellulaire (MEC) a été étudié. À 3 mois, les gènes MMP2 (5,5 fois plus, p-value<0,0001), TIMP1 et 2 (6,5 fois plus, p-value<0,0001), TIMP4 (4,5 fois plus, p-value<0,0001) sont surexprimés. À 4 mois post-irradiation, le gène MMP3 est surexprimé (6 fois plus, p-value<0,0001). À 6 mois seul TIMP4 est surexprimé (4,5 fois plus, p-value<0.001) (figure 32). La fibrose a été étudiée au niveau de l'expression des gènes Cspg 4 (Chondroitin sulfate proteoglycan 4), Col3α1 (collagène 3 alpha 1), Col1α2 (collagène 1 alpha 2). Cette étude a été complétée par la mesure de l'expression des gènes TGFβ 1, SMAD3. À 3 mois les gènes Cspg4 (9 fois plus, p-value<0,001), Col3α1, Col1α2, (7 fois

plus,p-value<0,0001) et TGFβ 1 (7 fois plus, p-value<0.0001) sont surexprimés. Seul SMAD 3 est inhibé à 3 mois (presque plus exprimé, p-value<0.05). Pour l'ensemble de ces gènes (hormis MMP3) Il n'y a pas de différence significative d'expression à 4 et 6 mois (figure 32).

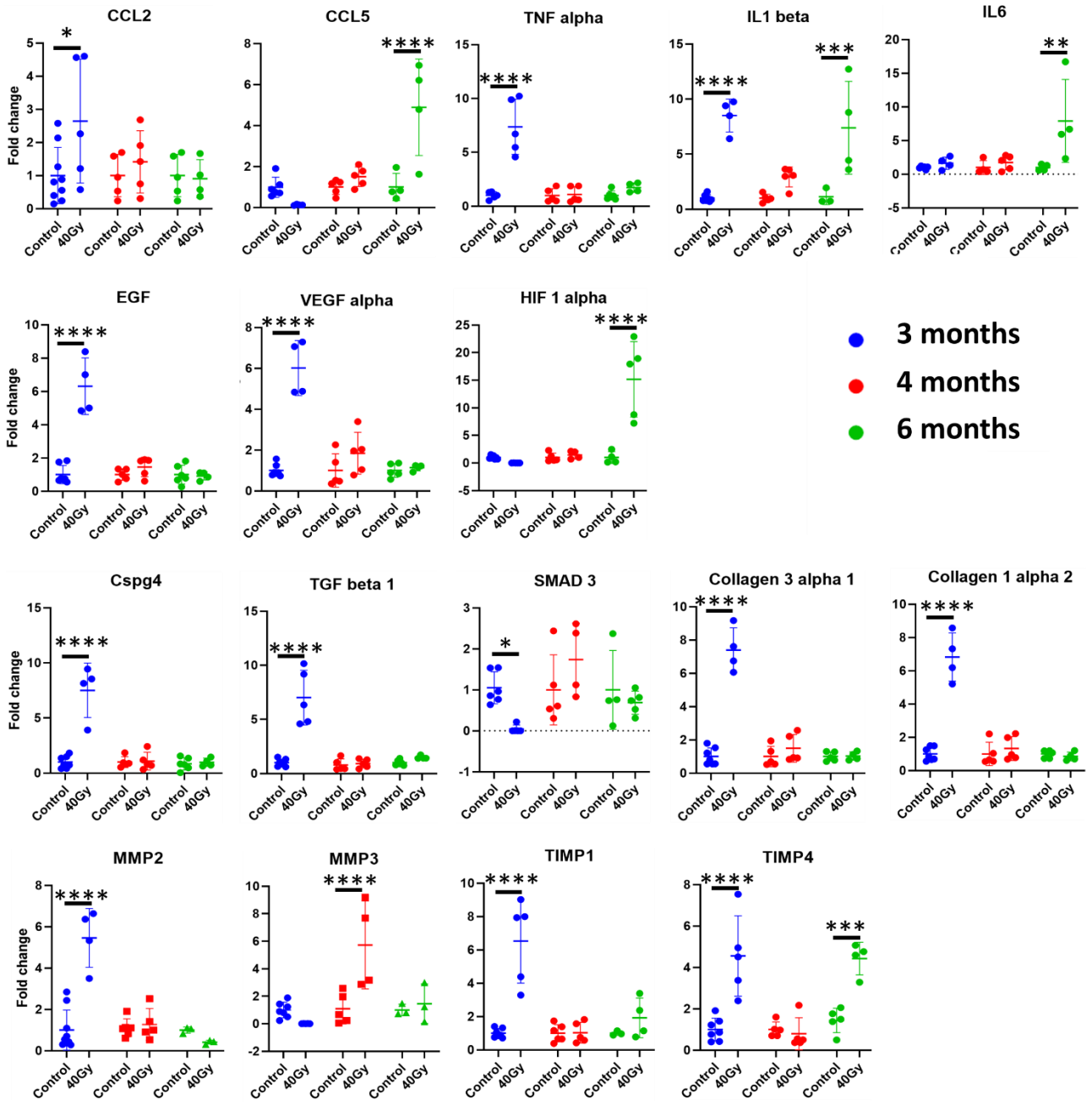


Figure 32 : Étude transcriptomique des gènes liés à l'inflammation, la régénération et à la fibrose

Discussion

L'objectif de cette étude est d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de la CRC par la mise en place d'un modèle de cystite radique chronique chez le rat et de proposer un traitement innovant par thérapie cellulaire. La première étape a été d'obtenir des atteintes de la vessie proche de celles observées chez l'homme pour étudier l'action du traitement par les CSM issues du tissu adipeux sur les mécanismes impliqués dans la CRC. Le but était de définir si la thérapie cellulaire utilisant les CSM est une alternative thérapeutique.

I Apport du modèle d'irradiation par rapport à la littérature

I.1 Configuration d'irradiation

Il existe divers modèles précliniques de CRC dans la littérature. La dose, les protocoles d'irradiation, les appareils et les paramètres utilisés sont variés. Dans la majorité des études antérieures, la configuration de l'irradiation entrainait l'exposition de la zone abdominale et donc l'irradiation d'autres organes comme le côlon ou la prostate. Ces organes irradiés pouvaient interagir sur certaines mesures comme les hématuries. La source d'irradiation dans les modèles précliniques (électron ou neutron) influe sur la sévérité des lésions (Stewart et al. 1986), l'irradiation par électron induisant moins de dommages. L'irradiation avec des électrons a été réalisée à 1,8 MeV alors que l'irradiation avec des neutrons à une énergie plus élevée (3 MeV).

Pour nos expérimentations précliniques, nous avons utilisé le Small Animal Radiation Research Plateforme (SARRP) permettant de cibler précisément une zone voulue à l'aide d'un scan et de délivrer la dose exacte à l'aide d'un ou plusieurs faisceaux. Le SAARP utilise des rayons X de base énergie (220 kV), proche de celle utilisée dans les scanner thoraciques. Le SARRP est couplé à une imagerie scanner et permet d'éviter que le côlon soit irradié. Il s'agit ici d'une amélioration importante par rapport aux modèles d'irradiation à champ large. Dans les études de Stewart et al., la dose au côlon était estimée à environ 60 % de la dose maximale dans la vessie ce qui a entrainé un développement d'une fibrose rectale entre 12 et

16 mois après l'irradiation (Stewart et al. 1978).Les études récentes utilisant la plateforme SARRP ont permis l'irradiation uniquement de la vessie (Zwaans et al. 2016; Zwaans et al. 2020). Basée sur ces études récentes et pour induire la cystite radique chronique, nous avons choisi une irradiation en dose unique à 40 Gy (2 Gy/min 220 kV et 13 mA) de la vessie entière (avec deux faisceaux) réalisée au moyen du SARRP avec comme modèle animal le rat Sprague Dawley femelle. Dans notre étude, deux faisceaux d'irradiation sont placés avec un angle de 90 à 120° afin d'éviter d'irradier le côlon, la moelle épinière et les os des membres inférieurs. Notre méthode d'irradiation est proche de celle utilisée chez Zwaans qui utilise aussi deux faisceaux à 140°. Notre modèle se positionne donc dans les études les plus innovantes et la configuration d'irradiation proche des études de Zwaans permet une comparaison de nos résultats. Dans notre modèle, nous avons amélioré le positionnement de nos animaux par rapport aux autres protocoles. Les rats sont placés sur le dos avec les membres inférieurs relevés à la verticale formant un angle d'environ 90°. Cette position permet de faire redescendre naturellement les intestins et permet de minimiser le risque de les irradier. Nous avons choisi des rats femelles afin de ne pas avoir la prostate dans le champ d'irradiation.

I.2 Justification du modèle animal utilisé pour la CRC

La cystite radique a été étudiée chez la souris, le rat et le lapin. La majorité des études ont été réalisées chez la souris, deux souches différentes de souris ont été utilisées, les souris CH3 et CBA. La différence entre ces deux souches de souris est que les souris C3H sont déficientes en TLR 4 (toll like receptor 4), qui joue un rôle important dans l'inflammation. Cependant, il convient de noter que les souris de la souche C3H développent une cystite radique similaire aux souris de la souche CBA. Il existe très peu d'étude sur le rat. Dans la littérature ce modèle a été développé par Knowles et al., (Knowles 1985), Vale et al., (Vale et al. 1993), Crowe et al., (Crowe et al. 1996), Soler et al, (Soler et al. 2011). Les inconvénients de ces études sont une cinétique d'étude courte et une configuration d'irradiation non ciblée uniquement sur la vessie. À notre connaissance, seuls Kohler et al., avaient développé un modèle de CRC chez le lapin (Kohler et al. 1992; Kohler et al. 1995). L'avantage de ce modèle est de pouvoir irradier uniquement une zone de la vessie. Cependant, les mécanismes sous-jacents de la CRC ne sont pas étudiés.

L'utilisation de rat pour notre étude et non de souris (comme la majorité des modèles pré-cliniques de CRC) se justifie par l'utilisation des CSM pour le traitement. En effet les CSM de rat ont des caractéristiques plus proches des CSM humaines comparées aux CSM de souris (Johnson et al. 2021; Scuteri et al. 2014).

I.3 Les limites de notre modèle

I.3.1 Effets secondaires aigus

Dans notre modèle, plusieurs effets secondaires ont été relevés. Une légère dépilation au niveau de la zone d'irradiation a été notée, sans gravité pour l'animal. Ce résultat est attendu pour une dose d'irradiation de 20 Gy (dose pour un faisceau). Dans de très rares cas, pour des doses d'irradiation supérieure à 60 Gy, une lésion de la peau était visible. Ces lésions n'ont jamais entrainé d'effet indésirable important et disparaissaient après une à deux semaines.

I.3.2 Les effets secondaires de l'irradiation sur l'utérus

Des lésions ont été observées sur l'utérus de quelques rats. Suivant les expériences, le taux d'irradiation de l'utérus a grandement varié, allant de 1,5 à 15%. L'utérus était alors extrêmement gonflé et rempli d'un liquide riche en leucocytes. À la palpation, aucune masse n'était visible ni palpable. De plus, les animaux ne montraient aucun signe de souffrance, même durant les palpations. Cette particularité a empêché tout diagnostic précoce et n'a été révélée que lors de l'euthanasie. Ces atteintes ne semblaient ni liées à la dose d'irradiation ni au temps post-irradiation, mais pourrait être fortement corrélées à la position des faisceaux d'irradiation. En effet, plusieurs études démontrent des atteintes de l'utérus à partir de 20 Gy, ce qui correspondrait à la dose d'un de nos faisceaux d'irradiation (Burleson et al. 2019; Mukanyangezi et al. 2019). Cette hypothèse est renforcée par l'observation que pour certains de nos animaux, seule une des deux cornes utérines était concernée. Il s'agit ici d'une réelle limite de notre modèle. Cette atteinte de l'utérus n'a jamais été décrite dans la littérature, ce qui parait plus qu'étonnant puisque des atteintes du côlon ont été observées, or l'utérus se situe entre la vessie et le côlon. Il est donc impossible de savoir si les autres modèles présentaient des lésions à l'utérus. L'utilisation du SARRP rend le protocole d'irradiation

précise, fiable et reproductible. Sur ce point, il est difficile d'optimiser plus le protocole. Cependant, comme noté précédemment des lésions de l'utérus sont visibles. Pour limiter ces conséquences, il est possible de placer un espaceur entre la vessie et l'utérus. Ainsi la distance entre ces deux organes sera plus grande l'utérus devrait être moins touché par les faisceaux d'irradiation limitant les effets secondaires.

I.3.3 Les tumeurs mammaires inhérentes aux rats Sprague Dawley

Une dernière limite inhérente à notre modèle sont les tumeurs mammaires. Les rats femelles Sprague Dawley sont réputés pour la formation de tumeurs mammaires. Au cours de leur vie, presque 50% des femelles Sprague-Dawley développent des tumeurs mammaires et ce taux augmente à plus de 90% en cas d'irradiation (Gross and Dreyfuss 1979; Muraoka et al. 1977; Prejean et al. 1973). Dans notre étude, seuls 15% de nos rates ont développé une tumeur mammaire, ce qui est un taux relativement faible. De plus, la localisation des tumeurs mammaires n'était pas corrélée avec la position du faisceau d'irradiation. Seul un changement de la souche de rats pourrait significativement diminuer la fréquence des tumeurs. Une autre souche pourrait être envisagée comme les rats Wistars. Les autres souches de rats présentent souvent des maladies auto-immunes, de l'hypertension ou des phénotypes spécifiques qui pourraient interférer avec la CRC. Dans notre modèle nous avons préféré utiliser les rats Sprague Dawley, car cette souche est caractérisée pour la production des CSM et leur utilisation pour le traitement des atteintes colorectales lors d'une irradiation pelvienne (Linard et al. 2013; Usunier et al. 2021).

I.4 Le choix de la dose

Une gamme de doses a été réalisée pour déterminer la dose optimale pour induire la CRC. Cette gamme a été réalisée de 20 à 80 Gy (par incrémentation de 10 Gy) avec un suivi de 6 mois pour les doses de 20 et 30 Gy et jusqu'à un an pour les doses de 40 à 80 Gy. Dans notre étude nous avons choisi d'étudié la présence de sang dans les urines pour caractériser la CRC. Les hématuries sont un des symptômes de référence pour grader les signes cliniques chez les patients, c'est pourquoi, dans notre étude, nous avons retenu d'étudier les hématuries.

L'hématurie mesurée s'est avérée significativement plus élevée à partir de 40 Gy. De plus, pour les doses supérieures à 60 Gy, les hématuries sont devenues trop délétères pour les animaux et ceux-ci ont dû être sacrifiés à 10 mois post-irradiation. La dose de 40 Gy semble être le meilleur compromis entre l'apparition des symptômes et le suivi à long terme de nos animaux. Cette dose est cohérente avec la littérature qui utilise des doses entre 20 et 40 Gy. Dans l'étude de Zwaans leur première publication utilisait une dose de 20 Gy et leur deuxième étude une dose de 40 Gy (Zwaans et al. 2016; Zwaans et al. 2020).

I.5 Le choix de la cinétique

La phase aiguë est caractérisée par une diminution de la capacité vésicale (augmentation de la fréquence de miction et diminution du volume par miction) associée à une perte d'intégrité de l'urothélium (Érosion, diminution des jonctions serrées et de l'uroplakine III), de l'inflammation (médié par TNF-α) associée à de l'hypoxie (augmentation de l'expression de SOD-2 et HO-1), des lésions vasculaires (augmentation de l'expression de Cox-2) et de la fibrose (Augmentation de l'expression de TGF-β et de la fibrose). La durée de la phase aiguë est variable suivant les modèles (de 0 à 2 mois après l'irradiation), voire le tableau 13 (Jaal et al. 2004; Jaal and Dorr 2006c, 2006b, 2006a, 2010; Kowaliuk et al. 2020; Krischak et al. 2021; Zwaans et al. 2021).

La phase de latence correspond à une disparition des lésions observées durant la phase aiguë. La durée de cette phase dépend de la durée de la phase aiguë et se situe entre 1 mois et 6 mois post-irradiation (Kraft et al. 1996; Lundbeck et al. 1989b; Post et al. 1995; Vale et al. 1993).

La phase chronique se caractérise par la résurgence des lésions observées durant la phase aiguë. Une perte de la capacité fonctionnelle de la vessie est observée, caractérisé par une augmentation de la fréquence des mictions et une diminution du volume par miction, des atteintes de l'urothélium (hyperplasies, diminution de l'uroplakine III, relocalisation de l'E-cadherine), une inflammation (médié par IL-6, IL-1β, TNF-α, plus un recrutement des mastocytes) et une neuro-inflammation (augmentation de la substance P et dégénérescence des fibres non myélinisées), des atteintes vasculaires (hémorragies, télangiectasies) et de la fibrose (en relation avec une augmentation de l'expression de l'αSMA et de CTGF). Le début de la phase chronique dépend des études et varie de 3 à 6 mois post-irradiation (Jaal et al. 2004; Jaal and Dorr 2006c, 2006a, 2007, 2010; Vale et al. 1993; Zwaans et al. 2016; Zwaans

et al. 2020; Zwaans et al. 2022). Il est important de noter que la seule étude utilisant le SARRP a une phase chronique qui débute à partir de 6 mois post-irradiation, voir le tableau 13 et 14.

Tableau 13: Observation des lésions en fonction de la phase de la CRC dans la littérature

	Phase aiguë	**Phase de latence**	**Phase chronique**
Temps	**0-2 mois**	**1-6 mois**	**Initiation entre 3-6 mois**
Fonctionnalité de la vessie	Augmentation de la fréquence urinaire Diminution du volume par miction	Restauration de la capacité vésicale	Augmentation de la fréquence urinaire Diminution du volume par miction
Atteintes de l'urothélium	Érosion de l'urothélium Diminution des jonctions serrées (E-cad et ZO-1) Diminution de l'uroplakine III	Restauration de l'urothélium Restauration des jonctions serrées Restauration de l'uroplakine III	Hyperplasie (avec augmentation des cellules en prolifération) Augmentation avec relocalisation de l'E-cadherine dans le cytoplasme Diminution de l'uroplakine III
Inflammation	Augmentation TNF-α, SOD-2 et HO-1	Pas de donnée	Augmentation d'IL-6, IL-1β, TNF-α Augmentation des mastocytes
Neuro-inflammation	Pas de donnée	Pas de donnée	Augmentation de la substance P Dégénérescence des fibres non myélinisées
Lésions vasculaires	Augmentation de Cox-2	Diminution de Cox-2	Lésions vasculaires pâles, hémorragies et télangiectasies Fuite d'albumine autour des vaisseaux sanguins
Fibrose	Augmentation de TGF-β Augmentation de la fibrose	Diminution de la fibrose	Augmentation de l'αSMA et de CTGF Augmentation de la fibrose (avec augmentation des collagènes)

Tableau 14: Observation détaillée des différentes phases de la cystite radique en fonction des études

Auteur	Modèle	Dose	Source d'irradiation	Temps de l'étude	Résultats principaux	Phase aiguë	Phase de latence	Initiation Phase chronique
Lundbeck F (Lundbeck et al. 1989b)	Souris femelle C3D2F1 (C3H/Tif x DBA/2)	Dose unique 20 Gy	Rayon X 250 kV	1 an	Diminution de 50% de la capacité vésicale en aiguë (<30 jours), puis phase de latence puis réponse chronique après 200 jours.	0-30 jour (premiers mois)	30 jours à 200 jours	200 jours et plus (6,5 mois)
Vale J.A (Vale et al. 1993)	Rat femelle Wistar	Dose unique de 10, 15, 20 et 25 Gy	Rayons X Pantak 300 kV et 10 mA, 1,72 Gy/min	6 mois	La première réduction de la capacité vésicale se développe à environ 4 semaines, et la seconde débute à 3-4 mois et a persiste jusqu'à 6 mois. Augmentation de la densité des mastocytes à 6 mois (non statistique) Augmentation de la fibrose (dans 50% des rats) avec dégénérescence focale des cellules musculaires lisses. Dégénération des fibres non myélinisées	4 semaines (1 mois)	De 1 à 3 mois	3-4 mois
Post G.J avec Stewart (Post et al. 1995)	Souris femelle C3H/Hen Af-nu+	Dose unique de 10, 15, 20, 22.5, et 25 Gy	Rayons X 250 kV, filtrés à 0,5 mm Cu, à 15 mA, 2,1 Gy/min	1, 2 et 4 semaines après l'irradiation puis mensuelles jusqu'à 61 semaines (irradiation lors de la semaine 4 ou 12)	Augmentation de la fréquence en phase aiguë les 4 premières semaines, et tardif à partir de 15 à 37 semaines (proportionnelle à la dose) Réduction du volume par miction entre 52 et 56 semaines pour 25 Gy. Diminution du volume total de la vessie en fonction de la dose	4 semaines (1 mois)	De 4 à 15 semaines (1 à 4 mois)	15 semaines (presque 4 mois)
Dörr W (Dorr and Bentzen 1999)	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique 13, 16, 18, 20 et 23 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machin+E14:H14e (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 300kV, 5,3 Gy/min	0 à 360 jours	Diminution du volume urinaire en fonction du temps et en fonction de la dose. Plus la dose est faible et le fractionnement important plus les lésions chroniques sont tardives	13 et 18 Gy 30 jours (1 mois)		200 jours (6,5 mois)
Jaal J (Jaal et al. 2004)	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique de 20 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	90, 120, 180, 240 et 360 (phase de réponse tardive) après l'irradiation	Réduction de la capacité de la vessie de 50 % chez 40 % des animaux irradiés entre les jours 0 et 15, 64 % des animaux entre les jours 16 et 30. En tardif, 71% des animaux présentions une réduction de la capacité vésicale après le 180e jour Augmentation de l'expression d'ICAM au deuxième jour, avec un maximum au quatrième jour et un retour aux valeurs de contrôle au jour 13. Augmentation permanente du signal de coloration de l'ICAM-1 a été observée dans la phase tardive, du 90e au 360e jour après l'irradiation.	1er mois 1er mois	1 à 6 mois	180 jours (6mois)
Jaal J (Jaal and Dorr 2006b)	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique de 20 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	2, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 jours (précoce), puis aux jours 90, 120, 180, 240 et 360 (tardif) après l'irradiation	Augmentation de l'expression de COX-2 dans la paroi des vaisseaux sanguins durant la phase précoce (4 à 16 jours), mais pas dans la phase tardive	1er mois	1 à 3 mois	90 jours (3mois)

Jaal J (Jaal and Dorr 2006c)	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique de 20 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	2, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 jours (précoce), puis aux jours 90, 120, 180, 240 et 360 (tardif) après l'irradiation	Diminution des cellules superficielles en phase précoce (jour 0 à 31) jusqu'au début de la phase tardive (90 à 120 jours), perte progressive de l'expression de l'Uroplakine III à la surface des cellules corrélé à la perte des cellules superficielles, mais augmentation de l'expression cytoplasmique de l'Uroplakine III dans les cellules superficielles jusqu'au début de la phase tardif (120 jours)	1er mois	1 à 3 mois	90 jours (3mois)
Jaal J (Jaal and Dorr 2006a)	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique de 20 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	90, 120, 180, 240 et 360 (phase de réponse tardive) après l'irradiation	Infiltration de l'albumine autour des petits vaisseaux sanguins en phase précoce et tardive Augmentation du dépôt des collagènes dans la vessie	1er mois	1 à 3 mois	90 jours (3mois)
Jaal J (Jaal and Dorr 2010)	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique de 20 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	de 0 à 360 jours	Diminution du nombre de cellules total de l'urothélium à 13 jours, suivis d'une légère récupération le jour 22 et d'une deuxième diminution de 49% à 31 jours. Diminution du nombre total de cellules à 90 et 120 jours avec une restauration apparente de l'urothélium au jour 180. En revanche, au jour 360, une augmentation du nombre total de cellules a été observée (143%). Pas de changement de l'expression de Ki67 jusqu'à j35, puis augmentation jusqu'à j360. Augmentation de l'expression d'EGFR jusqu'à j 360. Augmentation de l'expression urothéliale de l'EGFR (dans les cellules basales) qui précède la restauration urothéliale, ce qui indique une contribution du système EGF/EGFR à la prolifération et à la différenciation urothéliales	1er mois	1 à 3 mois	90 jours (3mois)
Zwaans B M M (Zwaans et al. 2016)	Souris femelle C3H/HeN	Dose unique de 20 Gy	Small Animl Radiation Research Plateforme (SARRP), 2 Gy/min 220 kV et 13 mA	19 semaines	Augmentation de la fréquence urinaire avec diminution du volume par miction Augmentation de la fibrose Diminution de l'expression d'Upk III, de l'E-cadhérine et de CD31, hyperplasie Augmentation des mastocytes	3 à 9 semaines (2 mois)	2 à 5 mois	19 semaines (5 mois)
Krischak (Krischak et al. 2021)	Souris femelle C3H/Neu	Dose unique de 23 Gy. Traitement à base de thalidomide (inhibiteur de la voie NF-κB)	YXLON MG325 X ray, (YXLON International GmbH, Hambourg, Allemagne), 200 kV, 20mA, vessie à 0,9 cm du champ d'irradiation 1Gy/min à une distance de 45,5 cm	12 mois (analyse une fois par mois)	Augmentation de l'E-cadhérine et de la β-caténine en phase précoce, puis diminution à la fin de la phase précoce pour la β-caténine seulement (30 jours). Augmentation en phase chronique de l'E-cadhérine avec un plateau à 240 jours avec relocalisation dans le cytoplasme. Augmentation de la β-caténine qu'à partir de 180 jours de la avec un plateau à 240 jours. En phase précoce la thalidomide augmente plus rapidement l'expression de l'E-cadhérine et de la β-caténine pour arriver au même plateau que les irradiés, En phase chronique augmentation de l'expression de l'E-cadhérine avec expression plus forte sur la paroi cellulaire, peu de différence pour la β-caténine	1er mois	1 à 6 mois	180 jours (6 mois)

Dans notre modèle, les études transcriptomiques sont en faveur d'une inflammation à 3 mois post-irradiation accompagnée d'une augmentation de l'expression des gènes liés à la régénération et la réparation tissulaire (EGF, VEGFα, collagènes, MMP et TIMP), (voir tableau 15). Ces résultats sont cohérents avec la littérature qui démontre une inflammation dans les premiers mois après irradiation ainsi qu'une érosion de l'urothélium et une augmentation de TGF-β (Giglio et al. 2016; Oscarsson et al. 2017; Ozbilgin et al. 2016b) accompagnée d'une dénudation et d'une perte des jonctions serrées (Jaal and Dorr 2006c).

Nos résultats à 4 mois post-irradiation, ne permettent pas d'observer des lésions en HES. De plus, notre étude transcriptomique ne révèle pas de variation de l'expression des gènes liés à l'inflammation, à la régénération et à la fibrose (hormis MMP3). Ces résultats suggèrent une phase silencieuse de la cystite radique à 4 mois.

À 6 mois post-irradiation, une seconde phase d'inflammation est observée avec la surexpression des gènes CCL5, IL-1β, Il6 et HIF1α. Les gènes liés à la régénération et à la fibrose ne sont pas significativement augmentés (hormis TIMP4). De plus, les observations histologiques sont en faveur d'une augmentation des atteintes urothéliales (hyperplasie, uroplakine) à partir de 6 mois qui augmentent avec le temps. Ces résultats sont en accord avec la littérature (Jaal and Dorr 2006c, 2006b, 2006a, 2010; Krischak et al. 2021; Zwaans et al. 2021).

Ces observations en accord avec à la littérature sont en faveur d'une fin de la phase aiguë à 3 mois post-irradiation suivis d'une phase de latence entre 4 et 6 mois, puis à 6 mois post-irradiation une initiation de la phase chronique. Ces hypothèses sont renforcées par l'étude de Zwaans et al., de 2016 qui utilise le même modèle d'irradiation (SARRP) et observe l'apparition de la phase chronique à partir de 5 mois. Il semble que l'irradiation ciblée de la vessie dans son intégralité ait un effet protecteur en retardant l'apparition de la phase chronique par rapport aux irradiations abdominales.

Tableau 15: Observation des lésions en fonction de la phase de la CRC dans notre étude

	Phase aiguë	**Phase de latence**	**Phase chronique**
Temps	**0-3 mois**	**3-6 mois**	**Initiation à partir de 6 mois**
Atteintes de l'urothélium	Pas de donnée	Pas de donnée	Hyperplasie Diminution de l'uroplakine III
Inflammation	Augmentation de l'expression de TNF-α, CCL2, IL1β,	Diminution de TNF-α, CCL2, IL1β,	Augmentation d'IL-6, IL-1β, CCL5 et HIF-1α Augmentation des mastocytes (12 mois)
Lésions vasculaires	Pas de donnée	Pas de donnée	Lésions vasculaires, hémorragies
Fibrose	Augmentation de TGF-β1, Cspg4, Collagène3 et 1, MMP2, TIMP 1 et 4, mais pas de fibrose	Diminution de l'expression de TGF-β1, Cspg4, Collagène3 et 1, MMP2 et 3, TIMP 1 et 4	Augmentation de TIMP4 Augmentation de la fibrose

I. 6 Les paramètres analysés

Les atteintes de l'urothélium, l'inflammation, les lésions vasculaires et la fibrose sont les principaux mécanismes impliqués dans la CRC. Dans notre étude, nous nous sommes principalement focalisés sur les atteintes de l'urothélium et du compartiment vasculaire. En effet, l'urothélium est un point clé de l'initiation et du maintien de la CRC et les hématuries sont un élément clé pour grader la CRC en clinique.

II Caractérisation de la cystite radique chronique dans notre modèle d'étude

II.1 L'hématurie, un marqueur de la cystite radique chronique

L'objectif est de se placer dans des conditions proches de la clinique, il est donc primordial d'être à la dose minimale pour induire des effets chroniques. Dans notre étude nous avons mis en évidence, pour la première fois, des hématuries. L'intensité des hématuries mesurée est proportionnelle à la dose reçue à la vessie. Nous avons retenu, la dose de 40 Gy, car elle permet d'induire des hématuries sans entrainer des lésions délétères pour l'animal comme observé pour des doses plus fortes. C'est cette dose qui a été choisis pour tester les effets des CSM sur la CRC. À notre connaissance il n'existe pas d'autre étude sur les hématuries chroniques dans les modèles précliniques de cystites radiques ou dans des modèles de cystite interstitielle et hémorragique. Les protocoles pour induire des hématuries dans les modèles pré-cliniques sont réalisés par instillation de cyclophosphamide ou de kétamine ou d'autre agent irritant, comme pour l'induction de la cystite interstitielle. L'induction d'hématuries est alors de l'ordre de quelques jours. L'analyse des hématuries a été réalisée avec des bandelettes urinaires. Des tests complémentaires peuvent être réalisés comme la mesure de l'hémoglobine. Cette mesure est complémentaire à l'hématurie, car elle va quantifier les hématies qui ont été hémolysées, ce qui semble être le cas dans la CRC puisque que de l'albumine (un autre composé des hématies) est retrouvée autour des vaisseaux sanguins et potentiellement dans les urines (Jaal and Dorr 2006a). L'analyse de l'hémoglobine à haut débit est possible dans notre institut. L'utilisation du Konelab (un appareil d'analyse biochimique) permet de quantifier l'hémoglobine par spectrométrie après

réaction avec du 3,3'-diméthylbenzidine en présence d'H2O2 (Assoumanou and Akpona 2011). Cette technique permet une analyse quantitative précise de l'hémoglobine.

Les lésions vasculaires observées par cytoscopie, bien que non significative, démontrent une tendance à la diminution des lésions vasculaire et confortent la validité de notre modèle et l'intérêt de l'étude des hématuries et des lésions vasculaires (Hoang et al. 2019). Chez les patients atteints de CRC avec des hémorragies, de très nombreuses lésions vasculaires sont visibles en cystoscopie. Des télangiectasies, des érythèmes des œdèmes et des hémorragies, des ulcérations, des fistules voir de la nécrose sont décrites. Dans notre modèle, des lésions vasculaires ont été mises en évidence par la cystoscopie chez les rats irradiés avec une persistance à 12 mois post-irradiation. Cependant, l'utilisation d'un cystoscope pour le rat n'est pas sans danger. Il n'existe pas de cystoscope spécialement adapté pour le rat et la taille minimale trouvée sur le marché (chez Karl Stroz) peut s'avérer juste. Dans notre étude, à plusieurs reprises l'introduction du cystoscope a entrainé la déchirure de l'urètre ou quelques lésions sur la vessie (facilement distinguable et enlevé des études). À cause de cette limitation technique, un suivi longitudinal des animaux n'a pas pu être réalisé, ce qui aurait pu fournir des informations très importantes sur l'évolution des atteintes vasculaires. C'est pour cette raison que cette méthode n'a été utilisée qu'en point terminal. Seuls 3 rats par groupe ont été utilisés, car les éventuelles lésions provoquées par le cystoscope pourraient ressortir sur les autres paramètres étudiés et ainsi fausser les mesures. Actuellement, un cystoscope plus petit (0,6 mm) (qui n'était pas disponible lors de nos expériences pour raison réglementaire) permettrait d'éviter de créer des lésions. De plus, cet appareil assurerait un suivi longitudinal des lésions vasculaires et ainsi de mieux comprendre les processus mis en jeu.

II.2 L'urothélium, un acteur majeur de l'apparition de la cystite radique chronique.

Les lésions de l'urothélium sont à l'origine de la détérioration des tissus sous-jacents, c'est donc un processus fondamental de la progression de la cystite radique.

La diminution de l'uroplakine III entrainerait une réduction de l'imperméabilité vésicale et augmenterait l'infiltration de l'urine, notamment certains métabolites comme le potassium (Parsons et al. 1994; Parsons et al. 2005; Parsons 2011), participant à l'inflammation. Dans notre modèle, la diminution de l'uroplakine III débute à 8 mois et

s'accentue jusqu'à 12 mois post-irradiation. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Zwaans bien que la diminution de l'uroplakine soit observée à des temps plus précoces (3 à 19 semaines) post-irradiation (Zwaans et al. 2016). D'autres études ont montré une diminution des jonctions serrées comme l'E-cad renforçant l'hypothèse d'une augmentation de la perméabilité urothéliale après irradiation (Zwaans et al. 2016). Les protéines de jonction cellulaire comme l'E-cadhérine ou Zona Occludens 1 ont aussi un rôle essentiel. Bien que des études démontrent une relocalisation de ces protéines de la membrane cellulaire au cytoplasme, soutenant la diminution de la perméabilité, celle-ci n'a pas été encore étudiée dans notre modèle. Des analyses immunohistochimiques sur ces deux protéines apporteraient des données supplémentaires sur les mécanismes de la CRC. L'efficacité des CSM sur ce paramètre renforcerait l'hypothèse d'une protection de l'imperméabilité urothéliale. Dans les différentes cystites, une perte de la couche de GAG est visible en participant à la perte de la perméabilité. Dans la CRC aucune étude n'a été réalisée. Une étude avec une coloration PAS (Periodic Acid Shiff) permettrait de déterminer s'il y a une diminution des GAG après irradiation et si les CSM permettent de maintenir cette couche.

Des études complémentaires sur l'imperméabilité de l'urothélium pourraient être investiguées. Une mesure de la résistance électrique transépithéliale est concevable. Normalement, la résistance de l'urothélium est très élevée avec 2500 Ω/cm² pour les rats (75 000 Ω/cm² pour l'Homme). En cas de lésion, une diminution de cette résistance est visible. Cependant, cette mesure risque d'être altérée par les hyperplasies qui, en condition physiologique, servent à maintenir l'imperméabilité (Visnjar et al. 2012). De plus, cette mesure n'est réalisable qu'en point terminal. Une autre possibilité est l'instillation de FITC (Fluorescein-5-isothiocyanate) -dextran (4 kDa) dans la vessie (Hurst et al. 2016). Si la perméabilité de la vessie diminue, le FITC dextran pourra passer la barrière urothéliale et se retrouver ensuite dans le sang. Cette méthode est efficace et non toxique pour l'animal et un suivi longitudinal de la perméabilité peut être réalisé.

II.3 Inflammation

La perte de la fonction protectrice de l'urothélium permet le passage d'urine créant une inflammation permanente des tissus. Un des critères les plus communs dans la CRC est la présence de mastocytes dans le tissu. Dans notre modèle, une légère augmentation des

mastocytes est mesurée chez les rats irradiés à 12 mois (unique temps mesuré), une étude à 6 mois post-irradiation permettrait de déterminer si les mastocytes participent à l'induction de l'inflammation ou s'ils apparaissent uniquement en phase tardive. Cependant, plusieurs études sur le côlon irradié démontrent que cette augmentation de mastocytes n'est pas toujours corrélée à une augmentation de l'inflammation, car les mastocytes ne sont pas toujours activés (Milliat and Francois 2018). Nous avons réalisé une étude transcriptomique préliminaire qui montre une augmentation de CCL2, CCL5, TNF-α, IL1-β durant la phase aiguë post-irradiation (3 mois), suivie d'une phase de latence (4 mois), puis un début de phase chronique à partir de 6 mois post-irradiation en relation avec la surexpression de CCL5, IL-6 et IL1-β, HIF-1α. Une surexpression de HIF-1α pourrait indiquer que la phase chronique est associée à une hypoxie. Seule l'étude de Kowaliuk a étudié des marqueurs de l'inflammation, il est donc difficile de corréler nos résultats par rapport aux travaux scientifiques antérieurs. Dans cette étude, une augmentation de p50 (régulateur de NF-κB) est observée jusqu'à un an après irradiation, suggérant une inflammation chronique (Kowaliuk et al. 2020) dans la CRC. D'autres études dans la cystite interstitielle mettent en évidence des facteurs pro-inflammatoires comme IL1-β et IL-6 (Jiang et al. 2013; Wang et al. 2017b).

II.4 Mise en place de la fibrose lors de la CRC

Nos résultats sur la fibrose de la paroi de vessie après irradiation sont en faveur d'une augmentation du processus fibrotique au cours de temps, ce qui est cohérent avec la littérature (Jaal and Dorr 2006c; Kraft et al. 1996; Zwaans et al. 2016; Zwaans et al. 2020). Les études tissulaires par coloration au rouge Sirius ont permis de mettre en évidence des atteintes importantes au niveau de la MEC et de l'urothélium. À 10 mois post-irradiation pour les doses de 50 et 80 Gy, une infiltration de la MEC est observée dans le détrusor conduisant à sa déstructuration et à des zones de fibrose. Pour la dose de 40 Gy (rats irradiés non traités) les données sur la fibrose sont condradictoire avec une sur expression du nombre de rat avec des zones de fibroses à 8 mois mais pas à 10 ni 12 mois tandis que pour le groupe des rats irradiés traités le nombre de rats avec des zones de fibrose est significativement plus élevé à 8 et 12 mois. Cette différence peut s'expliqué par le faible nombre de rat par groupe (10 pour les rats irradiéss traité et 20 pour les rats irradiés non traités). De plus la mise en place de la fibrose est lente et des temps plus tardif devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes mis en place. Une étude de Zwaans et al., de 2022, a montré une rigidité de la MEC est observée à 6 mois associés à une incontinence urinaire (pour une irradiation

de 40 Gy chez la souris), confirmant la relation qui existe entre la fibrose et l'incontinence. Dans notre étude nous n'avons pas évalué l'incontience mais des études complémentaires sur ce paramètre sont en cours.

II.5 Conclusion sur notre modèle de cystite radique chronique

En conclusion, nous avons développé un modèle de cystite radique en agrément avec la littérature. La cinétique de développement des lésions débute avec une phase aiguë de 0 à 3 mois, puis d'une phase silencieuse de 3 à 6 mois suivi de la phase chronique à partir de 6 mois. Les atteintes de l'urothélium semblent à l'origine de la phase chronique de la cystite radique. Les atteintes vasculaires sont encore insuffisamment décrites dans notre modèle mais participerait activement à la mise en place de la CRC. Quant à l'inflammation, il est nécessaire de mieux caractériser l'activation des mastocytes et de connaitre la polarisation des lymphocytes et des macrophages lors de la progression de la CRC. Bien que les mécanismes de la cystite radique soient partiellement connus, ils sont bien documentés pour la cystite interstitielle et la cystite hémorragique. Il existe des similitudes pour ces pathologies au niveau des mécanismes. Dans ces pathologies ; une atteinte épithéliale, une inflammation, une atteinte vasculaire et des fibres nerveuses, et enfin une fibrose sont observées.

III Effet des CSM sur la cystite radique chronique

L'objectif est de réaliser une preuve de concept que le traitement par les CSM permet de limiter ou de reverser la cystite radique dans sa phase chronique. Les traitements actuels des cystites radiques sont palliatifs. Dans des pathologies similaires comme la cystite interstitielle et hémorragique, les CSM ont permis de diminuer l'inflammation et la fibrose et ont augmenté la régénération tissulaire (Song et al., 2015 ; Ringdén et al., 2007, 2021). De plus les précédents travaux menés au laboratoire ont permis de démontrer que le traitement par les CSM permet de reverser l'inflammation chronique et la fibrose lors d'atteintes colorectales après irradiation (Francois et al. 2019; Linard et al. 2013; Usunier et al. 2021).

En ce qui concerne le protocole de traitement de la CRC, nos études précédentes ont montré que le traitement par CSM par voie intraveineuse :

- Est optimal avec trois injections intraveineuses de CSM. Ce protocole a permis de réduire significativement les lésions colorectales après irradiation.
- Limite ou réverse la fibronécrose et l'œdème, si l'injection est réalisée lors de la phase d'initiation de la fibrose.

III.1 Réduction des lésions de l'urothélium après traitement par les CSM.

III.1.1 Les CSM protège l'imperméabilité de l'urothélium en conservant l'expression de l'uroplakine III

La perte d'imperméabilité de l'urothélium, en raison d'une réparation défectueuse, ne permet plus la protection des tissus sous-jacents favorisant leur dégradation. Ce mécanisme pourrait-être à l'origine de la phase chronique de la cystite radique. En se basant sur les résultats de la littérature qui montre que le traitement par les CSM permet d'accélérer la régénération des épithéliums après irradiation, nous avons recherché à savoir si le traitement par les CSM permettrait la régénération de l'urothélium après irradiation. Au niveau intestinal, l'injection intraveineuse de CSM induit la prolifération des cellules progénitrices endogènes des cryptes intestinales permettant la régénération épithéliale du côlon (Francois et al. 2019; Gong et al. 2016; Kudo et al. 2010; Semont et al. 2006; Semont et al. 2013). C'est donc pourquoi les CSM en protégeant l'urothélium pourraient jouer un rôle majeur pour limiter la progression de la CRC.

La couche superficielle de l'urothélium est composée de cellules superficielles également appelées cellule parapluie. Elles possèdent une membrane composée d'uroplakines qui assurent l'imperméabilité de la vessie. Les études précliniques montrent que lors de la CRC, des lésions de l'urothélium sont observées en relation avec une diminution de l'expression de l'uroplakine III. La conséquence est une perte de l'étanchéité de la vessie. Dans notre modèle, le traitement par les CSM permet de maintenir le niveau d'expression de l'uroplakine III à 12 mois post-irradiation. Nous observons une tendance à la diminution des grades 2 et 3 dans le groupe irradié traité par rapport au groupe irradié non traité à 12 mois post-irradiation. Le traitement par les CSM semblerait permettre de conserver ou de restaurer l'imperméabilité de la vessie. Ces résultats sont confortés avec les études sur la cystite

interstitielle aiguë, où le traitement par CSM permet d'augmenter l'expression de l'uroplakine III (Chung et al. 2019; Kim et al. 2020).

III.1.2 Les CSM diminuent l'épaississement de l'urothélium

Les cellules souches basales permettent la régénération de l'urothélium. Nous avons investigué si le traitement par les CSM permettait de favoriser la régénération de l'urothélium lors de la phase chronique de la cystite en induisant la prolifération des cellules souches basales de l'urothélium. Les arguments en faveur de l'action des CSM sont que lors de la CI, le traitement par les CSM induit une régénération complète de l'urothélium avec une diminution des œdèmes, de la dénudation et une régénération de la lamina propria et de la membrane basale (Lee et al. 2018; Ryu et al. 2018; Song et al. 2015). Dans notre modèle lors de la phase chronique, une augmentation de l'épaisseur de l'urothélium est observée. Le traitement par les CSM, dès 8 mois post-irradiation, est en faveur d'une diminution de cet épaississement. Cette diminution devient significative à 12 mois post-irradiation.

Notre hypothèse est que l'augmentation de l'épaisseur de l'urothélium est due à une anomalie de régénération induite par l'irradiation et que le traitement par les CSM pourrait réverser cette dysfonction. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Pour comprendre les mécanismes de régénération menant à l'augmentation de l'épaisseur de l'urothélium, un co-marquage de la prolifération cellulaire (PCNA) et des cellules souches basales (CK14) est nécessaire sur l'ensemble des conditions et des animaux. Ainsi il sera possible de voir s'il y a une augmentation de la prolifération des cellules souches dans les zones avec une épaisseur anormale. Un nombre important de cellules souches en prolifération accompagné d'une augmentation anormale de l'épaisseur de l'urothélium étant un marqueur d'une hyperplasie active. Il sera alors possible de savoir si le traitement par les CSM permet de diminuer ces zones. L'action anti-hyperplasique des CSM est très bien documentée dans la littérature. L'action pro régénérative des CSM est médiée par les voies Shh, EGF, IGF et Wnt qui activeraient la protéine Gli-1 qui est un facteur de transcription important dans la prolifération et le maintien des cellules souches en activant les gènes Ptc-&1, Myc, SOX2, NANOG ou encore Bcl2 (Chen et al. 2014; Chung et al. 2019; Kim et al. 2017; Ryu et al. 2018; Song et al. 2015; Xiao et al. 2017). Les CSM pourraient également

induire la prolifération des cellules souches par la production de Sox9, HGF, PGE-2 et TSG-6 induisant la régénération de l'urothélium (Guillamat-Prats 2021; Semont et al. 2013).

III.2 Influence du traitement par les CSM sur l'inflammation lors de la CRC

La pathologie de la CRC est soit à prédominance inflammatoire, soit à prédominance hémorragique. L'inflammation chronique semble être à l'origine de chronicité de nombreuses pathologies dont peut-être la CRC. Par ailleurs, de nombreuses études ont démontré le rôle immuno-régulateur des CSM notamment après une irradiation (Bessout et al. 2015; Linard et al. 2013; Usunier et al. 2021). Cette fonction des CSM pourrait donc permettre de limiter la progression de la CRC.

En ce qui concerne le rôle de l'inflammation lors de la CRC, une augmentation du nombre de mastocytes a été observée (Vale et al. 1993; Zwaans et al. 2016). Nos études confirment une augmentation du nombre de mastocytes lors de la CRC à 12 mois post-irradiation. Pour des pathologies similaires, telle la cystite interstitielle, l'altération de l'urothélium induit la libération d'histamine, d'IL-6, de VEGF et de tryptase (He and Walls 1997; Wang et al. 2017b) et des premières études, non publié (Ward et al. 2022), suggèrent une augmentation d'IL-6, IL-1β, TNF-α dans la CRC. L'altération de l'urothélium pourrait donc être à l'origine du recrutement puis de l'activation des mastocytes lors de la CRC. Les macrophages, les lymphocytes B, les plasmocytes et les lymphocytes T jouent un rôle prépondérant dans l'inflammation chronique dans diverses pathologies radio-induites (Yahyapour et al. 2018), cependant leur rôle n'a pas été étudié lors de la CRC. Après traitement par les CSM, de nombreuses études dans des modèles de CI ont montré une diminution du nombre de mastocytes (Furuta et al. 2018; Kim et al. 2016b; Kim et al. 2020; Lee et al. 2018; Ryu et al. 2018; Song et al. 2015; Xiao et al. 2017). Dans notre modèle, nous n'avons pas observé de différences significatives du nombre de mastocyte entre les groupes irradiés non traités et irradiés traités par les CSM. Cependant, il est nécessaire de connaitre l'état d'activation des mastocytes pour avoir une information objective. Les CSM induisent un ensemble de facteurs réorientant la polarisation des cellules immunitaires. Lors de l'inflammation, les CSM modifient la polarisation des lymphocytes et des macrophages vers

un profile anti-inflammatoire, activent les Treg et inhibent les cellules NK et dendritiques. Il est donc nécessaire d'intégrer cet élément dans notre étude.

III.3 Influence du traitement par les CSM sur la neuroinflammation lors de la CRC

Le compartiment nerveux a un très grand rôle lors des mictions, ordonnant aux muscles du détrusor de se contracter pour vider la vessie. Dans d'autres types de cystites et notamment la cystite interstitielle, il a été montré une importante inflammation des fibres nerveuses ainsi qu'une « souffrance » de celle-ci induie par les mastocytes par l'intermédiaire de différents signaux (NGF, substance P) (Chen et al. 2018; Chen et al. 2020; Parsons et al. 2001; Peeker et al. 2000; Sant et al. 2007; Theoharides et al. 2001). Cette neuro inflammation pourrait avoir un rôle prépondérant dans l'apparition de la cystite radique chronique. En effet, celle-ci entraine des contractions aléatoires et incomplètes de la vessie (phénomène de vessie hyperactive) participant aux incontinences ainsi qu'aux douleurs observées en clinique. Une analyse de la neuroinflammation pourrait expliquer les phénomènes de douleurs, d'hyper activité du detrusor ou encore des incontinences. L'action des CSM sur ce phénomène est décrite dans la CI et dans la rectite radique (Chen et al. 2014; Durand et al. 2015). Les études du laboratoire ont montré que le traitement par les CSM induisait une diminution de l'hypersensibilité viscérale après irradiation colorectale (Durand et al. 2015). C'est un argument en faveur du rôle des CSM sur la protection des fibres nerveuses lors de la cystite radique chronique. Il est donc nécessaire d'étudier les atteintes du système nerveux de la vessie. L'action des CSM sur ce phénomène n'est pas connue dans la CRC. Cette neuroinflammation proviendrait d'un rapprochement entre les mastocytes et les fibres nerveuses. Les mastocytes libèrent de la tryptase qui va induire une neuroinflammation (Chen et al. 2014; Durand et al. 2015) libérant de la substance P créant la douleur. Dans la CI le traitement par les CSM a permis de diminuer la quantité de substances P soutenant l'action des CSM sur la diminution de la neuroinflammation (Chen et al. 2014). Dans notre modèle nous étudierons le rapprochement des mastocytes et des fibres nerveuses. Pour cela, un co-marquage des fibres nerveuses par PGP9.5 et des mastocytes par la tryptase a été réalisé. L'étude est en cours dans notre laboratoire et permettra de mieux comprendre ces mécanismes.

III.4 CSM et fibrose vésicale

La fibrose joue un rôle important dans la phase chronique. L'augmentation des fibres de collagènes I et III et leur infiltration dans les muscles vont entrainer la diminution de la capacité contractile. La rigidification de la paroi de la vessie est due à un envahissement du compartiment musculaire par la MEC, augmentant la pression vésicale maximale (Neemuchwala et al. 2017). La fibrose est donc à l'origine des incontinences, des urgences et des pollakiuries. Ces altérations de la fonctionnalité vésicale associées à la fragilisation des vaisseaux sanguins par l'irradiation conduisent à des hématuries ainsi qu'à des lésions vésicales. Dans de nombreuses autres pathologies comme la fibrose pulmonaire ou la rectite radique, le traitement par les CSM permet une diminution de la fibrose (Li et al. 2021b; Usunier et al. 2021). Nous avons donc évalué l'effet du traitement des CSM sur la fibrose lors de la CRC. Nous avons observé que l'injection des CSM ne réduit pas le nombre d'animaux présentant des plaques de fibrose à 8 et 12 mois post-irradiation. Cependant, ces premiers résultats ne permettent pas de conclure. D'autres marquages des phases plus précoces sont nécessaires, comme le marquage des fibres de collagène I et III ou des myofibroblastes qui sont les principaux producteurs de MEC. Des analyses transcriptomiques de l'ensemble des TIMP, MMP des collagènes et d'autres marqueurs de la fibrose sont en cours. Ces informations sont importantes, car elles permettent de réaliser des ratios indiquant si la MEC est dans une phase d'accumulation ou de destruction nous renseignant grandement sur la progression de la fibrose (Linard et al. 2013; Usunier et al. 2021). De plus, il s'agit des étapes d'initiation de la fibrose ce qui nous permettra de mieux connaitre la cinétique de mise en place et potentiellement comprendre l'action des CSM sur ce paramètre.

Il est nécessaire d'allonger les temps d'analyse à des temps supérieurs à 12 mois afin de permettre la progression de la fibrose et pouvoir observer le rôle du traitement des CSM. La conséquence de la fibrose est une désorganisation et une perte de fibres musculaires. Une étude plus approfondie sur le compartiment musculaire pour des temps plus longs (>12 mois) permettra de mieux comprendre le fonctionnement des contractions et des dilatations pouvant expliquer le phénomène d'incontinence observé dans les différentes études (les études de Stewart et al ainsi que de Zwaans) et ainsi mieux comprendre les atteintes de la fibrose sur le muscle dans la CRC et de savoir si le traitement par les CSM prévient ces dommages.

Les études sur la CI démontre un effet antifibrosant des CSM avec une diminution des collagènes et des facteurs pro-fibrosants comme TGF β1, β3, Smad2 et Snail 1, 2 et 3 (Kim et al. 2016b; Lee et al. 2018; Xiao et al. 2017). L'effet antifibrosant des CSM semble en partie dut à l'action de l'Hépatocyte Growth Factor (HGF) et au Tumor necrosis factor-inducible Gene 6 protein (TSG-6). Ces deux protéines sécrétées par les CSM ont un effet pléiotropique, elles ont un effet anti-inflammatoire et favorisent la régénération tissulaire (Usunier et al. 2014). Pour caractériser les mécanismes moléculaires d'actions des CSM sur la limitation de la fibrose, nous investiguerons la polarisation des lymphocytes T et des macrophages, les mastocytes, la voie TGF beta, les dommages vasculaires et le remodelage matriciel ainsi que sur les effecteurs HGF et TSG-6. Les techniques qui seront utilisées pour caractériser l'effet de HGF et TSG-6 ont été validées lors d'une précédente thèse (Usunier et al. 2021). Notamment l'ensemble des protocoles utilisés pour l'extinction des gènes TSG-6 et HGF dans les CSM, le traitement des animaux avec les CSM « silencées » ainsi que les outils d'analyses et les principaux mécanismes mis en jeu.

Perspectives

I Cinétique d'injection

En nous basant sur les études antérieures du laboratoire, nous avons étudié le rôle de 3 injections intraveineuses de CSM durant la phase silencieuse qui précède la phase chronique afin de potentialiser l'effet des CSM. Dans notre modèle, nous avons réalisé 3 injections de 5 millions de CSM à deux semaines d'écart entre 4,5 et 5,5 mois après irradiation. Ce protocole a déjà été montré comme étant optimal comme traitement pour diverses pathologies radio-induites. Il semblerait que des injections répétées à 15 jours d'intervalle permettent de potentialiser l'effet des CSM. L'injection est réalisée au début (voire avant l'initiation de la phase chronique). Dans notre étude ce protocole semble efficace pour retarder l'apparition de la CRC, mais il n'est pas applicable en clinique. Pour une application clinique, il faudrait réaliser l'injection des CSM à un stade avancé de la CRC. Dans notre modèle la phase tardive survient autours des 12 mois post-irradiation. Des mesures plus objectives pourraient permettre de mieux déterminer ce stade. Par exemple, la mesure de l'incontinence, qui est un symptôme clinique important, serait un bon indicateur. Quoi qu'il en soit une injection en phase tardive de la CRC signifierais de suivre l'évolution de la pathologie encore quelques mois après. Il en résulte une étude pouvant aller jusqu'à 2 ans après irradiation peu compatible avec un modèle de rat Sprague Dawley, leur durée de vie étant de 2,5 à 3,5 ans. De plus, ces animaux présentant de forts taux de tumeur mammaire spontanée augmentant avec l'âge entrainant le retrait des animaux de l'étude nécessitant des cohortes importantes. Il s'agit ici d'une contrainte inhérente des modèles murins.

Une autre possibilité est de réaliser des injections plus espacées dans le temps. Il a été démontré qu'une réinjection des CSM dans des CRC ou des CH récalcitrantes après une première injection permettaient une diminution significative dans les lésions. Nous pouvons émettre comme hypothèse que des injections entre 8 et 12 mois devraient entrainer un taux de guérison nettement supérieur.

II La méthode d'injection

Dans notre modèle nous avons choisi une injection par voie intraveineuse. L'inconvénient de cette méthode est le faible rendement de la migration des CSM dans le tissu lésé. L'injection des CSM directement dans le tissu permet une persistance plus longue des cellules. Ainsi des CSM ont été retrouvées jusqu'à 12 semaines après injection, localisée dans la lamina propria près de la lame basale de l'urothélium (Qiu et al. 2016; Song et al. 2015). De plus, une étude de Chung et al., de 2019 a démontré que cette méthode d'injection était plus efficace que les instillations transurétrales ou les injections intraveineuses (Chung et al. 2019). L'injection d'1 million de CSM dans la paroi de la vessie permettrait de potentialiser leurs effets. Cette injection se ferait sur plusieurs sites pour répartir la dose dans la vessie. Un volume total de 100µl maximum devrait être injecté, réparti par dose de 20µl afin d'éviter de créer des œdèmes. Deux méthodes sont envisageables pour réaliser ces injections. L'injection par voie extra vésicale ou intravésicale.

La voie extra-vésicale consiste, par chirurgie, à faire sortir la vessie de l'abdomen avant de réaliser l'injection en plusieurs points. Cette technique a plusieurs avantages. Elle est rapide, ne nécessite pas de matériel spécifique et n'induit pas de dégât sur l'urothélium. Cependant, elle nécessite une chirurgie délicate sur une paroi de la vessie potentiellement endommagée, ce qui peut être délétère.

La voie intravésicale consiste à l'introduction d'un cystoscope pour réaliser des images et des injections. Cette méthode sera possible avec l'acquisition de l'endoscope de 0,6mm, car il est équipé d'un canal opératoire de 0.15mm. Elle ne nécessite aucune intervention chirurgicale. Cette méthode a pour avantage de ne pas faire de chirurgie et peu nous donner des renseignements sur les éventuelles lésions vasculaires. De plus, cette méthode est très utilisée en clinique contrairement à la voie extra-vésicale. Cependant, elle nécessite l'achat de matériel et peut induire des lésions à l'urothélium pouvant biaiser les résultats.

Cependant, l'injection locale de CSM dans la paroi de la vessie peut provoquer des déstructurations du tissu en raison du volume injecté qui pourraient induire des dommages irréversibles sur un tissu irradié déjà très fragilisé. Pour exemple dans l'essai compassionnel d'Épinal, les chirurgiens ont refusé l'injection locale de CSM, car les tissus étaient trop dégradés pour une quelconque intervention. Dans notre modèle nous avons la volonté de ce

rapprocher au maximum des conditions cliniques et c'est pour cette raison que nous avons réalisé les injections par voies intraveineuses.

III Implantation des CSM dans le tissu irradié.

Les études précédentes du laboratoire ont montré un adressage des CSM aux tissus irradiés lorsqu'elles sont injectées par voie intraveineuse. Elles demeurent dans le tissu irradié pendant une à deux semaines (Chapel et al. 2003).

Une implantation précoce (après une semaine) et transitoire des CSM au niveau du côlon a été observée dans notre modèle. Lorsque les CSM expriment la GFP (Green Fluorescent Protein), elles sont retrouvées dans le compartiment conjonctif du côlon à 7 jours après la dernière. Des CSM-GFP sont localisées au niveau de la base des cryptes coliques. Ces résultats sont en accord avec Sémont et al., qui retrouvent dans l'intestin grêle après irradiation, des CSM-GFP dans la sous muqueuse et dans le mésentère près des vaisseaux pendant 7 jours (Semont et al. 2013). Même si la présence des CSM est transitoire, il semble que leur effet soit durable, en agrément avec l'étude François et al. 2019, montrant un effet d'inhibition de la cancérogenèse colorectale plus d'un an après injection des CSM. D'après les auteurs, les CSM modifient durablement le tissu irradié, probablement en agissant sur des cellules « résidentes » au niveau du microenvironnement irradié. Un des effecteurs pourrait-être le macrophage (Francois et al. 2019). Dans notre modèle, nous nous sommes focalisés sur l'effet des CSM, cependant dans un second temps nous rechercherons les CSM-GFP pour le temps 6 mois post-irradiation, car c'est le temps le plus probable pour retrouver les cellules injectées (15 jours après la troisième injection de CSM). D'autres études comme le suivis de la bio distribution des CSM (par des CSM luciférase positive) permettrait de déterminer après combien de temps les CSM migre vers la vessie et surtout de connaitre le temps ou les CSM restent dans la vessie.

IV Cotraitement

Nous avons étudié l'efficacité des CSM seule dans la CRC. Cependant, il semble pertinent que les CSM soient a un traitement pharmacologique dans une utilisation clinique.

Des co-traitements peuvent être envisagés pour maximiser l'effet des CSM. L'utilisation d'anti-inflammatoire est contre-indiquée, car elle peut induire un changement de polarité des CSM passant d'un profil antifibrosant et anti-inflammatoire à un profil pro-fibrosant et pro-inflammatoire (Almaawi et al. 2013; Muller et al. 2011). Divers traitements ont été utilisés en association avec les CSM, mais nous mettrons l'accent sur deux en particulier. Dans la CI l'utilisation du polysulfate de pentosan sodique a permis d'augmenter le taux de guérisons en participant à la régénération de l'urothélium. Cette action est due à la formation d'une couche de GAG protégeant l'urothélium et restaurant son imperméabilité (Kim et al. 2020). Dans les lésions radio induites du côlon, un traitement avec un inhibiteur de la perméabilité vasculaire a été réalisé. Ce co-traitement a permis de réduire la taille des ulcères (Monceau V 2017). Ces deux traitements sont prometteurs et n'interagiraient pas avec les actions des CSM, ce qui en fait des traitements prioritaires.

V Les CSM d'origine adipeux, la meilleure source des CSM ?

Les CSM d'origine adipeuse offrent de grands avantages par rapport aux autres localisations (dérivé de l'urine, hématopoïétique, pulpe dentaire, etc). Elles permettent un apport conséquent de CSM pour les cultures tout en ayant une extraction facilitée. De plus, en clinique, le prélèvement de la graisse est plus rapide, aisé et les patients rejettent moins cette méthode que le prélèvement de moelle osseuse. Cependant, il semble que les CSM d'origine adipeuse ne soient pas les plus efficaces. Dans la CI, les CSM dérivées des urines étaient plus efficaces que celles issue du tissu adipeux, du liquide amniotique et de la moelle osseuse. Ces observations s'expliquent par une capacité proliférative et une différenciation adipogène et endothéliale ainsi qu'un potentiel de vascularisation plus importante (Mohamed-Ahmed et al. 2018; Wu et al. 2018). L'utilisation d'iPS ou de cellules souches embryonnaires pourrait également être une alternative aux CSM. Ces cellules ont démontré une efficacité comparable aux CSM en agissant sur la régénération de l'urothélium (EGF et les voies AKT, mTOR, ERK et Wnt-GSK3β (Glycogen synthase kinase 3) / β-caténine) et sur les cellules musculaires lisses (Dayem et al. 2020).

VI Traitements innovants de la CRC

Le traitement de la CRC dépend du grade du patient et des symptômes à traiter.

Compte tenu de la complexité et du temps de mise en place d'un essai de thérapie cellulaire, le traitement par les CSM semble s'adresser à des patients de grade 3, réfractaire aux traitements conventionnels. Les CSM pour les traitements sont le plus souvent allogéniques, car les patients sont souvent âgés (>60 ans), il est donc nécessaire qu'ils aient des donneurs intrafamiliaux de CSM plus jeunes. Le fait d'avoir un donneur plus un receveur rend le processus plus complexe notamment pour les processus d'inclusions. Ces patients peuvent avoir des pathologies complexes ou des états de santé dégradés, qui peuvent les exclure de l'essai clinique.

Compte tenu des progrès très rapides des biothérapies, il est possible d'imaginer des stratégies thérapeutiques plus adaptées aux besoins des praticiens. Tout d'abord si des lots de CSM sont déjà qualifiés et congelés, qu'ils sont compatibles et en assez grandes quantités, prêts à l'emploi pour traiter des groupes patients, alors il est envisageable de pouvoir proposer aux médecins de traiter rapidement et facilement des individus à stades moins avancés de la CRC. À l'opposé, pour des patients à des stades de grade 3 ou 4, qui nécessiteraient une chirurgie comme une cystectomie partielle, l'utilisation de biomatériaux composés de patchs de cellules pouvant se placer sur un urothélium endommagé ou se substituer à une partie de la paroi de la vessie pourrait être envisagée dans le but de permettre la régénération de la vessie.

VII Traitement lors des premiers stades de la CRC

L'intérêt des CSM comme produit de thérapie cellulaire est la possibilité de les utiliser dans des traitements allogéniques en raison de leur faible pouvoir immunogénique. L'obtention de CSM du tissu adipeux ou du sang placentaire ou de la gelée de Wharton en fait une source peu invasive (Moroni and Fornasari 2013). Des médicaments de thérapies innovantes (MTI) provenant de CSM de moelle osseuse (Prochymal, Temcell) ou du tissu adipeux (Alofisel) sont disponibles au niveau européen (Mebarki et al. 2021).

Par leur effet trophique et leur pouvoir immunorégulateur, les CSM sont adaptés au traitement des séquelles chroniques des radiothérapies. Un médicament de thérapie innovant (MTI) basé sur CSM allogéniques issues du tissu adipeux ou du sang placentaire et prêt à l'emploi est une alternative pour le traitement de ces patients.

Une des limitations à leur utilisation dans des essais cliniques pour un large groupe de patients est la variabilité de l'efficacité des CSM en fonction des donneurs et des procédés de productions (Levy et al. 2020). Une seconde limite est la quantité de cellules à produire. Une forte expansion des CSM est nécessaire pour produire des quantités importantes de cellules, induisant une prolifération moins importante, une diminution de l'expression de marqueurs de surface et de la sénescence (Wagner et al. 2008). Au final, il semblerait que les CSM seraient moins « efficaces » pour un nombre de passages élevé, expliquant les difficultés des essais de phase 3 comme pour le produit Prochymal dans le traitement de la GVH (Galipeau 2013). Dans le cas de l'utilisation de MTI congelés prêts à l'emploi, une troisième limitation est que l'utilisation de CSM fraichement décongelée supprime une partie de l'activité biologique attendue comme la fonction immunosuppressive. Afin de supprimer ce problème, trois jours de culture après décongélation semblent nécessaires pour restaurer les propriétés des CSM (Lechanteur et al. 2016).

Une alternative pour contourner ces problèmes est d'utiliser des cellules pluripotentes, plus précisément de hiPSc. La constitution d'une banque d'hiPSC humaines de grade clinique peut être utilisée comme source « universelle », grâce au choix des donneurs sur la base de la sélection des triples homozygotes HLA A, B, DR. ainsi, la constitution de banques d'hiPSC de grades cliniques peut permettre, grâce aux choix des donneurs, d'être utilisées comme source de cellules souches pour la thérapie cellulaire allogénique. Les lignées cellulaires développées sont alors compatibles, avec un grand nombre d'individus (Taylor et al. 2012). Il est envisageable de dériver des CSM issues de banques hiPSC issues des donneurs « universels » permettant alors d'avoir des lots de CSM prêts à l'emploi pour un grand nombre de patients pour le traitement des séquelles chroniques de la radiothérapie, dont la cystite radique (Wang et al. 2021).

VIII Traitement lors des stades avancés de la CRC

Les biomatériaux pour la reconstruction de la paroi de la vessie peuvent être envisagés pour des CRC de grade 3 à 4, lorsque tous les traitements conventionnels ont échoué et qu'il est nécessaire d'avoir recours à une opération chirurgicale. Cependant le défi est élevé pour reconstituer la paroi de vessie en ce qui concerne la source de cellules, la nécessité de propriétés biomécaniques spécifiques de la vessie, plus la nécessité de recréer plusieurs tissus ainsi qu'une vascularisation et une innervation. Les biomatériaux utilisés sont soit des matrices décellularisées (intestin ou vessie), soit des biomatériaux, ou une combinaison des deux, colonisés par des cellules (Culenova et al. 2019; Hanczar et al. 2021). Cependant ces matrices sont souvent associées à des effets indésirables comme des contractures, des calcifications, des fibroses qui limitent leur utilisation clinique (Schaefer et al. 2013). Au final, cette approche thérapeutique s'adresse à peu de patients et ne semble pas pouvoir s'appliquer en clinique à court terme.

Bibliographie

Abo-Salem, O. M. (2013), 'Uroprotective effect of pentoxifylline in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats', *J Biochem Mol Toxicol,* 27 (7), 343-50.

Abreu, M. T., Fukata, M., and Arditi, M. (2005), 'TLR signaling in the gut in health and disease', *J Immunol,* 174 (8), 4453-60.

Aitken, K. J. and Bagli, D. J. (2009), 'The bladder extracellular matrix. Part I: architecture, development and disease', *Nat Rev Urol,* 6 (11), 596-611.

Alagiri, M., et al. (1997), 'Interstitial cystitis: unexplained associations with other chronic disease and pain syndromes', *Urology,* 49 (5A Suppl), 52-7.

Albulescu, R., et al. (2015), 'The secretome of myocardial telocytes modulates the activity of cardiac stem cells', *J Cell Mol Med,* 19 (8), 1783-94.

Alexander, J. S. and Elrod, J. W. (2002), 'Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation', *J Anat,* 200 (6), 561-74.

Almaawi, A., et al. (2013), 'Effect of acetaminophen and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on gene expression of mesenchymal stem cells', *Tissue Eng Part A,* 19 (7-8), 1039-46.

Anonymous (1995), 'LENT SOMA scales for all anatomic sites', *Int J Radiat Oncol Biol Phys,* 31 (5), 1049-91.

Anonymous (2012), 'Anticholinergic Agents', *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* (Bethesda (MD)).

Araujo, J. A., Zhang, M., and Yin, F. (2012), 'Heme oxygenase-1, oxidation, inflammation, and atherosclerosis', *Front Pharmacol,* 3, 119.

Aronsson-Kurttila, W., et al. (2018), 'Placenta-Derived Decidua Stromal Cells for Hemorrhagic Cystitis after Stem Cell Transplantation', *Acta Haematol,* 139 (2), 106-14.

Arthur, R. R., et al. (1986), 'Association of BK viruria with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants', *N Engl J Med,* 315 (4), 230-4.

Assoumanou, Moutawakilou Gomina and Akpona, Sa (2011), 'Dosage de l'hémoglobine urinaire par un réactif au 3,3'-diméthylbenzidine : mise au point technique', *International Journal of Biological and Chemical Sciences,* 5.

Atri, C., Guerfali, F. Z., and Laouini, D. (2018), 'Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases', *Int J Mol Sci,* 19 (6).

Auge, C., et al. (2013), 'Relevance of the cyclophosphamide-induced cystitis model for pharmacological studies targeting inflammation and pain of the bladder', *Eur J Pharmacol,* 707 (1-3), 32-40.

Baez-Jurado, E., et al. (2019), 'Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Protective Effects on Brain Pathologies', *Mol Neurobiol,* 56 (10), 6902-27.

Bearman, S. I., et al. (1988), 'Regimen-related toxicity in patients undergoing bone marrow transplantation', *J Clin Oncol,* 6 (10), 1562-8.

Bedard, K. and Krause, K. H. (2007), 'The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology', *Physiol Rev,* 87 (1), 245-313.

Bentzen, S. M. (2006), 'Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology', *Nat Rev Cancer,* 6 (9), 702-13.

Bentzen, S. M., et al. (1992), 'Fractionation sensitivity and latency of late radiation injury to the mouse urinary bladder', *Radiother Oncol,* 25 (4), 301-7.

Bernard, O., et al. (2018), 'Mesenchymal stem cells reduce hypoxia-induced apoptosis in alveolar epithelial cells by modulating HIF and ROS hypoxic signaling', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,* 314 (3), L360-L71.

Bessout, R., et al. (2015), 'TH17 predominant T-cell responses in radiation-induced bowel disease are modulated by treatment with adipose-derived mesenchymal stromal cells', *J Pathol,* 237 (4), 435-46.

Birder, L. A., Kanai, A. J., and de Groat, W. C. (1997), 'DMSO: effect on bladder afferent neurons and nitric oxide release', *J Urol,* 158 (5), 1989-95.

Block, G. J., et al. (2009), 'Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1', *Stem Cells,* 27 (3), 670-81.

Bonne, L., et al. (2017), 'Endovascular Management of Severe Arterial Haemorrhage After Radical Prostatectomy: A Case Series', *Cardiovasc Intervent Radiol,* 40 (11), 1698-705.

Bouchelouche, K. and Nordling, J. (2003), 'Recent developments in the management of interstitial cystitis', *Curr Opin Urol,* 13 (4), 309-13.

Brossard, Clément, et al. (2022), 'Understanding Molecular Mechanisms and Identifying Key Processes in Chronic Radiation Cystitis', *Int J Mol Sci,* 23 (3), 1836.

Brugieres, L., et al. (1989), 'Hemorrhagic cystitis following high-dose chemotherapy and bone marrow transplantation in children with malignancies: incidence, clinical course, and outcome', *J Clin Oncol,* 7 (2), 194-9.

Burleson, Lindsey, et al. (2019), 'PD20-01; Validation of an nimal model of pelvic radiation induced femle sexual and urinary dysfuction', *Journal of Urology,* 201 (Supplement 4), e376-e77.

Cahlon, O., Hunt, M., and Zelefsky, M. J. (2008), 'Intensity-modulated radiation therapy: supportive data for prostate cancer', *Semin Radiat Oncol,* 18 (1), 48-57.

Caplan, A. I. (1991), 'Mesenchymal stem cells', *J Orthop Res,* 9 (5), 641-50.

Caplan, A. I (2017), 'Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!', *Stem Cells Transl Med,* 6 (6), 1445-51.

Cardinal, J., et al. (2018), 'Scoping Review and Meta-analysis of Hyperbaric Oxygen Therapy for Radiation-Induced Hemorrhagic Cystitis', *Curr Urol Rep,* 19 (6), 38.

Castellon, X. and Bogdanova, V. (2016), 'Chronic Inflammatory Diseases and Endothelial Dysfunction', *Aging Dis,* 7 (1), 81-9.

Chapel, A., et al. (2003), 'Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome', *J Gene Med,* 5 (12), 1028-38.

Chapple, C. (2014), 'Chapter 2: Pathophysiology of neurogenic detrusor overactivity and the symptom complex of "overactive bladder"', *Neurourol Urodyn,* 33 Suppl 3, S6-13.

Chavda, B., et al. (2017), 'Antiproliferative factor (APF) binds specifically to sites within the cytoskeleton-associated protein 4 (CKAP4) extracellular domain', *BMC Biochem,* 18 (1), 13.

Chen, L., et al. (2018), 'Human Urine-Derived Stem Cells: Potential for Cell-Based Therapy of Cartilage Defects', *Stem Cells Int,* 2018, 4686259.

Chen, Y. T., et al. (2020), 'Long-term effect of extracorporeal shock wave therapy on attenuating radiation-induced chronic cystitis in rat', *Am J Transl Res,* 12 (3), 999-1015.

Chen, Y. T., et al. (2014), 'Melatonin treatment further improves adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for acute interstitial cystitis in rat', *J Pineal Res,* 57 (3), 248-61.

Chinnadurai, R., et al. (2015), 'Mesenchymal Stromal Cells Derived From Crohn's Patients Deploy Indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated Immune Suppression, Independent of Autophagy', *Mol Ther,* 23 (7), 1248-61.

Cho, J. G., et al. (2018), 'Endothelial to Mesenchymal Transition Represents a Key Link in the Interaction between Inflammation and Endothelial Dysfunction', *Front Immunol,* 9, 294.

Choi, D., et al. (2018), 'Downregulation of WNT11 is associated with bladder tissue fibrosis in patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome without Hunner lesion', *Sci Rep,* 8 (1), 9782.

Choi, H., et al. (2011), 'Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF-kappaB signaling in resident macrophages', *Blood,* 118 (2), 330-8.

Chung, J. W., et al. (2019), 'Verification of mesenchymal stem cell injection therapy for interstitial cystitis in a rat model', *PLoS One,* 14 (12), e0226390.

Chung, S. D., et al. (2011), 'Elevation of serum c-reactive protein in patients with OAB and IC/BPS implies chronic inflammation in the urinary bladder', *Neurourol Urodyn,* 30 (3), 417-20.

Citrin, D. E., et al. (2013), 'Role of type II pneumocyte senescence in radiation-induced lung fibrosis', *J Natl Cancer Inst,* 105 (19), 1474-84.

Claassen, M. A., et al. (2010), 'Abundant numbers of regulatory T cells localize to the liver of chronic hepatitis C infected patients and limit the extent of fibrosis', *J Hepatol,* 52 (3), 315-21.

Colemeadow, J., Sahai, A., and Malde, S. (2020), 'Clinical Management of Bladder Pain Syndrome/Interstitial Cystitis: A Review on Current Recommendations and Emerging Treatment Options', *Res Rep Urol,* 12, 331-43.

Comploj, E., et al. (2021), 'Transarterial Embolization in the Management of Intractable Haemorrhage', *Urol Int,* 105 (1-2), 95-99.

Corcione, A., et al. (2006), 'Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions', *Blood,* 107 (1), 367-72.

Corcoran, A. T., et al. (2013), 'Mapping the cytokine profile of painful bladder syndrome/interstitial cystitis in human bladder and urine specimens', *World J Urol,* 31 (1), 241-6.

Cox, P. J. (1979), 'Cyclophosphamide cystitis identification of acrolein as the causative agent', *Biochem Pharmacol,* 28 (13), 2045-9.

Cretoiu D, Vannucchi M.G, Bei Y, Manetti M, Faussone-Pellegrini M.S, Ibba-Manneschi L, Xiao J and Cretoiu S.M (2019), 'Telocytes: New Connecting Devices in the Stromal Space of Organs', *Innovations in Cell Research and Therapy*.

Cretoiu, D., et al. (2012), 'Telocytes, a distinct type of cell among the stromal cells present in the lamina propria of jejunum', *Histol Histopathol,* 27 (8), 1067-78.

Cretoiu, S. M. and Popescu, L. M. (2014), 'Telocytes revisited', *Biomol Concepts,* 5 (5), 353-69.

Crew, J. P., Jephcott, C. R., and Reynard, J. M. (2001), 'Radiation-induced haemorrhagic cystitis', *Eur Urol,* 40 (2), 111-23.

Crowe, R., et al. (1996), 'Radiation-induced changes in neuropeptides in the rat urinary bladder', *J Urol,* 156 (6), 2062-6.

Culenova, M., et al. (2019), 'Bioengineered Scaffolds as Substitutes for Grafts for Urethra Reconstruction', *Materials (Basel),* 12 (20).

Dai, C. and Liu, Y. (2004), 'Hepatocyte growth factor antagonizes the profibrotic action of TGF-beta1 in mesangial cells by stabilizing Smad transcriptional corepressor TGIF', *J Am Soc Nephrol,* 15 (6), 1402-12.

Dantas, A. C., et al. (2010), 'Protective effect of simvastatin in the cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats', *Acta Cir Bras,* 25 (1), 43-6.

Dayem, A. A., et al. (2020), 'Application of Adult and Pluripotent Stem Cells in Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome Therapy: Methods and Perspectives', *J Clin Med,* 9 (3).

De Berardinis, E., et al. (2005), 'Superselective embolization of bladder arteries in the treatment of intractable bladder haemorrhage', *Int J Urol,* 12 (5), 503-5.

de Windt, T. S., Vonk, L. A., and Saris, D. B. F. (2017), 'Response to: Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!', *Stem Cells Transl Med,* 6 (8), 1747-48.

Di Nicola, M., et al. (2002), 'Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli', *Blood,* 99 (10), 3838-43.

Dixon, J. S. and Gosling, J. A. (1983), 'Histology and fine structure of the muscularis mucosae of the human urinary bladder', *J Anat,* 136 (Pt 2), 265-71.

Dominici, M., et al. (2006), 'Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement', *Cytotherapy,* 8 (4), 315-7.

Dornelas-Filho, A. F., et al. (2018), 'Neutrophils contribute to the pathogenesis of hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide', *Int Immunopharmacol,* 62, 96-108.

Dorr, W. (1992), 'Cystometry in mice influence of bladder filling rate and circadian variations in bladder compliance', *J Urol,* 148 (1), 183-7.

Dorr, W. (1995), 'Impact of time between X-ray fractions on acute changes in the function of the urinary bladder in the mouse', *Radiat Res,* 141 (2), 219-22.

Dorr, W. and Schultz-Hector, S. (1992), 'Early changes in mouse urinary bladder function following fractionated X irradiation', *Radiat Res,* 131 (1), 35-42.

Dorr, W. and Kraft, M. (1997), 'Effects of ageing and X-irradiation on the diurnal rhythm of mouse urinary bladder capacity', *Urol Int,* 58 (3), 153-9.

Dorr, W. and Beck-Bornholdt, H. P. (1999), 'Radiation-induced impairment of urinary bladder function in mice: fine structure of the acute response and consequences on late effects', *Radiat Res,* 151 (4), 461-7.

Dorr, W. and Bentzen, S. M. (1999), 'Late functional response of mouse urinary bladder to fractionated X-irradiation', *Int J Radiat Biol,* 75 (10), 1307-15.

Dorr, W. and Hendry, J. H. (2001), 'Consequential late effects in normal tissues', *Radiother Oncol,* 61 (3), 223-31.

Driscoll, A. and Teichman, J. M. (2001), 'How do patients with interstitial cystitis present?', *J Urol,* 166 (6), 2118-20.

Droller, M. J., Saral, R., and Santos, G. (1982), 'Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis', *Urology,* 20 (3), 256-8.

Durand, C., et al. (2015), 'Persistent visceral allodynia in rats exposed to colorectal irradiation is reversed by mesenchymal stromal cell treatment', *Pain,* 156 (8), 1465-76.

Ejtehadifar, M., et al. (2015), 'The Effect of Hypoxia on Mesenchymal Stem Cell Biology', *Adv Pharm Bull,* 5 (2), 141-9.

Elbadawi, A. E. and Light, J. K. (1996), 'Distinctive ultrastructural pathology of nonulcerative interstitial cystitis: new observations and their potential significance in pathogenesis', *Urol Int,* 56 (3), 137-62.

Estes, J. D., et al. (2007), 'Simian immunodeficiency virus-induced lymphatic tissue fibrosis is mediated by transforming growth factor beta 1-positive regulatory T cells and begins in early infection', *J Infect Dis,* 195 (4), 551-61.

Faezi, M., et al. (2018), 'The membrane mesenchymal stem cell derived conditioned medium exerts neuroprotection against focal cerebral ischemia by targeting apoptosis', *J Chem Neuroanat,* 94, 21-31.

Faussone-Pellegrini, M. S. and Gherghiceanu, M. (2016), 'Telocyte's contacts', *Semin Cell Dev Biol,* 55, 3-8.

Feng, W., et al. (2009), 'IL-17 induces myocardial fibrosis and enhances RANKL/OPG and MMP/TIMP signaling in isoproterenol-induced heart failure', *Exp Mol Pathol,* 87 (3), 212-8.

Fowler, C. J., Griffiths, D., and de Groat, W. C. (2008), 'The neural control of micturition', *Nat Rev Neurosci,* 9 (6), 453-66.

Francois, S., et al. (2019), 'Mesenchymal Stem Cell Administration Attenuates Colon Cancer Progression by Modulating the Immune Component within the Colorectal Tumor Microenvironment', *Stem Cells Transl Med,* 8 (3), 285-300.

Friedenstein, A. J., Piatetzky, Shapiro, II, and Petrakova, K. V. (1966), 'Osteogenesis in transplants of bone marrow cells', *J Embryol Exp Morphol,* 16 (3), 381-90.

Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., and Gerasimov, U. V. (1987), 'Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers', *Cell Tissue Kinet,* 20 (3), 263-72.

Fry, C. H. and Vahabi, B. (2016), 'The Role of the Mucosa in Normal and Abnormal Bladder Function', *Basic Clin Pharmacol Toxicol,* 119 Suppl 3, 57-62.

Fry, C. H., et al. (2018), 'Fibrosis and the bladder, implications for function ICI-RS 2017', *Neurourol Urodyn,* 37 (S4), S7-S12.

Furuta, A., et al. (2018), 'Bladder wall injection of mesenchymal stem cells ameliorates bladder inflammation, overactivity, and nociception in a chemically induced interstitial cystitis-like rat model', *Int Urogynecol J,* 29 (11), 1615-22.

Galipeau, J. (2013), 'The mesenchymal stromal cells dilemma does a negative phase III trial of random donor mesenchymal stromal cells in steroid-resistant graft-versus-host disease represent a death knell or a bump in the road?', *Cytotherapy,* 15 (1), 2-8.

Gallego-Vilar, D., et al. (2013), 'Maintenance of the response to dimethyl sulfoxide treatment using hyperbaric oxygen in interstitial cystitis/painful bladder syndrome: a prospective, randomized, comparative study', *Urol Int,* 90 (4), 411-6.

Garcia-Arranz, M., et al. (2020), 'Two phase I/II clinical trials for the treatment of urinary incontinence with autologous mesenchymal stem cells', *Stem Cells Transl Med*, 9 (12), 1500-08.

Garcia-Bernal, D., et al. (2021), 'The Current Status of Mesenchymal Stromal Cells: Controversies, Unresolved Issues and Some Promising Solutions to Improve Their Therapeutic Efficacy', *Front Cell Dev Biol*, 9, 650664.

Ge, Q., et al. (2018), 'VEGF secreted by mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanisms', *Mol Med Rep*, 17 (1), 1667-75.

Georg, P., et al. (2013), 'Time course of late rectal- and urinary bladder side effects after MRI-guided adaptive brachytherapy for cervical cancer', *Strahlenther Onkol*, 189 (7), 535-40.

Gerretsen, P. and Pollock, B. G. (2011), 'Drugs with anticholinergic properties: a current perspective on use and safety', *Expert Opin Drug Saf*, 10 (5), 751-65.

Gevaert, T., et al. (2012), 'Identification of telocytes in the upper lamina propria of the human urinary tract', *J Cell Mol Med*, 16 (9), 2085-93.

Gevaert, T., et al. (2011), 'Characterization of upper lamina propria interstitial cells in bladders from patients with neurogenic detrusor overactivity and bladder pain syndrome', *J Cell Mol Med*, 15 (12), 2586-93.

Gevaert, T., et al. (2015), 'Morphometric and quantitative immunohistochemical analysis of disease-related changes in the upper (suburothelial) lamina propria of the human bladder dome', *PLoS One*, 10 (5), e0127020.

Gieseke, F., et al. (2013), 'Proinflammatory stimuli induce galectin-9 in human mesenchymal stromal cells to suppress T-cell proliferation', *Eur J Immunol*, 43 (10), 2741-9.

Giglio, D., et al. (2016), 'Downregulation of toll-like receptor 4 and IL-6 following irradiation of the rat urinary bladder', *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 43 (7), 698-705.

Gong, W., et al. (2016), 'Mesenchymal stem cells stimulate intestinal stem cells to repair radiation-induced intestinal injury', *Cell Death Dis*, 7 (9), e2387.

Gonzalez, D. M. and Medici, D. (2014), 'Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition', *Sci Signal*, 7 (344), re8.

Gorbunov, N. V., et al. (2013), 'Adaptive redox response of mesenchymal stromal cells to stimulation with lipopolysaccharide inflammagen: mechanisms of remodeling of tissue barriers in sepsis', *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 186795.

Gross, L. and Dreyfuss, Y. (1979), 'Spontaneous tumors in Sprague-Dawley and Long-Evans rats and in their F1 hybrids: carcinogenic effect of total-body x-irradiation', *Proc Natl Acad Sci U S A,* 76 (11), 5910-3.

Gu, W., et al. (2017), 'Mesenchymal stem cells and vascular regeneration', *Microcirculation,* 24 (1).

Guillamat-Prats, R. (2021), 'The Role of MSC in Wound Healing, Scarring and Regeneration', *Cells,* 10 (7).

Guipaud, O., et al. (2018), 'The importance of the vascular endothelial barrier in the immune-inflammatory response induced by radiotherapy', *Br J Radiol,* 91 (1089), 20170762.

Han, Y., et al. (2019), 'Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine', *Cells,* 8 (8).

Hanczar, M., Moazen, M., and Day, R. (2021), 'The Significance of Biomechanics and Scaffold Structure for Bladder Tissue Engineering', *Int J Mol Sci,* 22 (23).

Hanno, P. M. and Sant, G. R. (2001), 'Clinical highlights of the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases/Interstitial Cystitis Association scientific conference on interstitial cystitis', *Urology,* 57 (6 Suppl 1), 2-6.

Harms-Ringdahl, M., Nicotera, P., and Radford, I. R. (1996), 'Radiation induced apoptosis', *Mutat Res,* 366 (2), 171-9.

Hashi, C. K., et al. (2007), 'Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts', *Proc Natl Acad Sci U S A,* 104 (29), 11915-20.

Haynesworth, S. E., Baber, M. A., and Caplan, A. I. (1996), 'Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha', *J Cell Physiol,* 166 (3), 585-92.

He, S. and Walls, A. F. (1997), 'Human mast cell tryptase: a stimulus of microvascular leakage and mast cell activation', *Eur J Pharmacol,* 328 (1), 89-97.

Helissey, C., et al. (2020), 'Chronic Inflammation and Radiation-Induced Cystitis: Molecular Background and Therapeutic Perspectives', *Cells,* 10 (1).

Heppner, T. J., et al. (2011), 'Unique properties of muscularis mucosae smooth muscle in guinea pig urinary bladder', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,* 301 (2), R351-62.

Herzog, E. L., Chai, L., and Krause, D. S. (2003), 'Plasticity of marrow-derived stem cells', *Blood,* 102 (10), 3483-93.

Hicks, R. M. (1975), 'The mammalian urinary bladder: an accommodating organ', *Biol Rev Camb Philos Soc,* 50 (2), 215-46.

Hoang, Ly T. N., Ajay, Divya, and Westney, O. Lenaine (2019), 'Consequences of Pelvic Radiotherapy on Urinary Function in Women', *Current Bladder Dysfunction Reports,* 14 (4), 280-87.

Hobisch, A., et al. (2000), 'Quality of life after cystectomy and orthotopic neobladder versus ileal conduit urinary diversion', *World J Urol,* 18 (5), 338-44.

Homma, Y., et al. (2016), 'Clinical guidelines for interstitial cystitis and hypersensitive bladder updated in 2015', *Int J Urol,* 23 (7), 542-9.

Honczarenko, M., et al. (2006), 'Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors', *Stem Cells,* 24 (4), 1030-41.

Hu, C. H., et al. (2019), 'Bone marrow concentrate-induced mesenchymal stem cell conditioned medium facilitates wound healing and prevents hypertrophic scar formation in a rabbit ear model', *Stem Cell Res Ther,* 10 (1), 275.

Hu, C. J., et al. (2003a), 'Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation', *Mol Cell Biol,* 23 (24), 9361-74.

Hu, V. Y., et al. (2003b), 'COX-2 and prostanoid expression in micturition pathways after cyclophosphamide-induced cystitis in the rat', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,* 284 (2), R574-85.

Huang, N. F. and Li, S. (2008), 'Mesenchymal stem cells for vascular regeneration', *Regen Med,* 3 (6), 877-92.

Huang, X., et al. (2007), 'GM-CSF inhibits apoptosis of neural cells via regulating the expression of apoptosis-related proteins', *Neurosci Res,* 58 (1), 50-7.

Hung, S. C., et al. (2007), 'Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis', *Stem Cells,* 25 (9), 2363-70.

Hurst, R. E. (1994), 'Structure, function, and pathology of proteoglycans and glycosaminoglycans in the urinary tract', *World J Urol,* 12 (1), 3-10.

Hurst, R. E., et al. (2015), 'Increased bladder permeability in interstitial cystitis/painful bladder syndrome', *Transl Androl Urol,* 4 (5), 563-71.

Hurst, R. E., et al. (2016), 'In the absence of overt urothelial damage, chondroitinase ABC digestion of the GAG layer increases bladder permeability in ovariectomized female rats', *Am J Physiol Renal Physiol,* 310 (10), F1074-80.

Ikeda, Y., et al. (2018), 'Relaxin-2 therapy reverses radiation-induced fibrosis and restores bladder function in mice', *Neurourol Urodyn,* 37 (8), 2441-51.

INCA (Février 2019), *Institut National du Cancer: Les cancers en France en 2018 - L'essentiel des faits et chiffres (édition 2019)* (Edition 2019; France: Institut national du cancer) 28.

Ito, T., et al. (2007), 'Recent trends in patient characteristics and therapeutic choices for interstitial cystitis: analysis of 282 Japanese patients', *Int J Urol,* 14 (12), 1068-70.

Jaal, J. and Dorr, W. (2006a), 'Radiation induced late damage to the barrier function of small blood vessels in mouse bladder', *J Urol,* 176 (6 Pt 1), 2696-700.

Jaal, J. and Dorr, W. (2006b), 'Radiation induced inflammatory changes in the mouse bladder: the role of cyclooxygenase-2', *J Urol,* 175 (4), 1529-33.

Jaal, J. and Dorr, W. (2006c), 'Radiation-induced damage to mouse urothelial barrier', *Radiother Oncol,* 80 (2), 250-6.

Jaal, J. and Dorr, W. (2007), 'Effect of recombinant human keratinocyte growth factor (rHuKGF, Palifermin) on radiation-induced mouse urinary bladder dysfunction', *Int J Radiat Oncol Biol Phys,* 69 (2), 528-33.

Jaal, J. and Dorr, W. (2010), 'Radiation effects on cellularity, proliferation and EGFR expression in mouse bladder urothelium', *Radiat Res,* 173 (4), 479-85.

Jaal, J., et al. (2004), 'Radiation-induced variations in urothelial expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1): association with changes in urinary bladder function', *Int J Radiat Biol,* 80 (1), 65-72.

Jaillet, C., et al. (2017), 'Radiation-induced changes in the glycome of endothelial cells with functional consequences', *Sci Rep,* 7 (1), 5290.

Jeelani, R., et al. (2017), 'Cyclophosphamide and acrolein induced oxidative stress leading to deterioration of metaphase II mouse oocyte quality', *Free Radic Biol Med,* 110, 11-18.

Ji, J. F., et al. (2004), 'Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury', *Stem Cells,* 22 (3), 415-27.

Ji, R. R., Xu, Z. Z., and Gao, Y. J. (2014), 'Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain', *Nat Rev Drug Discov,* 13 (7), 533-48.

Jiang, Y. H., et al. (2013), 'Increased pro-inflammatory cytokines, C-reactive protein and nerve growth factor expressions in serum of patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome', *PLoS One,* 8 (10), e76779.

Johnson, L. D. V., Pickard, M. R., and Johnson, W. E. B. (2021), 'The Comparative Effects of Mesenchymal Stem Cell Transplantation Therapy for Spinal Cord Injury in Humans and Animal Models: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Biology (Basel),* 10 (3).

Kaviratne, M., et al. (2004), 'IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent', *J Immunol,* 173 (6), 4020-9.

Keating, A. (2008), 'How do mesenchymal stromal cells suppress T cells?', *Cell Stem Cell,* 2 (2), 106-8.

Keay, S., et al. (1999), 'Antiproliferative activity is present in bladder but not renal pelvic urine from interstitial cystitis patients', *J Urol,* 162 (4), 1487-9.

Keay, S. K., Birder, L. A., and Chai, T. C. (2014), 'Evidence for bladder urothelial pathophysiology in functional bladder disorders', *Biomed Res Int,* 2014, 865463.

Kelleher, C., et al. (2018), 'Efficacy and Tolerability of Mirabegron Compared with Antimuscarinic Monotherapy or Combination Therapies for Overactive Bladder: A Systematic Review and Network Meta-analysis', *Eur Urol,* 74 (3), 324-33.

Kemal Ozbilgin and Caner Aktas, Merve Temel, Tuna Önal, Elgin Türköz Uluer, H Seda Vatansever, Cengiz Kurtman (January 4 2016), 'POMC expression of the urothelium of the urinary bladder of mice submitted to pelvic radiation', *European journal of Inflammation,* Volume 14 (1), 34-39.

Kim, A., Shin, D. M., and Choo, M. S. (2016a), 'Stem Cell Therapy for Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome', *Curr Urol Rep,* 17 (1), 1.

Kim, A., et al. (2016b), 'Mesenchymal stem cells protect against the tissue fibrosis of ketamine-induced cystitis in rat bladder', *Sci Rep,* 6, 30881.

Kim, A., et al. (2017), 'Improved efficacy and in vivo cellular properties of human embryonic stem cell derivative in a preclinical model of bladder pain syndrome', *Sci Rep,* 7 (1), 8872.

Kim, B. S., et al. (2020), 'Efficacy of combination therapy with pentosan polysulfate sodium and adipose tissue-derived stem cells for the management of interstitial cystitis in a rat model', *Stem Cell Res,* 45, 101801.

Kim, D. H., et al. (2005), 'Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell', *Cytokine,* 31 (2), 119-26.

Kim, K. S., et al. (2014), 'Characterization of DNA damage-induced cellular senescence by ionizing radiation in endothelial cells', *Int J Radiat Biol,* 90 (1), 71-80.

Kinnaird, T., et al. (2004), 'Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms', *Circ Res,* 94 (5), 678-85.

Kitta, K., et al. (2003), 'Hepatocyte growth factor induces GATA-4 phosphorylation and cell survival in cardiac muscle cells', *J Biol Chem,* 278 (7), 4705-12.

Klingberg, F., Hinz, B., and White, E. S. (2013), 'The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis', *J Pathol,* 229 (2), 298-309.

Klyushnenkova, E., et al. (2005), 'T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression', *J Biomed Sci,* 12 (1), 47-57.

Knowles, J. F. (1985), 'Radiation-induced hydronephrosis in the rat: a new experimental model', *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med,* 48 (5), 737-44.

Ko, J. H., et al. (2016), 'Mesenchymal stem/stromal cells precondition lung monocytes/macrophages to produce tolerance against allo- and autoimmunity in the eye', *Proc Natl Acad Sci U S A,* 113 (1), 158-63.

Kohler, M., Michel, C., and Zimmermann, A. (1995), 'Histological changes after fractionated whole or partial irradiation of the rabbit urinary bladder', *Acta Oncol,* 34 (2), 199-204.

Kohler, M., et al. (1992), 'Urination frequency and cystic pressure resistance after fractionated whole or partial irradiation of the rabbit urinary bladder', *Acta Oncol,* 31 (6), 673-7.

Korkmaz, A., Topal, T., and Oter, S. (2007), 'Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation', *Cell Biol Toxicol,* 23 (5), 303-12.

Kotsianidis, I., et al. (2009), 'Global impairment of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in idiopathic pulmonary fibrosis', *Am J Respir Crit Care Med,* 179 (12), 1121-30.

Kowaliuk, J., et al. (2020), 'Translational Aspects of Nuclear Factor-Kappa B and Its Modulation by Thalidomide on Early and Late Radiation Sequelae in Urinary Bladder Dysfunction', *Int J Radiat Oncol Biol Phys,* 107 (2), 377-85.

Koziol, J. A., et al. (1993), 'The natural history of interstitial cystitis: a survey of 374 patients', *J Urol,* 149 (3), 465-9.

Kraft, M., et al. (1996), 'Radiation-induced changes in transforming growth factor beta and collagen expression in the murine bladder wall and its correlation with bladder function', *Radiat Res,* 146 (6), 619-27.

Kreft, M. E., et al. (2009a), 'Apical plasma membrane traffic in superficial cells of bladder urothelium', *Ann N Y Acad Sci*, 1152, 18-29.

Kreft, M. E., et al. (2009b), 'Endocytotic activity of bladder superficial urothelial cells is inversely related to their differentiation stage', *Differentiation*, 77 (1), 48-59.

Kreft, M. E., et al. (2010), 'Formation and maintenance of blood-urine barrier in urothelium', *Protoplasma*, 246 (1-4), 3-14.

Krischak, A., et al. (2021), 'Effect of irradiation on the expression of E-cadherin and beta-catenin in early and late radiation sequelae of the urinary bladder and its modulation by NF-kappaB inhibitor thalidomide', *Strahlenther Onkol*, 197 (6), 537-46.

Kudo, K., et al. (2010), 'Transplantation of mesenchymal stem cells to prevent radiation-induced intestinal injury in mice', *J Radiat Res*, 51 (1), 73-9.

Kwon, H. M., et al. (2014), 'Multiple paracrine factors secreted by mesenchymal stem cells contribute to angiogenesis', *Vascul Pharmacol*, 63 (1), 19-28.

Lai, M. C., Kuo, Y. C., and Kuo, H. C. (2013), 'Intravesical hyaluronic acid for interstitial cystitis/painful bladder syndrome: a comparative randomized assessment of different regimens', *Int J Urol*, 20 (2), 203-7.

Lane, Z. and Epstein, J. I. (2008), 'Pseudocarcinomatous epithelial hyperplasia in the bladder unassociated with prior irradiation or chemotherapy', *Am J Surg Pathol*, 32 (1), 92-7.

Le Blanc, K. and Davies, L. C. (2015), 'Mesenchymal stromal cells and the innate immune response', *Immunol Lett*, 168 (2), 140-6.

Lechanteur, C., et al. (2016), 'Clinical-scale expansion of mesenchymal stromal cells: a large banking experience', *J Transl Med*, 14 (1), 145.

Lee, G., Romih, R., and Zupancic, D. (2014), 'Cystitis: from urothelial cell biology to clinical applications', *Biomed Res Int*, 2014, 473536.

Lee, S. W., et al. (2018), 'The Therapeutic Effect of Human Embryonic Stem Cell-Derived Multipotent Mesenchymal Stem Cells on Chemical-Induced Cystitis in Rats', *Int Neurourol J*, 22 (Suppl 1), S34-45.

Levy, O., et al. (2020), 'Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies', *Sci Adv*, 6 (30), eaba6884.

Lewis, S. A. (2000), 'Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask', *Am J Physiol Renal Physiol*, 278 (6), F867-74.

Li, B., et al. (2017a), 'Hypoxia-Induced Mesenchymal Stromal Cells Exhibit an Enhanced Therapeutic Effect on Radiation-Induced Lung Injury in Mice due to an Increased

Proliferation Potential and Enhanced Antioxidant Ability', *Cell Physiol Biochem,* 44 (4), 1295-310.

Li, C., et al. (2021a), 'Allogeneic vs. autologous mesenchymal stem/stromal cells in their medication practice', *Cell Biosci,* 11 (1), 187.

Li, D. Y., et al. (2021b), 'Mesenchymal stem cell therapy in pulmonary fibrosis: a meta-analysis of preclinical studies', *Stem Cell Res Ther,* 12 (1), 461.

Li, J., et al. (2017b), 'Therapeutic effect of urine-derived stem cells for protamine/lipopolysaccharide-induced interstitial cystitis in a rat model', *Stem Cell Res Ther,* 8 (1), 107.

Lin, J. H., et al. (1994), 'Precursor sequence, processing, and urothelium-specific expression of a major 15-kDa protein subunit of asymmetric unit membrane', *J Biol Chem,* 269 (3), 1775-84.

Linard, C., et al. (2013), 'Repeated autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell injections improve radiation-induced proctitis in pigs', *Stem Cells Transl Med,* 2 (11), 916-27.

Linder, B. J., Tarrell, R. F., and Boorjian, S. A. (2014), 'Cystectomy for refractory hemorrhagic cystitis: contemporary etiology, presentation and outcomes', *J Urol,* 192 (6), 1687-92.

Liu, B., et al. (2018), 'Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells conditioned medium attenuate interstitial fibrosis and stimulate the repair of tubular epithelial cells in an irreversible model of unilateral ureteral obstruction', *Nephrology (Carlton),* 23 (8), 728-36.

Liu, H. T., et al. (2012), 'Differences in mast cell infiltration, E-cadherin, and zonula occludens-1 expression between patients with overactive bladder and interstitial cystitis/bladder pain syndrome', *Urology,* 80 (1), 225 e13-8.

Liu, K. M., et al. (2015), 'Ketamine-induced ulcerative cystitis and bladder apoptosis involve oxidative stress mediated by mitochondria and the endoplasmic reticulum', *Am J Physiol Renal Physiol,* 309 (4), F318-31.

Liu, Y. (1999), 'Hepatocyte growth factor promotes renal epithelial cell survival by dual mechanisms', *Am J Physiol,* 277 (4), F624-33.

Liu, Y. (2004), 'Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action', *Am J Physiol Renal Physiol,* 287 (1), F7-16.

Liu, Y. (2010), 'New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis', *J Am Soc Nephrol,* 21 (2), 212-22.

Lundbeck, F., Ulso, N., and Overgaard, J. (1989a), 'Cystometric evaluation of early and late irradiation damage to the mouse urinary bladder', *Radiother Oncol,* 15 (4), 383-92.

Lundbeck, F., Djurhuus, J. C., and Vaeth, M. (1989b), 'Bladder filling in mice: an experimental in vivo model to evaluate the reservoir function of the urinary bladder in a long term study', *J Urol,* 141 (5), 1245-9.

Luo, H., et al. (2020), 'Protective effect of nitronyl nitroxide against hypoxia-induced damage in PC12 cells', *Biochem Cell Biol,* 98 (3), 345-53.

Luz-Crawford, P., et al. (2016), 'Mesenchymal Stem Cell-Derived Interleukin 1 Receptor Antagonist Promotes Macrophage Polarization and Inhibits B Cell Differentiation', *Stem Cells,* 34 (2), 483-92.

Macrin, D., et al. (2017), 'Eminent Sources of Adult Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Imminence', *Stem Cell Rev Rep,* 13 (6), 741-56.

Majumdar, M. K., et al. (1998), 'Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells', *J Cell Physiol,* 176 (1), 57-66.

Manole, C. G., et al. (2011), 'Experimental acute myocardial infarction: telocytes involvement in neo-angiogenesis', *J Cell Mol Med,* 15 (11), 2284-96.

Marcu, I., Campian, E. C., and Tu, F. F. (2018), 'Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome', *Semin Reprod Med,* 36 (2), 123-35.

Martin, S. E., et al. (2019), 'Incidence and Morbidity of Radiation-Induced Hemorrhagic Cystitis in Prostate Cancer', *Urology,* 131, 190-95.

Mathieu, R., et al. (2014), 'Nomograms to predict late urinary toxicity after prostate cancer radiotherapy', *World J Urol,* 32 (3), 743-51.

Matsumoto, K. and Nakamura, T. (1993), 'Roles of HGF as a pleiotropic factor in organ regeneration', *EXS,* 65, 225-49.

Matsumoto, K., et al. (2007), 'Expression of S100A2 and S100A4 predicts for disease progression and patient survival in bladder cancer', *Urology,* 70 (3), 602-7.

Mebarki, M., et al. (2021), 'Development of a human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cell-based advanced therapy medicinal product to treat immune and/or inflammatory diseases', *Stem Cell Res Ther,* 12 (1), 571.

Meisel, R., et al. (2004), 'Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation', *Blood,* 103 (12), 4619-21.

Melief, S. M., et al. (2013), 'Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6', *Haematologica,* 98 (6), 888-95.

Michiels, C. (2003), 'Endothelial cell functions', *J Cell Physiol,* 196 (3), 430-43.

Milliat, F. and Francois, A. (2018), '[The roles of mast cells in radiation-induced damage are still an enigma]', *Med Sci (Paris),* 34 (2), 145-54.

Milliat, F., et al. (2008), '[Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages]', *Ann Cardiol Angeiol (Paris),* 57 (3), 139-48.

Milosavljevic, N., et al. (2018), 'Mesenchymal stem cells attenuate liver fibrosis by suppressing Th17 cells - an experimental study', *Transpl Int,* 31 (1), 102-15.

Minsky, B. D. and Chlapowski, F. J. (1978), 'Morphometric analysis of the translocation of lumenal membrane between cytoplasm and cell surface of transitional epithelial cells during the expansion-contraction cycles of mammalian urinary bladder', *J Cell Biol,* 77 (3), 685-97.

Mintet, E., et al. (2015), 'Identification of Endothelial-to-Mesenchymal Transition as a Potential Participant in Radiation Proctitis', *Am J Pathol,* 185 (9), 2550-62.

Mithal, N. P. and Hoskin, P. J. (1993), 'External beam radiotherapy for carcinoma of the prostate: a retrospective study', *Clin Oncol (R Coll Radiol),* 5 (5), 297-301.

Mizuno, S., et al. (2005), 'HGF reduces advancing lung fibrosis in mice: a potential role for MMP-dependent myofibroblast apoptosis', *FASEB J,* 19 (6), 580-2.

Mohamed-Ahmed, S., et al. (2018), 'Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison', *Stem Cell Res Ther,* 9 (1), 168.

Molla, M. and Panes, J. (2007), 'Radiation-induced intestinal inflammation', *World J Gastroenterol,* 13 (22), 3043-6.

Monceau V, Demarquay C, Accarie A, Moussa L, Doix B, Benderitter M, Sémont A, Mathieu N (2017), 'PO-0955: Co-treatment of MSC and vascular permeability inhibitor reduces radiation side effects on the colon,' *Radiotherapy and Oncology,* 23, S528.

Moroni, L. and Fornasari, P. M. (2013), 'Human mesenchymal stem cells: a bank perspective on the isolation, characterization and potential of alternative sources for the regeneration of musculoskeletal tissues', *J Cell Physiol,* 228 (4), 680-7.

Mukanyangezi, M. F., et al. (2019), 'Radiation induces changes in toll-like receptors of the uterine cervix of the rat', *PLoS One,* 14 (4), e0215250.

Muller, M., et al. (2011), 'Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on proliferation, differentiation and migration in equine mesenchymal stem cells', *Cell Biol Int,* 35 (3), 235-48.

Muraoka, Y., et al. (1977), '[Spontaneous tumors in aged SD-JCL rats (author's transl)]', *Jikken Dobutsu,* 26 (1), 13-22.

Nasef, A., et al. (2007), 'Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells', *Gene Expr,* 13 (4-5), 217-26.

Neemuchwala, F., Ahmed, F., and Nasr, S. Z. (2017), 'Prevalence of Pelvic Incontinence in Patients With Cystic Fibrosis', *Glob Pediatr Health,* 4, 2333794X17743424.

Negrete, H. O., et al. (1996), 'Permeability properties of the intact mammalian bladder epithelium', *Am J Physiol,* 271 (4 Pt 2), F886-94.

Nemeth, K., et al. (2009), 'Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production', *Nat Med,* 15 (1), 42-9.

Netsch, P., et al. (2018), 'Human mesenchymal stromal cells inhibit platelet activation and aggregation involving CD73-converted adenosine', *Stem Cell Res Ther,* 9 (1), 184.

Newby, D. E., et al. (1999), 'Substance P-induced vasodilatation is mediated by the neurokinin type 1 receptor but does not contribute to basal vascular tone in man', *Br J Clin Pharmacol,* 48 (3), 336-44.

Oh, C. W., et al. (2001), 'Induction of a senescence-like phenotype in bovine aortic endothelial cells by ionizing radiation', *Radiat Res,* 156 (3), 232-40.

Ohab, J. J., et al. (2006), 'A neurovascular niche for neurogenesis after stroke', *J Neurosci,* 26 (50), 13007-16.

Okada, T., et al. (2019), 'FGF-2 Attenuates Neuronal Apoptosis via FGFR3/PI3k/Akt Signaling Pathway After Subarachnoid Hemorrhage', *Mol Neurobiol,* 56 (12), 8203-19.

Oscarsson, N., et al. (2017), 'Hyperbaric oxygen treatment reverses radiation induced pro-fibrotic and oxidative stress responses in a rat model', *Free Radic Biol Med,* 103, 248-55.

Oscarsson, N., et al. (2019), 'Radiation-induced cystitis treated with hyperbaric oxygen therapy (RICH-ART): a randomised, controlled, phase 2-3 trial', *Lancet Oncol,* 20 (11), 1602-14.

Ozbilgin, M. K., et al. (2016a), 'Influence of Radiation Exposure During Radiotherapy. Evidence for the Increase of Versican and Heparin-Binding EGF-like Growth Factor Concentrations', *Anal Quant Cytopathol Histpathol*, 38 (2), 126-32.

Ozbilgin, M. K., et al. (2016b), 'Effects of Cyclooxygenase on the Urothelium of the Urinary Bladder of Mice Exposed to Pelvic Radiation', *Anal Quant Cytopathol Histpathol*, 38 (2), 103-10.

Pachori, A. S., et al. (2007), 'Heme-oxygenase-1-induced protection against hypoxia/reoxygenation is dependent on biliverdin reductase and its interaction with PI3K/Akt pathway', *J Mol Cell Cardiol*, 43 (5), 580-92.

Palomaki, S., et al. (2013), 'HIF-1alpha is upregulated in human mesenchymal stem cells', *Stem Cells*, 31 (9), 1902-9.

Pan, J., et al. (2017), 'Inhibition of Bcl-2/xl With ABT-263 Selectively Kills Senescent Type II Pneumocytes and Reverses Persistent Pulmonary Fibrosis Induced by Ionizing Radiation in Mice', *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 99 (2), 353-61.

Paner, G. P., et al. (2007), 'Further characterization of the muscle layers and lamina propria of the urinary bladder by systematic histologic mapping: implications for pathologic staging of invasive urothelial carcinoma', *Am J Surg Pathol*, 31 (9), 1420-9.

Paner, G. P., et al. (2009), 'Diagnostic utility of antibody to smoothelin in the distinction of muscularis propria from muscularis mucosae of the urinary bladder: a potential ancillary tool in the pathologic staging of invasive urothelial carcinoma', *Am J Surg Pathol*, 33 (1), 91-8.

Panganiban, R. A., Mungunsukh, O., and Day, R. M. (2013), 'X-irradiation induces ER stress, apoptosis, and senescence in pulmonary artery endothelial cells', *Int J Radiat Biol*, 89 (8), 656-67.

Park, S. J., et al. (2014), 'Interaction of mesenchymal stem cells with fibroblast-like synoviocytes via cadherin-11 promotes angiogenesis by enhanced secretion of placental growth factor', *J Immunol*, 192 (7), 3003-10.

Parsons, C. L. (2011), 'The role of a leaky epithelium and potassium in the generation of bladder symptoms in interstitial cystitis/overactive bladder, urethral syndrome, prostatitis and gynaecological chronic pelvic pain', *BJU Int*, 107 (3), 370-5.

Parsons, C. L., Zupkas, P., and Parsons, J. K. (2001), 'Intravesical potassium sensitivity in patients with interstitial cystitis and urethral syndrome', *Urology*, 57 (3), 428-32; discussion 32-3.

Parsons, C. L., et al. (1994), 'Abnormal sensitivity to intravesical potassium in interstitial cystitis and radiation cystitis', *Neurourol Urodyn,* 13 (5), 515-20.

Parsons, C. L., et al. (2005), 'Abnormal urinary potassium metabolism in patients with interstitial cystitis', *J Urol,* 173 (4), 1182-5.

Pascoe, C., et al. (2019), 'Current management of radiation cystitis: a review and practical guide to clinical management', *BJU Int,* 123 (4), 585-94.

Patnaik, S. S., et al. (2017), 'Etiology, pathophysiology and biomarkers of interstitial cystitis/painful bladder syndrome', *Arch Gynecol Obstet,* 295 (6), 1341-59.

Paunescu, V., et al. (2007), 'In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage', *J Cell Mol Med,* 11 (3), 502-8.

Pavathuparambil Abdul Manaph, N., et al. (2018), 'Urine-derived cells for human cell therapy', *Stem Cell Res Ther,* 9 (1), 189.

Peeker, R., et al. (2000), 'Recruitment, distribution and phenotypes of mast cells in interstitial cystitis', *J Urol,* 163 (3), 1009-15.

Persu, C., et al. (2010), 'From interstitial cystitis to chronic pelvic pain', *J Med Life,* 3 (2), 167-74.

Peters, K. M., et al. (2011), 'Are ulcerative and nonulcerative interstitial cystitis/painful bladder syndrome 2 distinct diseases? A study of coexisting conditions', *Urology,* 78 (2), 301-8.

Petkau, A. (1987), 'Role of superoxide dismutase in modification of radiation injury', *Br J Cancer Suppl,* 8, 87-95.

Philip, J., et al. (2009), 'Orthotopic neobladder versus ileal conduit urinary diversion after cystectomy a quality-of-life based comparison', *Ann R Coll Surg Engl,* 91 (7), 565-9.

Piera-Velazquez, S. and Jimenez, S. A. (2019), 'Endothelial to Mesenchymal Transition: Role in Physiology and in the Pathogenesis of Human Diseases', *Physiol Rev,* 99 (2), 1281-324.

Podmolikova, L., et al. (2020), 'Radiation of the urinary bladder attenuates the development of lipopolysaccharide-induced cystitis', *Int Immunopharmacol,* 83, 106334.

Popescu, L. M., et al. (2005), 'The connective connection: interstitial cells of Cajal (ICC) and ICC-like cells establish synapses with immunoreactive cells. Electron microscope study in situ', *J Cell Mol Med,* 9 (3), 714-30.

Post, J. G., et al. (1995), 'Radiation tolerance of normal mouse bladders after intravesical chemotherapy', *Radiother Oncol,* 34 (1), 30-8.

Prejean, J. D., et al. (1973), 'Spontaneous tumors in Sprague-Dawley rats and Swiss mice', *Cancer Res,* 33 (11), 2768-73.

Prockop, D. J. (2013), 'Concise review: two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation', *Stem Cells,* 31 (10), 2042-6.

Prockop, D. J. (2016), 'Inflammation, fibrosis, and modulation of the process by mesenchymal stem/stromal cells', *Matrix Biol,* 51, 7-13.

Qiu, X., et al. (2016), 'The Therapeutic Effect of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for Radiation-Induced Bladder Injury', *Stem Cells Int,* 2016, 3679047.

Rajaganapathy, B. R., et al. (2015), 'Intravesical Liposomal Tacrolimus Protects against Radiation Cystitis Induced by 3-Beam Targeted Bladder Radiation', *J Urol,* 194 (2), 578-84.

Rehman, J., et al. (2004), 'Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells', *Circulation,* 109 (10), 1292-8.

Richter, K. K., et al. (1997), 'Is the loss of endothelial thrombomodulin involved in the mechanism of chronicity in late radiation enteropathy?', *Radiother Oncol,* 44 (1), 65-71.

Rigaud, J., Hetet, J. F., and Bouchot, O. (2004), '[Management of radiation cystitis]', *Prog Urol,* 14 (4), 568-72.

Ringden, O., et al. (2007), 'Tissue repair using allogeneic mesenchymal stem cells for hemorrhagic cystitis, pneumomediastinum and perforated colon', *Leukemia,* 21 (11), 2271-6.

Roosen, A., et al. (2009), 'Suburothelial myofibroblasts in the human overactive bladder and the effect of botulinum neurotoxin type A treatment', *Eur Urol,* 55 (6), 1440-8.

Ross, D. and Siegel, D. (2017), 'Functions of NQO1 in Cellular Protection and CoQ10 Metabolism and its Potential Role as a Redox Sensitive Molecular Switch', *Front Physiol,* 8, 595.

Ryu, C. M., et al. (2018), 'Longitudinal intravital imaging of transplanted mesenchymal stem cells elucidates their functional integration and therapeutic potency in an animal model of interstitial cystitis/bladder pain syndrome', *Theranostics,* 8 (20), 5610-24.

Sanjabi, S., et al. (2009), 'Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity', *Curr Opin Pharmacol,* 9 (4), 447-53.

Sant, G. R., et al. (2007), 'The mast cell in interstitial cystitis: role in pathophysiology and pathogenesis', *Urology,* 69 (4 Suppl), 34-40.

Schaefer, M., et al. (2013), 'Bladder augmentation with small intestinal submucosa leads to unsatisfactory long-term results', *J Pediatr Urol,* 9 (6 Pt A), 878-83.

Schreiber, H., Oehlert, W., and Kugler, K. (1969), 'Regeneration und Proliferationskinetik des normalen und strahlengeschädigten Urothels der Ratte', *Virchows Archiv B,* 4 (1), 30.

Scuteri, A., et al. (2014), 'Mesengenic differentiation: comparison of human and rat bone marrow mesenchymal stem cells', *Int J Stem Cells,* 7 (2), 127-34.

Semont, A., et al. (2013), 'Mesenchymal stem cell therapy stimulates endogenous host progenitor cells to improve colonic epithelial regeneration', *PLoS One,* 8 (7), e70170.

Semont, A., et al. (2006), 'Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury', *Adv Exp Med Biol,* 585, 19-30.

SFRO (2007), 'GUIDE DES PROCEDURES DE RADIOTHERAPIE EXTERNE 2007', *Société Française de Radiothérapie Oncologique*.

Shen, C. H., et al. (2016), 'Evaluation of urinary bladder fibrogenesis in a mouse model of long-term ketamine injection', *Mol Med Rep,* 14 (3), 1880-90.

Sherif, I. O., et al. (2016), 'Uroprotective effect of oleuropein in a rat model of hemorrhagic cystitis', *Int J Biochem Cell Biol,* 74, 12-7.

Shoshkes-Carmel, M., et al. (2018), 'Subepithelial telocytes are an important source of Wnts that supports intestinal crypts', *Nature,* 557 (7704), 242-46.

Simovic Markovic, B., et al. (2017), 'Mesenchymal Stem Cells Attenuate Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in iNOS-Dependent Manner', *Stem Cells Int,* 2017, 1315378.

Singer, N. G. and Caplan, A. I. (2011), 'Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation', *Annu Rev Pathol,* 6, 457-78.

Smit, S. G. and Heyns, C. F. (2010), 'Management of radiation cystitis', *Nat Rev Urol,* 7 (4), 206-14.

Smith, Austin (2006), 'A glossary for stem-cell biology', *Nature,* 441 (7097), 1060-60.

Soler, R., et al. (2011), 'Vascular therapy for radiation cystitis', *Neurourol Urodyn,* 30 (3), 428-34.

Song, M., et al. (2015), 'Mesenchymal Stem Cell Therapy Alleviates Interstitial Cystitis by Activating Wnt Signaling Pathway', *Stem Cells Dev,* 24 (14), 1648-57.

Sordi, V., et al. (2005), 'Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets', *Blood,* 106 (2), 419-27.

Sorrell, J. M., Baber, M. A., and Caplan, A. I. (2009), 'Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation', *Tissue Eng Part A*, 15 (7), 1751-61.

Sotiropoulou, P. A., et al. (2006), 'Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells', *Stem Cells*, 24 (1), 74-85.

Stenqvist, J., et al. (2020), 'In vivo paracrine effects of ATP-induced urothelial acetylcholine in the rat urinary bladder', *Auton Neurosci*, 227, 102689.

Stewart, F., Randhawa, V., and Maughan, R. (1986), 'The RBE for mouse bladders after irradiation with 1 to 8 fractions of d(4)+ Be neutrons', *Br J Radiol*, 59 (697), 61-8.

Stewart, F. A. (1985), 'The proliferative and functional response of mouse bladder to treatment with radiation and cyclophosphamide', *Radiother Oncol*, 4 (4), 353-62.

Stewart, F. A. (1986), 'Mechanism of bladder damage and repair after treatment with radiation and cytostatic drugs', *Br J Cancer Suppl*, 7, 280-91.

Stewart, F. A., Michael, B. D., and Denekamp, J. (1978), 'Late radiation damage in the mouse bladder as measured by increased urination frequency', *Radiat Res*, 75 (3), 649-59.

Stewart, F. A., Denekamp, J., and Hirst, D. G. (1980), 'Proliferation kinetics of the mouse bladder after irradiation', *Cell Tissue Kinet*, 13 (1), 75-89.

Stewart, F. A., Randhawa, V. S., and Michael, B. D. (1984), 'Multifraction irradiation of mouse bladders', *Radiother Oncol*, 2 (2), 131-40.

Stewart, F. A., Oussoren, Y., and Luts, A. (1990), 'Long-term recovery and reirradiation tolerance of mouse bladder', *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 18 (6), 1399-406.

Stewart, F. A., et al. (1981), 'Repair during fractionated irradiation of the mouse bladder', *Br J Radiol*, 54 (645), 799-804.

Stewart, F. A., et al. (1991), 'Acute and late radiation damage in mouse bladder: a comparison of urination frequency and cystometry', *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 21 (5), 1211-9.

Suga, H., et al. (2009), 'IFATS collection: Fibroblast growth factor-2-induced hepatocyte growth factor secretion by adipose-derived stromal cells inhibits postinjury fibrogenesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism', *Stem Cells*, 27 (1), 238-49.

Sugiyama, T., et al. (2006), 'Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches', *Immunity*, 25 (6), 977-88.

Sun, T. T. (2006), 'Altered phenotype of cultured urothelial and other stratified epithelial cells: implications for wound healing', *Am J Physiol Renal Physiol*, 291 (1), F9-21.

Sung, H., et al. (2021), 'Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries', *CA Cancer J Clin*, 71 (3), 209-49.

Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006), 'Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors', *Cell*, 126 (4), 663-76.

Tang, J. M., et al. (2011), 'VEGF/SDF-1 promotes cardiac stem cell mobilization and myocardial repair in the infarcted heart', *Cardiovasc Res*, 91 (3), 402-11.

Tapping, C. R., et al. (2018), 'Prostatic Artery Embolization (PAE) for Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) with Haematuria in the Absence of an Upper Urinary Tract Pathology', *Cardiovasc Intervent Radiol*, 41 (8), 1160-64.

Taylor, C. J., et al. (2012), 'Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types', *Cell Stem Cell*, 11 (2), 147-52.

The Global Cancer Observatory: International Agency for Research on Cancer: World Health Organization 2020 (Globocan). Number of new cases in 2020, both sexes, all ages and number of deaths in 2020, both sexes, all ages (November 2020), (https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf).

Theoharides, T. C., Kempuraj, D., and Sant, G. R. (2001), 'Mast cell involvement in interstitial cystitis: a review of human and experimental evidence', *Urology*, 57 (6 Suppl 1), 47-55.

Theoharides, T. C., et al. (1995), 'Activation of bladder mast cells in interstitial cystitis: a light and electron microscopic study', *J Urol*, 153 (3 Pt 1), 629-36.

Thomson, J. A., et al. (1998), 'Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts', *Science*, 282 (5391), 1145-7.

Togel, F., et al. (2007), 'Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury', *Am J Physiol Renal Physiol*, 292 (5), F1626-35.

Tomaszewski, J. E., et al. (2001), 'Biopsy features are associated with primary symptoms in interstitial cystitis: results from the interstitial cystitis database study', *Urology*, 57 (6 Suppl 1), 67-81.

Tonse, R., et al (2022), 'Hospitalization rates from radiotherapy complications in the United States', *Sci Rep*, 14;12(1):4371.

Traini, C., et al. (2018), 'Adaptive changes of telocytes in the urinary bladder of patients affected by neurogenic detrusor overactivity', *J Cell Mol Med*, 22 (1), 195-206.

Tucker, S. L., et al. (2010), 'Late rectal toxicity on RTOG 94-06: analysis using a mixture Lyman model', *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 78 (4), 1253-60.

Tyagi, P., et al. (2018), 'Recent advances in imaging and understanding interstitial cystitis', *F1000Res*, 7.

Tyagi, P., et al. (2009), 'Gender-based reciprocal expression of transforming growth factor-beta1 and the inducible nitric oxide synthase in a rat model of cyclophosphamide-induced cystitis', *J Inflamm (Lond)*, 6, 23.

U.S. Department of Health and Human Services National Institutes of Health; National Cancer Institute, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (November 2017), ' Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 5.0'.

Usunier, B., et al. (2014), 'Management of fibrosis: the mesenchymal stromal cells breakthrough', *Stem Cells Int*, 2014, 340257.

Usunier, B., et al. (2021), 'HGF and TSG-6 Released by Mesenchymal Stem Cells Attenuate Colon Radiation-Induced Fibrosis', *Int J Mol Sci*, 22 (4).

Vale, J. A., et al. (1993), 'Post-irradiation bladder dysfunction: development of a rat model', *Urol Res*, 21 (6), 383-8.

Valle-Prieto, A. and Conget, P. A. (2010), 'Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress', *Stem Cells Dev*, 19 (12), 1885-93.

Vanderwinden, J. M., et al. (2002), 'Kit-negative fibroblast-like cells expressing SK3, a Ca2+-activated K+ channel, in the gut musculature in health and disease', *Cell Tissue Res*, 310 (3), 349-58.

Vanneste, B. G. L., et al. (2021), 'Development of a Management Algorithm for Acute and Chronic Radiation Urethritis and Cystitis', *Urol Int*, 1-12.

Vannucchi, M. G. and Faussone-Pellegrini, M. S. (2016), 'The Telocyte Subtypes', *Adv Exp Med Biol*, 913, 115-26.

Vannucchi, M. G. and Traini, C. (2016), 'Interstitial cells of Cajal and telocytes in the gut: twins, related or simply neighbor cells?', *Biomol Concepts*, 7 (2), 93-102.

Vannucchi, M. G. and Traini, C. (2018), 'The telocytes/myofibroblasts 3-D network forms a stretch receptor in the human bladder mucosa. Is this structure involved in the detrusor overactive diseases?', *Ann Anat,* 218, 118-23.

Vannucchi, M. G., Bani, D., and Faussone-Pellegrini, M. S. (2016), 'Telocytes Contribute as Cell Progenitors and Differentiation Inductors in Tissue Regeneration', *Curr Stem Cell Res Ther,* 11 (5), 383-9.

Vannucchi, M. G., et al. (2014), 'Telocytes subtypes in human urinary bladder', *J Cell Mol Med,* 18 (10), 2000-8.

Varley, C. L., et al. (2004a), 'Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma reverses squamous metaplasia and induces transitional differentiation in normal human urothelial cells', *Am J Pathol,* 164 (5), 1789-98.

Varley, C. L., et al. (2004b), 'Role of PPARgamma and EGFR signalling in the urothelial terminal differentiation programme', *J Cell Sci,* 117 (Pt 10), 2029-36.

Villeirs, L., et al. (2020), 'Hyperbaric oxygen therapy for radiation cystitis after pelvic radiotherapy: Systematic review of the recent literature', *Int J Urol,* 27 (2), 98-107.

Virag, L., et al. (2003), 'Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention', *Toxicol Lett,* 140-141, 113-24.

Visnjar, T., Kocbek, P., and Kreft, M. E. (2012), 'Hyperplasia as a mechanism for rapid resealing urothelial injuries and maintaining high transepithelial resistance', *Histochem Cell Biol,* 137 (2), 177-86.

Voswinkel, J., et al. (2013), 'Use of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic inflammatory fistulizing and fibrotic diseases: a comprehensive review', *Clin Rev Allergy Immunol,* 45 (2), 180-92.

Wagner, W., et al. (2008), 'Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process', *PLoS One,* 3 (5), e2213.

Walker, B. E. (1960), 'Renewal of cell populations in the female mouse', *Am J Anat,* 107, 95-105.

Wang, C., Ross, W. T., and Mysorekar, I. U. (2017a), 'Urothelial generation and regeneration in development, injury, and cancer', *Dev Dyn,* 246 (4), 336-43.

Wang, C. Y., et al. (2012), 'Mesenchymal stem cell-conditioned medium facilitates angiogenesis and fracture healing in diabetic rats', *J Tissue Eng Regen Med,* 6 (7), 559-69.

Wang, L., et al. (2001), 'Card10 is a novel caspase recruitment domain/membrane-associated guanylate kinase family member that interacts with BCL10 and activates NF-kappa B', *J Biol Chem,* 276 (24), 21405-9.

Wang, L. T., et al. (2021), 'Advances in mesenchymal stem cell therapy for immune and inflammatory diseases: Use of cell-free products and human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells', *Stem Cells Transl Med,* 10 (9), 1288-303.

Wang, Q., et al. (2017b), 'Ketamine Analog Methoxetamine Induced Inflammation and Dysfunction of Bladder in Rats', *Int J Mol Sci,* 18 (1).

Wang, Y., Boerma, M., and Zhou, D. (2016), 'Ionizing Radiation-Induced Endothelial Cell Senescence and Cardiovascular Diseases', *Radiat Res,* 186 (2), 153-61.

Wang, Y., et al. (2019), 'The Plasticity of Mesenchymal Stem Cells in Regulating Surface HLA-I', *iScience,* 15, 66-78.

Wang, Y., et al. (2020), 'miRNA-98-5p Targeting IGF2BP1 Induces Mesenchymal Stem Cell Apoptosis by Modulating PI3K/Akt and p53 in Immune Thrombocytopenia', *Mol Ther Nucleic Acids,* 20, 764-76.

Ward, Elijah, et al. (2022), 'PD21-09 IDENTIFICATION OF KEY MOLECULAR PLAYERS IN THE DEVELOPMENT OF RADIATION CYSTITIS THROUGH RNA SEQUENCING', *Journal of Urology,* 207 (Supplement 5), e364.

Ward, WF., Molteni, A., and Ts'ao, CH. (1997), 'Endothelial- oriented strategies to spare normal tissues', *The radiation biology of the vascular endothelium,* 185–208

Wilson, M. S., et al. (2010), 'Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent', *J Exp Med,* 207 (3), 535-52.

Wiseman, O. J., Fowler, C. J., and Landon, D. N. (2003), 'The role of the human bladder lamina propria myofibroblast', *BJU Int,* 91 (1), 89-93.

Wu, C., et al. (2018), 'Comparison of the Proliferation and Differentiation Potential of Human Urine-, Placenta Decidua Basalis-, and Bone Marrow-Derived Stem Cells', *Stem Cells Int,* 2018, 7131532.

Wu, L., et al. (2013), 'Fibroblast growth factor-1 is a mesenchymal stromal cell-secreted factor stimulating proliferation of osteoarthritic chondrocytes in co-culture', *Stem Cells Dev,* 22 (17), 2356-67.

Wu, X. R. and Sun, T. T. (1993), 'Molecular cloning of a 47 kDa tissue-specific and differentiation-dependent urothelial cell surface glycoprotein', *J Cell Sci,* 106 (Pt 1), 31-43.

Wu, X. R., et al. (2009), 'Uroplakins in urothelial biology, function, and disease', *Kidney Int,* 75 (11), 1153-65.

Xia, C., et al. (2021), 'Emerging Antioxidant Paradigm of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosome Therapy', *Front Endocrinol (Lausanne),* 12, 727272.

Xiao, Y., et al. (2017), 'TGF-beta/MAPK signaling mediates the effects of bone marrow mesenchymal stem cells on urinary control and interstitial cystitis after urinary bladder transplantation', *Am J Transl Res,* 9 (3), 1193-202.

Yahyapour, R., et al. (2018), 'Radiation-induced inflammation and autoimmune diseases', *Mil Med Res,* 5 (1), 9.

Yang, J., Dai, C., and Liu, Y. (2003), 'Hepatocyte growth factor suppresses renal interstitial myofibroblast activation and intercepts Smad signal transduction', *Am J Pathol,* 163 (2), 621-32.

Yang, J., Dai, C., and Liu, Y. (2005), 'A novel mechanism by which hepatocyte growth factor blocks tubular epithelial to mesenchymal transition', *J Am Soc Nephrol,* 16 (1), 68-78.

Yang, Y., et al. (2021), 'The Application of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Liver Diseases: Mechanism, Efficacy, and Safety Issues', *Front Med (Lausanne),* 8, 655268.

Yu, J., et al. (1994), 'Uroplakins Ia and Ib, two major differentiation products of bladder epithelium, belong to a family of four transmembrane domain (4TM) proteins', *J Cell Biol,* 125 (1), 171-82.

Zent, J. and Guo, L. W. (2018), 'Signaling Mechanisms of Myofibroblastic Activation: Outside-in and Inside-Out', *Cell Physiol Biochem,* 49 (3), 848-68.

Zhang, C. O., et al. (2005), 'Regulation of tight junction proteins and bladder epithelial paracellular permeability by an antiproliferative factor from patients with interstitial cystitis', *J Urol,* 174 (6), 2382-7.

Zhang, F., et al. (2016), 'TGF-beta induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype', *Oncotarget,* 7 (32), 52294-306.

Zhang, L. N., et al. (2021), 'Roles of cell fusion between mesenchymal stromal/stem cells and malignant cells in tumor growth and metastasis', *FEBS J,* 288 (5), 1447-56.

Zieglgansberger, W. (2019), 'Substance P and pain chronicity', *Cell Tissue Res,* 375 (1), 227-41.

Zwaans, B., et al. (2016), 'Modeling of chronic radiation-induced cystitis in mice', *Adv Radiat Oncol*, 1 (4), 333-43.

Zwaans, B. M. M., et al. (2018), 'Altered Angiogenic Growth Factors in Urine of Prostate Cancer Survivors With Radiation History and Radiation Cystitis', *Urology*, 120, 180-86.

Zwaans, B. M. M., et al. (2022), 'Increased extracellular matrix stiffness accompanies compromised bladder function in a murine model of radiation cystitis', *Acta Biomater*.

Zwaans, B. M. M., et al. (2020), 'Radiation cystitis modeling: A comparative study of bladder fibrosis radio-sensitivity in C57BL/6, C3H, and BALB/c mice', *Physiol Rep*, 8 (4), e14377.

Zwaans, B. M. M., et al. (2021), 'Voiding defects in acute radiation cystitis driven by urothelial barrier defect through loss of E-cadherin, ZO-1 and Uroplakin III', *Sci Rep*, 11 (1), 19277.

Annexes

Annexe 1:

Carole Helissey, Sophie Cavallero, **Clément Brossard**, Marie Dusaud, Cyrus Chargari, and Sabine François. «Chronic Inflammation and Radiation-Induced Cystitis: Molecular Background and Therapeutic Perspectives».
Cells. 2020 Dec 24;10(1). pii: cells10010021. doi: 10.3390/cells10010021

Annexe 2:

Usunier, B., **Brossard, C**., L'Homme, B., Linard, C., Benderitter, M., Milliat, F., & Chapel, A. «HGF and TSG-6 Released by Mesenchymal Stem Cells Attenuate Colon Radiation-Induced Fibrosis.».
Int J Mol Sci. 2021 Feb 11;22(4). pii: ijms22041790. doi: 10.3390/ijms22041790

Annexe 3:

Brossard Clément, Lefranc Anne-Charlotte, Simon, Jean-Marc, Benderitter Marc, Milliat Fabien, Chapel Alain. «Understanding Molecular Mechanisms and Identifying Key Processes in Chronic Radiation Cystitis»
Int J Mol Sci. 2022 Feb 6; 22(4). doi: 10.3390/ijms23031836

Annexe 4:

Clément Brossard, Anne-Charlotte Lefranc, Anne-Laure Pouliet, Jean-Marc Simon, Marc Benderitter, Fabien Milliat and Alain Chapel. «Molecular mechanisms and key processes of cystitis»
Biology 2022, **En révision**

Annexe 1: Chronic Inflammation and Radiation-Induced Cystitis: Molecular Background and Therapeutic Perspectives

cells

MDPI

Review

Chronic Inflammation and Radiation-Induced Cystitis: Molecular Background and Therapeutic Perspectives

Carole Helissey [1,2], Sophie Cavallero [1], Clément Brossard [3], Marie Dusaud [4], Cyrus Chargari [1,5,6] and Sabine François [1,*]

[1] Department of Radiation Biological Effects, French Armed Forces Biomedical Research Institute, 91220 Brétigny-sur-Orge, France; carole.helissey@intradef.gouv.fr (C.H.); sophie.cavallero@def.gouv.fr (S.C.); cyrus.chargari@gustaveroussy.fr (C.C.)
[2] Clinical Unit Research, HIA Bégin, 94160 Saint-Mandé, France
[3] Radiobiology of Medical Exposure Laboratory (LRMed), Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), 92260 Fontenay-aux-Roses, France; clement.brossard@irsn.fr
[4] Department of Urology, HIA Bégin, 94160 Saint-Mand, France; marie.dusaud@gmail.com
[5] Gustave Roussy Comprehensive Cancer Center, Department of Radiation Oncology, 94805 Villejuif, France
[6] French Military Health Academy, Ecole du Val-de-Grâce (EVDG), 75005 Paris, France
* Correspondence: sfm.francois@gmail.com

Abstract: Radiation cystitis is a potential complication following the therapeutic irradiation of pelvic cancers. Its clinical management remains unclear, and few preclinical data are available on its underlying pathophysiology. The therapeutic strategy is difficult to establish because few prospective and randomized trials are available. In this review, we report on the clinical presentation and pathophysiology of radiation cystitis. Then we discuss potential therapeutic approaches, with a focus on the immunopathological processes underlying the onset of radiation cystitis, including the fibrotic process. Potential therapeutic avenues for therapeutic modulation will be highlighted, with a focus on the interaction between mesenchymal stromal cells and macrophages for the prevention and treatment of radiation cystitis.

Keywords: radiation therapy; radiation cystitis; fibrosis; treatment; stem cells therapy; macrophages

check for updates

Citation: Helissey, C.; Cavallero, S.; Brossard, C.; Dusaud, M.; Chargari, C.; François, S. Chronic Inflammation and Radiation-Induced Cystitis: Molecular Background and Therapeutic Perspectives. *Cells* **2021**, *10*, 21. https://dx.doi.org/10.3390/cells10010021

Received: 4 November 2020
Accepted: 22 December 2020
Published: 24 December 2020

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

External pelvic radiation therapy is an important tool in the therapeutic arsenal for the treatment of pelvic cancers, such as prostate cancer, cervical cancer, rectal cancer or bladder cancer. Improvements in radiation techniques, such as intensity-modulated radiotherapy (IMRT), stereotactic radiotherapy and image-guided brachytherapy, have made it possible to deliver increasingly effective doses in smaller volumes with a clear improvement in treatment tolerance. However, the bladder is a critical organ thatmay be sensitive to low doses of radiation. Despite improved techniques, pelvic irradiation is still responsible for acute and/or late adverse events affecting the bladder. The term "radiation cystitis" therefore includes all lesions and symptoms of the bladder following the irradiation of the pelvic organs. Its severity is related to the volume of radiation exposure, the total dose delivered as well as the administration schedule and fractionation. This adverse event may have an impact on patients' quality of life. As cancer patient survival improves, long-term survivorship issues are of increasing importance, and an improved understanding of radiation-induced cystitis mechanisms is essential [1].

In this review, we review the available literature on clinical presentation and pathophysiology of acute and late radiation cystitis. Then, currently available treatments are examined. Due to the lack of long-term clinical benefit, other therapeutic avenues must be developed for the management of this adverse event. Finally, we highlight the place of immunity in the pathological processes of radiation cystitis and its potential as a thera-

peutic target, focusing on the interaction between Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) and macrophages.

2. Background Information

The reported incidence of radiation cystitis ranges from 9.1% to 80% [2]. This variability is linked to methods of evaluation and monitoring. Indeed, symptoms of late radiation cystitis may occur very late (sometimes decades) after their therapeutic irradiation, and some patients may be lost to follow-up. Similarly, acute manifestations may be underestimated (and therefore not reported) while irreversible radiation-induced bladder lesions are developing. Late radiation cystitis is the result of an ongoing process of destruction of bladder tissue and histological changes, and a continuum between acute and late radiation lesions do exist.

2.1. Acute Radiation Cystitis

Acute radiation cystitis is defined as any adverse event occurring during or up to threemonths after the end of radiation therapy (the threshold of sixmonths was also proposed). Its incidence is estimated at nearly 50% following pelvic irradiation at full curative doses (e.g., prostate or locally advanced cervical cancer treatment). Clinical symptoms may include increased urinary urgency and frequency (pollakiuria), both during the day and at night, dysuria, but also cystalgia with bladder spasms, and hematuria, albeit rarely at this early stage. An international grade classification ranging from 1 to 5 can be used to assess the severity and impact on the quality of life (Figure 1) [3]. Acute radiation tissue injury to the bladder is caused primarily by damage to the bladder mucosa. It involves an acute inflammatory response and tissue edema. Urothelial regeneration thus comes to a halt, and the epithelium is desquamated with no regeneration, which results in urothelial lesions making the bladder vulnerable to trauma and infections [4]. These lesions are characterized by edema, hyperemia and inflammation of the mucous membrane. In most of the cases, the prognosis is favorable, as these reactions usually disappear spontaneously within fourto sixweeks after the completion of radiation therapy [4,5], but an interruption of radiation therapy may be considered in case of severe grade 3–4 symptoms. Such treatment disruptions may potentially lead to a decrease in tumor control because of an increase in overall treatment time and should, therefore, be discussed on an individual basis [6].

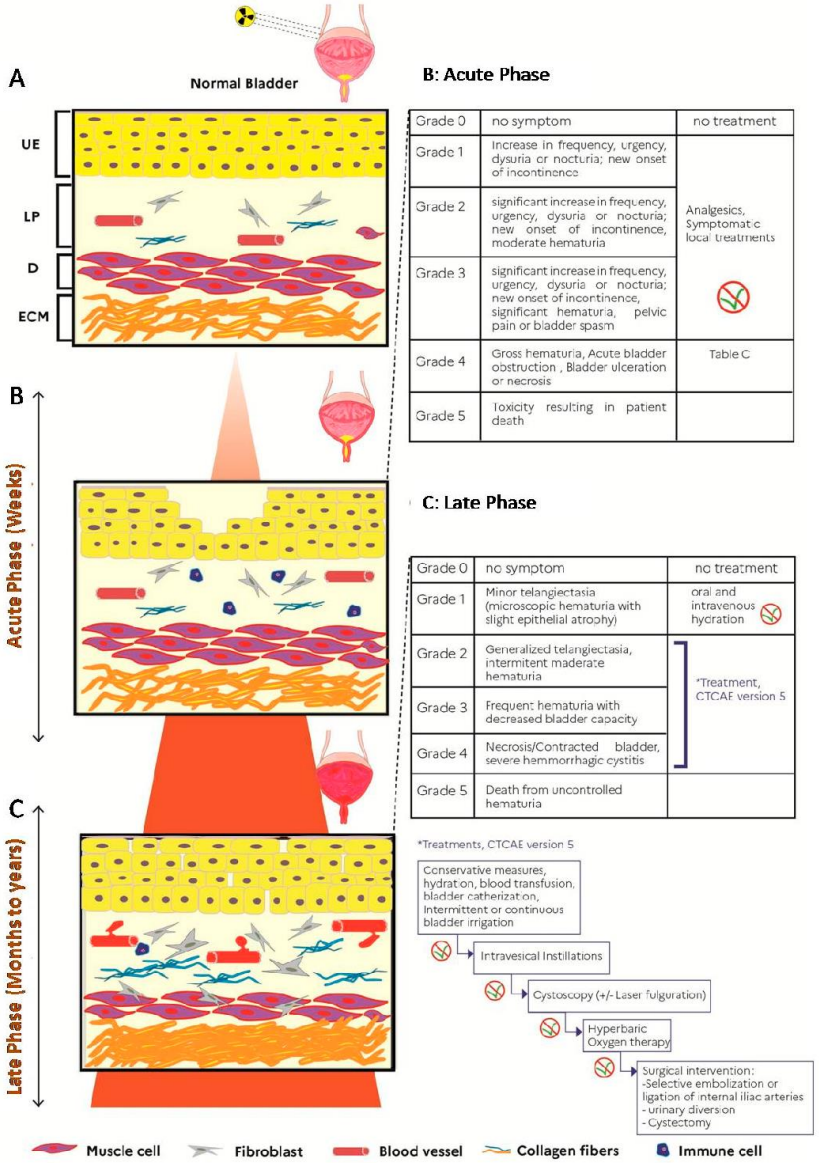


Figure 1. Illustration of radiation cystitis (RC) and clinical management adapted with "Modeling and treatment of radiation cystitis [7], development of RC after radiotherapy (**A**), in the acute phase (infiltration of immune cells into the lamina propria (LP) and depletion of the urothelium (UE)), in latent phase (proliferation of fibroblasts with hematuria, dilation of vessels, bleeding, decrease in the detrusor muscle layer (D) and production of collagen in LP and extracellular matrix(ECM). (F: fibroblast, V: vessel, M: muscle cells, C: collagen fibers, I: immune cells) (**B**) Clinical management during the acute phase of CR. (**C**) Clinical management during the latent phase of CR. * corresponds to cascade treatments of grades 2 to 4 according to CTCAE version 5 [3].

2.2. Late Radiation Cystitis

Late radiation cystitis is defined as an adverse event associated with pelvic irradiation that occurs after a minimum of threemonths and possibly even several years after completion of radiation therapy. Toxicities occurring between three and sixmonths are sometimes considered as "early delayed". On average, late radiation cystitis appears within the following 2–3 years. The incidence of late symptomatic radiation cystitis is stable over time at 5–10%, despite improved radiation techniques [8–10]. The clinical presentation can be variable, including bladder pain, urinary urgency, isolated urinary disorders and pollakiuria. Given that these symptoms are nonspecific and appear long after treatment, urine culture, or even cystoscopy may be useful to rule out other differential diagnoses. The most pathognomonic clinical feature is recurrent hematuria, with varying severity. In its most (and rare) severe forms, late radiation cystitis may be life-threatening. The incidence of late radiation cystitis was approximately 5% at 5 years and 10% at 20 years with conventional radiotherapy techniques [9]. It is important to eliminate any local recurrence or new cancer by performing cystoscopy. It should be highlighted that severe late symptoms (e.g., fistulas) may be worsened by inappropriate bladder biopsies, which should therefore be avoided in previously irradiated areas. Patients with a pelvic tumor extending to the bladder are also at high risk of fistulas [11]. A classification of this adverse event was developed (Figure 1). Severe late radiation cystitis is related to the volume and the dose of radiation exposure, the administration schedule and the technique used, but it is also important to identify patients with risk factors for developing a severe form. Marks et al. reported that patients with co-morbidities, such as hypertension, diabetes, a history of abdominal surgery, and patients receiving concomitant chemotherapy were at higher risk of developing radiation cystitis, especially in its late form [12]. Recent data suggested that after high dose exposures (such as after brachytherapy treatment), some anatomic subpart of the bladder may be at higher risk of complication, such as the bladder neck [13]. Although the pathophysiology of late radiation cystitis still remains unclear, endothelial cells appear to play an important role in this mechanism. Indeed, the submucosal vascularity is damaged by fibrosis of the vascular intima resulting in vessel obliteration and submucosal/muscular fibrosis. This is followed by urothelial atrophy, hypoxia with hypovascularization and ischemia of the bladder leading to the development of fibrosis and atrophy of the bladder tissue with the emergence of neovascularization in the form of telangiectasia that may easily bleed [14,15]. At the later stage, reduction in bladder capacity is observed linked to complete bladder fibrosis, mucosal ulcers with the risk of fistulization and spontaneous perforations of the bladder (or fistulae resulting from biopsies).

3. Current Treatments and Clinical Trials

3.1. Acute and Late Radiation Cystitis with Storage, Voiding Symptoms or Occasional Bleeding

The clinical management of storage symptoms for acute and late radiation cystitis is largely symptomatic with analgesics and anti-inflammatory drugs. Good hydration is recommended for patients in order to increase diuresis, cleanse the bladder, and avoid urinary obstruction resulting from blood clots [16].

Likewise, anticholinergics, like oxybutynin, trospium chloride, solifenacin, fesoterodine or flavoxate hydrochloride, can be prescribed to help alleviate urgency and increased daytime frequency. Their action is to decrease the contractility of the detrusor and improve symptoms [4].

In some cases, antibiotics may be proposed to prevent the condition from worsening in the event of infection.

Alpha-blockers, 5-reductase inhibitors or phosphodiesterase 5 inhibitors may be useful to alleviate voiding symptoms. Their action is to decrease the tone of the posterior urethra, bladder neck and the volume of the prostate [1]. In severe cases, it is sometimes necessary to hospitalize the patient for transfusions or clot evacuation [4]. In fact, bladder irrigations are performed in order to obtain a dilution of hematuria and drain the clots. It is a sterile technique with lubrication for standard catheter insertion with a large three-way catheter.

Blood clot evacuation is performed manually by using a large Toomey or catheter syringe until no further clots and output begin to clear. Then, we use normal saline (0.9%) for continuous irrigation [17].

If acute active bleeding does persist and is refractory to irrigations, electrocoagulation should be discussed, as described by Martinez and colleagues [18]. The procedure was performed with a rigid 22 French cystoscope. It was performed to identify the source of bleeding and rule out any other unidentified pathology. The Green Light laser was used to target any active source of bleeding. These areas were coagulated with the laser. Throughout the procedure, saline irrigation was used, and care was taken to ensure that the ureteral orifices were not injured. At the completion of the procedure, the bladder was drained under direct visualization to ensure adequate hemostasis. Very minimal bladder mucosal damage was reported. Then, a large three-way catheter was placed, and continuous irrigation was maintained overnight and stopped the next morning [18].

These treatments are tailored according to the severity of the symptoms (Figure 1).

3.2. Late Radiation Cystitis with Persistent or Recurrent Hematuria

3.2.1. Intravesical Instillations

Different molecules have been used for this indication, with different mechanisms of action. Their objectives are sterilization, cleansing and arrest of focal bleeding points.

Aluminum salt: Intravesical aluminous salts are considered astringent agents. They exert their action through protein precipitation on the cell surface and in interstitial spaces. They decrease blood vessel diameter and stiffness of capillary endothelium [9,19]. Aluminum salts are typically delivered as a 1% concentration of alum mixed with sterile water. Westerman et al. evaluated the benefit of alum instillations in 40 patients with hematuria, which was linked in 95% of patients to radiation cystitis [20]. These instillations led to a reduction in transfusion requirements (82% before instillation vs. 59% after instillation, $p = 0.05$). Moreover, 32.5% of patients did not require additional treatment after a median follow-up of 17 months. Tolerance was generally good. The main side effect reported was bladder spasm in 35% of patients [20].

Formalin: Formalin action consists of precipitating cellular proteins in the mucosa of the bladder. The consequence is to create occlusion within telangiectatic tissue. It appears to be the most effective intravesical agent with complete resolution rates ranging from 70 to 89%. However, the safety profile for this treatment is mediocre. First of all, its instillation is quite painful and must therefore be performed under general anesthesia. In addition, formalin has a high rate of morbidity and mortality (31%), with risks of vesicoureteral reflux complicated by severe bilateral pyelonephritis, ureteral stenosis and fibrosis of the bladder with reduced capacity and increased urinary frequency [21]. To date, its use remains very limited due to its poor safety profile.

Hyaluronic acid: Hyaluronic acid is a mucopolysaccharidethathelps to repair the normal glycosaminoglycan layer of the bladder when administrated through intravesical instillations. It has immunomodulatory properties that enhance connective tissue healing. Shao et al. evaluated the efficacy of intravesical hyaluronic acid (HA) instillation and hyperbaric oxygen (HBO) in the management of hemorrhagic radiation cystitis [22]. The clinical benefit was identical in the 2 groups but was maintained over time significantly in the HA arm. Indeed, complete resolution of hematuria was noted in 88%, 75%, and 50% of HA patients and in 75%, 50%, and 45% of patients in the HBO group, at 6-, 12- and 18-months following therapy, respectively. Hyaluronic acid appears to be an interesting therapeutic alternative, though this must be confirmed in a larger cohort.

Other agents have shown interesting results but have been studied only in small cohorts, like botulinum toxin, chondroitin sulfate, polydeoxyribonucleotides, early placental extract [23–26].

3.2.2. Hyperbaric Oxygen Therapy (HBOT)

This technique consists of placing the patient in a pressurized chamber (hyperbaric chamber) to administer pure or mixed oxygen at a pressure greater than atmospheric pressure, for 5–7 days a week, for a daily duration of 60–90 min up to approximately 30–45 sessions [27]. The effect of hyperbaric oxygen therapy is to allow better oxygen diffusion in tissues and to disrupt the continuum between hypoxia and fibrosis. Hyperoxia induces primary neovascularization, secondary growth of healthy granulation tissue, and induces short-term vasoconstriction, which may help control active bleeding [28,29]. It is the most widely reported therapeutic technique in the management of hemorrhagic radiation cystitis. Dellis et al. evaluated the benefit of HBOT in 38 patients with severe radiation cystitis. The complete response rate was 86.8%, and the partial response rate was 13.2%. The mean follow-up was 29.3 months. For the thirty-three patients with complete response who received HBO therapy within 6 months of the hematuria onset, the mean time interval was 4.9 months (range 1–6), while in the remaining five patients with partial response, the mean time interval was 22 months (range 8–48) ($p < 0.001$). Thirty-three patients were alive at the end of follow-up [29].

Recently, the randomized phase 2–3 RICH-ART evaluated the benefit of HBOT compared to standard of care for patients with late radiation cystitis and a value of fewerthan 80 points in the urinary domain of the expanded prostate index composite score (EPIC score). Forty-one patients were randomized in the HBOT arm and 38 in the standard of care arm. HBOT significantly alleviated patient-perceived symptoms of late radiation cystitis and improved HRQOL. The mean improvement in EPIC urinary total score was higher (17.8 [SD 18.4]) in the hyperbaric oxygen therapy group compared with patients in the control group (7.7 [SD 15.5]). Seventy patients in HBOT presented a grade 1–2 adverse events. The main adverse events grade 1–2 were ear pain (15%), myopia (12%) and barotrauma (10%). No grade 3–4 or 5 was reported in this group [30]. The HBOT's benefit was maintained in the time. In fact, Pereira et al. reviewed 105 patients diagnosed with RIHC whowere treated with HBOT between 2007 and 2016. After a median follow-up of 63 months, 76.3% had a complete response [31]. Cardinal et al. evaluated the benefits of HBOT through a meta-analysis of data from 602 patients treated with HBOT for hemorrhagic radiation cystitis. They determined that 84% of patients achieved partial or complete resolution, while 75% saw an improvement in hematuria. In their analysis of 499 patients with documented follow-up, authors observed a recurrence rate of 14%, with a median time to recurrence of 10 months (6 to 16.5 months). To summarize, this treatment is well-tolerated, the most common side effects being pressure-related, most notably ear and sinus barotrauma. HBOT is offered to patients for whom bladder washings and instillations are ineffective [32]. In a systemic review, Villeirs et al. emphasized HBOT benefit in radiation cystitis. In a cohort of 815 patients, an overall and complete response rate varied from 64.8% to 100% and 20% to 100%, respectively. Blood transfusion before HBOT, other treatment modalities before HBOT, use of anticoagulant therapy, along the interval between the onset of hematuria and start of HBOT were possible factors associated with lower efficacy of HBOT [27]. It is important to start HBOT in the onset of late radiation cystitis symptoms [33,34]. However, the availability and cost-effectiveness of high-pressure oxygen tanks is a critical factor in the success of HBOT [27].

3.3. Late Radiation Cystitis with Refractory or Life-Threatening Hematuria

In late radiation cystitis with refractory or life-threatening hematuria, the treatments aim at achieving volume expansion and at limiting the need for frequent transfusions due to active bleeding [35].

3.3.1. Arterial Embolization

Improvements in interventional radiological techniques have led to improvements in morbidity and mortality compared with surgery in patients with refractory hemorrhagic radiation cystitis. The technical success rate reported is 88–100%. The main adverse events were Brown–Sequard's syndrome, bladder necrosis, and gluteal paresis or skin necrosis. Thanks to improved techniques, the incidence of adverse events has decreased from 65% to 9–31% [36,37]. The follow-up of these studies is brief.

3.3.2. Cystectomy and Urinary Diversion

In some patients, treatment by means of cystectomy with urinary diversion is unfortunately inevitable when clot evacuation, bladder fulguration and bladder irrigation have failed. This therapeutic option should be reserved for patients for whom local and conservative treatments have proven unsuccessful, given its high rate of morbidity and mortality. Linder et al. reported a postoperative complication rate of 42% and a 90-day mortality rate of 16% [38].

4. Clinical Trials: Other Therapeutic Avenues, Antifibrotics

4.1. Antifibrotic or Antioxidant Pharmacological Agents

Vitamin E has protectiveeffects against oxidative stress and also plays an important role in preventing lipid peroxidation in the cellular membrane [39]. Between April 2003 and July 2009, 53 breast cancer patients were recruited to determine if a combination of Pentoxifylline (PTX) and Vitamin E could prevent the development of radiation fibrosis after radiotherapy for the definitive management (NCT00583700). This clinical study of post-irradiation cancer patients treated with PTX/vitamin E showed a significant difference in radiation-induced fibrosis. Of importance, the combination of PTX/vitamin E did not impact local control or survival within the first 2 years of follow-up (which is still quite a short follow-up). The oral PTX/vitamin E treatment was safe and well-tolerated. After pelvic irradiation in high-risk patients, the combination of Pentoxifylline (PTX) and Vitamin E can thus be considered clinically useful in preventing fibrosis [40,41]. Orgotein copper-zinc superoxide dismutase (SOD) is an enzyme found in various tissues throughout the body and has a fundamental role in the elimination of reactive oxidative species and free radicals that cause tissue damage and fibrosis [42]. SOD was found to be effective in reducing radiation-induced fibrosis by a reduced pain score and a decrease in the size of the fibrotic area in half of the cases after 6 months in 44 patients with clinical radiofibrosis following conservative treatment of breast cancer [43]. However, the role of antifibrotic agents in reducing or mitigating radiation cystitis remains unknown.

4.2. Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibitors

An initial clinical study had revealed that angiotensin-converting-enzyme inhibitors mightdecrease the incidence of radiation pneumonitis in patients receiving thoracic radiation for lung cancer [44]. An ongoing clinical study (NCT01754909) is evaluating the efficacy of enalapril on radiation pneumonitis and fibrosis for patients undergoing radiation therapy for lung cancer or other intrathoracic cancers. A recently published phase 2 prospective study supported the notion of radio-induced fibrosis reversibility, showing that pravastatin (40 mg/d for 12 months) was an efficient antifibrotic agent in patients with grade ≥ 2 cutaneous and subcutaneous fibrosis following head and neck radiotherapy [45]. However, no data are available in the setting of radiation cystitis.

5. Impact of Macrophages in the Development of Radiation Fibrosis

Recent insights regarding the functional role of inflammatory cells suggest that inflammation could play a role beyond the classical "acute" phase. During the radiation wound repair process, recruitment of inflammatory cells occurs at the site of injury, which can contribute to late inflammatory tissue damage through a continuous mechanismbetween inflammation, hypoxia and fibrosis [46]. During normal healing, sequential activation

of the classical, proinflammatory, M1 and alternately activated macrophages, M2a, M2b and M2c, is known to occur, which facilitates the transitions between the inflammatory, proliferative and remodeling phases of the repair process [47]. Thus, macrophage dysfunction or deficient generation can lead to the uncontrolled production of inflammatory mediators and growth factors. This can modify their communications with other cells (epithelial and/or endothelial cells, fibroblasts, progenitors and stem cells) and contribute to a state of persistent injury, which could, in turn, lead to the onset and maintenance of a pathological fibrotic process [48,49]. Macrophages are heterogeneous cells with various phenotypes and functions in part regulated by their micro-environment. Macrophages commonly exist in two (basically defined) distinct subsets, M1 and M2 macrophages, which have different functions and transcriptional profiles (schematically: M1 macrophages are associated with the production of proinflammatory cytokines, while M2 phenotype reprogramming enhances the production of anti-inflammatory cytokines) [50–52]. The representation of macrophage subtypes and their different actions are illustrated in Figure 2. The macrophage reprogramming processes, and steps have been reviewed elsewhere. Briefly, those include 1/an amplified macrophage response, which is a direct amplification following exposure to a reprogramming factor (e.g.,INFγ) but also a cross-amplification consecutive to another factor, such as lipopolysaccharide; 2/a reciprocal suppression of the alternate phenotype (M1/M2); 3/a cascade activation of the reprogramming mechanisms; 4/a feedback phenomenon [53].There are schematically two typical macrophage reprogramming signaling pathways: on the one hand, activation pathways such as JNK, Notch, TLR/NF-κB (p65/p50), PI3K/Akt2, JAK/STAT1, and HIF1αfavor the M1 phenotype; while on the other hand pathways such as PI3K/Akt1, JAK/STAT3/6, TGF-β/SMAD, TLR/NF-κB (p50/p50) and HIF2α are mainly involved in M2 phenotype programming [54]. After a fractionatedirradiation, an abnormal wound healing response occurs, which is characterized by the accumulation of M2 macrophages that promote fibrosis through the production of TGF-β1 [48,55]. Temporal and spatial coordination of myofibroblast activities with inflammatory macrophages is crucial for the controlled healing process and restored homeostasis in injured tissue, such as after irradiation. In this context, the M1 phenotype has also been associated with an antifibrotic effect by releasing MMPs (MMP-9, MMP-12 and MMP-13 that degrade ECM). However, if the injury process persists, fibrosis progresses with the proliferation of myofibroblasts and ECM deposition (such as collagen and fibronectin) in and around inflamed or damaged tissue [56,57]. In this context, M1 macrophages represent the starting point of the profibrotic process. Indeed, M1 macrophages release proinflammatory cytokines and chemokines that indirectly promote the proliferation of myofibroblasts. In this deregulated tissue microenvironment. There is a modulating of the macrophage phenotype, in which M2 macrophages phenotype can be generated by apoptotic bodies accumulated, ECM quality modified and Th2 cytokines stimulation [58]. M2 initially involves anti-inflammatory cells, with the release of IL10, arginase, TGFβ and HO-1 [59]. When the tissue microenvironment homeostasis is deregulated, M2 activation leads to fibrocytes recruitment and proliferation, myofibroblastactivation, and fibroblasts proliferation. In addition to collagen production, pro-fibro-fibrotic genes are transcripted, leading to the secretion of a large number of profibrotic factors such as TGF-B1, PDGF, IL6, IL-13 IL-7 and galactin-3and to an increase in tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) expression [55,57,60,61]. Recent data highlighted that the exacerbation of radiation-induced pulmonary fibrosis might depend on the mesenchymal transition of epithelial cells, promoted by the TGF-β-secreting M2 macrophages [62]. Therefore, any change in the M1/M2 balance will have a central role in terms of fibrosis control or worsening. In addition, exposure to irradiation may also activate macrophages indirectly. An abnormal wound healing response occurs, which is characterized by the accumulation of M2 macrophages, which promote fibrosis through the production of TGF-β1 [63]. Non-coding RNA appears to be involved in the initiation and progression of radiation-induced lung fibrosis by modulating the M2-mediated signaling pathway [64]. In animal models of lung fibrosis, it was reported a high expression of let-7i and low expression of miR-21 at 3 weeks

post-irradiation. At a later stage (after 26 weeks), let-7i expression decreased, and miR-21 was upregulated. In addition, it has been described that let-7i targets TGFBR1, inhibiting TGF-β signaling, while miR-21 degrades the TGF-β inhibitor SMAD7. In support of this, the miR-21 expression is upregulated in several models of fibrosis [65,66]. Significant functional and temporal differences have been shown among several distinct miRNAs that are found both in the inflammatory phase (immediately post-irradiation) and in the later fibrotic stages [58]. Mukherji et al. proposed that macrophage activation could be a secondary effect of radiation exposure, which may result from cellular damage signals and clearance of radiation-induced apoptotic cells, rather than a direct effect of irradiation [67]. In Oncoimmunology, Meziani and colleagues et al. provide a thorough discussion of the immune system/macrophage responses to radiotherapy and their involvement in the development of radiation injury. Macrophages are described as a promising therapeutic target for the prevention or the treatment of radiation-induced toxicities [68]. This immunomodulatory approach aims not only to increase the antitumor efficacy of radiotherapy but also to limit its side effects. To limit the initiation of fibrosis in healthy irradiated tissue, the migration of type 2 macrophages or the reprogramming of M1/M2 must be controlled [68]. However, the dynamics of myeloid cells in the bladder after pelvic radiotherapy have not yet been elucidated and must be investigated.

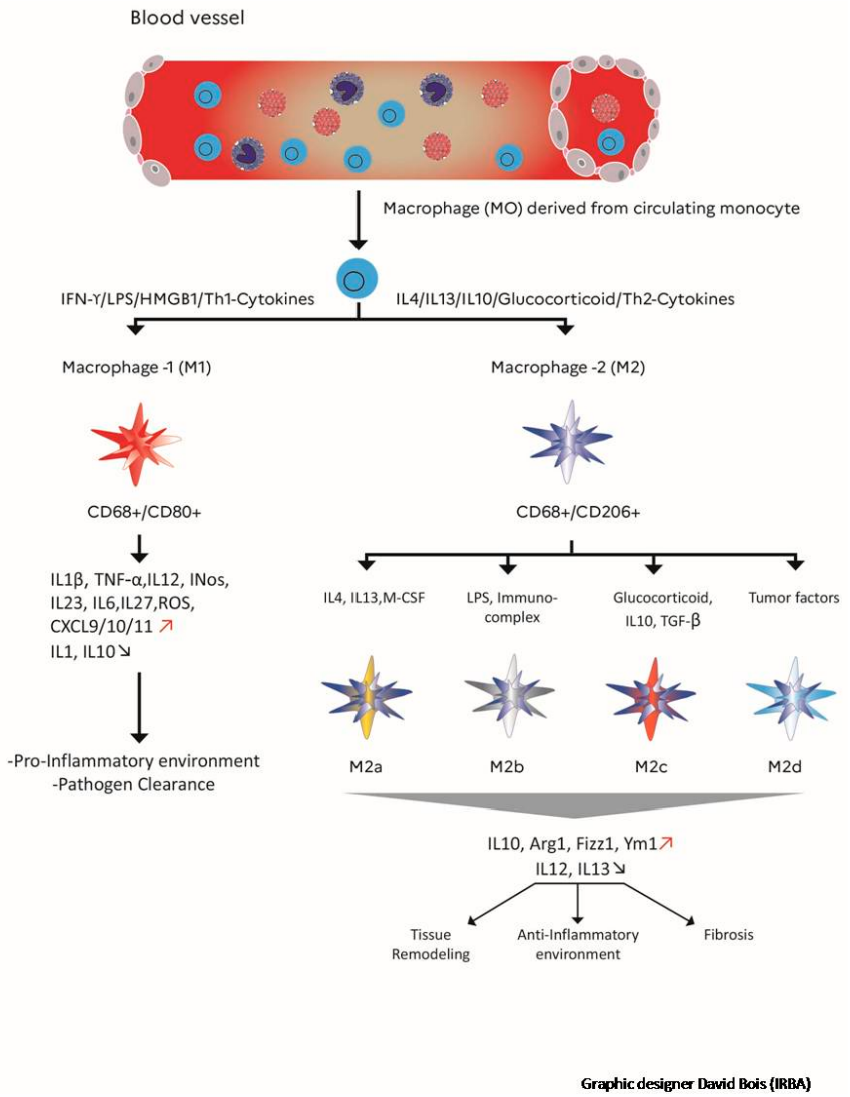


Figure 2. Role of macrophage polarization in inflammation, phenotype markers and signaling molecules involved in M1/M2, M2a, M2b, M2c, M2d. Importance of M1/M2 balance in tissue repair. The M1 CD68 +/CD80 + macrophages which are pro-inflammatory and the M2 CD68 +/CD206 + macrophages which are anti-inflammatory. Red arrows: elevation. Blue arrow: decrease

6. Preclinical Studies of Radiation Cystitis and Cell Therapy: A New Therapeutic Avenue

6.1. Preclinical Studies of Radiation-Induced Cystitis

Animal models of radiation cystitis are preferably performed in rodents. As illustrated in Table 1, the radiation exposure is mostly delivered as a single dose via an X-ray

or gamma-ray irradiator. However, it appears more appropriate to use X-rays to study the effects of radiotherapy on tissues. For example, the SARRP (Small Animal Radiation Research Platform) is one of the X-ray irradiators used in preclinical research. These small animal radiotherapy devices enable state-of-the-art image-guided therapy (IGRT) research to be performed by combining high-resolution cone-beam computed tomography (CBCT) imaging with an isocentric irradiation system [69]. This radiation fractionation is, however, not clinically relevant, as most pelvic therapeutic irradiations are delivered through fractionated schemes in patients. Among the factors inducing fibrosis, Th-2 cytokines were among the first to be recognized to have strong profibrotic properties. Typical cytokines released from Th-2 cells are IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13. Three of them, IL-4, IL-5 and IL-13, are linked to fibrosis development [70]. A few months after irradiation of the bladder, degenerative epithelial tissue, urothelial swelling, pseudo-carcinomatous epithelial hyperplasia, fibrous tissue in the lamina propria and between muscle cells, a mild increase in inflammatory cells, disruptions in tight junction formation, edema, loss of endothelial cells, urothelial hyperplasia, and bleedings (in the most severe cases) were detected [71]. As described in Table 1, three preclinical treatments were shown to reduce the development of radiation cystitis, including Hyperbaric oxygen therapy (HBOT), liposomal and tacrolimus instillations and also vasculogenic and angiogenic localized therapies [72–74]. For HBOT, 14 days after radiation, rats were treated in the chamber (95% oxygen and pressurized to 200 kPa for 90 min), twice daily, for a period of two weeks. This therapy reduced radiation oxidative stress and TGF-Beta and consequently lowered levels of IL-10. Using endothelial cells as a vasculogenic therapy and vascular endothelial growth factor (VEGF) as an angiogenic therapy wasbeneficial in the early chronic phase. But this angiogenic therapy using endothelial cells could promote tumor revascularization, although routine endothelial cells culture is still limited [75,76]. It is well documented that ionizing radiations activate the Nuclear Factor κB (NF-κB) signaling cascade directly or via induction of double-strand breaks and oxidative stress [77]. The NF-κB pathway is a link to the immune system in radiation response [78]. Thalidomide, an immunosuppressive drug thatinterferes with the activation of NF-κB, may be a valid treatment option for patients with inflammatory diseases refractory to other first- and second-line treatments. Considering the immunomodulatory effect of thalidomide, Kowaliuk et al. recently investigated the role of NF-κB and the functional effects of this treatment on radiogenic bladder dysfunction. Early thalidomide infusion after pelvic irradiation using a YXLON MG325 X-ray device showed beneficial and promising effects on the incidence and severity of bladder dysfunction [79]. The late administration of thalidomide showed no significant effect on functionality with possible neurological side effects, limiting its use [80]. Oral administration of clarithromycin or isoflavone before and after irradiation results in the anti-inflammatory macrophage subtype switch and reduction of macrophage infiltrate, respectively [81,82]. Intraperitoneal injection of Melatonin before radiation reduces lymphocytic and macrophagic infiltrates [83]. Moreover, Intraperitoneal injection over 8 weeks of Purified murine anti-IL-13 IgG antibody, starting 3 Week post radiation exposure participate ininhibition of polarization of alternatively M2-macrophages, also after Iterative IV infusion 5 × 10 Adipose -MSCs/infusion [84,85]. To increase the chances of finding a potential preclinical treatment for radiation cystitis, it is imperative to explore novel mitigators of radio-induced inflammatory reactions.

Table 1. Recent animal models for preclinical studies of radiation cystitis (RC) and preclinical studies targeting immune cells to limit the development of radio-induced fibrosis.

Animals	Method of Radiation Cystitis Induction	Treatments		Effect(s)	References
		Administration Type	Time Post-Radiation Exposure (PE)		
Adult female Sprague–Dawley rats	Single 20 Gy dose by a linear accelerator (6MV)	20 sessions of HBOT over a fortnight	14 days PE	Reduction of oxidative stress and proinflammatory factors	Oscarsson N et al., 2017
Adult female Sprague–Dawley rats	SARRP, singledose 40 Gy 6–8 weeks PE: histological tissue damage to the bladder	Liposomal tacrolimus instillation	6 weeks PE	Increase in inter-micturition intervals	Rajaganapathy BR et al., 2015
Adult female Lewis rats	A single 20 Gy dose of using a cesium isotope-based irradiator.	Injection into the bladder wall of a solution containing VEGF +/− endothelial cells	30 days PE	Revascularization of radiation-damaged urinary bladders	Soler R et al., 2011
Female BALB/c mice	Single 10 Gy dose by Siemens Stabilipan X-ray to the whole lung, Thickened alveolar septa, reflective of pneumonitis at 18 weeks PE	Isoflavone mixture gavage	Before and after radiation exposure	M1 subtype switched to an anti-inflammatory M2 subtype with increased levels of Arg-1 and decreased NOS2	Abernathy LM et al., 2015
Female C57BL/6J mice	Single 18 Gy dose by linear accelerator (21EX 3153 VARIAN) to the whole lung Interstitial edema and fibrosis sections at 16 weeks PE,	Oral clarithromycin	Before and after radiation exposure, and continuing until the day of sacrifice	Inhibition of fibrosis scoring, influx of macrophages and interstitial edema	Lee SJ et al., 2015
C57BL/6 female mice	5 × 6 Gy thoracic irradiation by X-RAD 320, Macrophage accumulation in the irradiated lung at 10 weeks PE	Purified murine anti-IL-13 IgG antibody by intraperitoneal (ip) injection	Weekly ip injection over 8 weeks, starting 3 weeksPE	Inhibition of recruitment and polarization of alternatively activated YM-1 positive macrophages	Chung SI et al., 2016
Adult male Wistar rats	^{60}Co source Single dose Gy 15 to the whole lung - Mild fibrosis at 17 weeks PE	- 1 mL of melatonin solution (100 mg/kg) - Intraperitoneal injection	30 min before irradiation	Increased levels of IL-4, DuoX1, Duox-2 and decreased lymphocyte and macrophage infiltration	Aliasgharzadeh A et al., 2019
Sprague-Dawley rats	Single 27 Gy dose by ^{60}Co irradiator inthe colorectal region, Anastomosis in the colon at 4 weeks PE	Iterative IV infusion 5 × 10 adipose-MSCs/infusion	3 weeks PE	The proportion of anti-inflammatory M2 macrophages grew, favoring the M2 phenotype and promoting wound healing	Van de Putte D et al., 2017

6.2. Stem Cell Therapy: A New Therapeutic Avenue

Because of their ability to migrate to the irradiated site and of their immunomodulatory and antioxidant properties in promoting tissue repair, mesenchymal stem (or stromal) cells (MSCs) are a potential antifibrotic therapeutic candidate [86–90]. Preclinical studies have described their beneficial effects, in particular their ability to limit the development of pulmonary and colorectal after irradiation by modulating the polarization of macrophages. From these investigations, it seems that MSCs could not only replace damaged epithelial cells but also promote tissue repair through the secretion of anti-inflammatory and antifibrotic factors [85,91,92]. However, it is important to note that these studies were performed on non-cancerous models. In a recent preclinical study of radiotherapy to treat colorectal cancer, it was shown that treatment with bone marrow (BM)-derived MSCs significantly reduced both cancer initiation and cancer progression by increasing the number of tumor-free animals as well as decreasing the number and the size of the tumors by half, thereby extending their lifespan. The attenuation of cancer progression was mediated by the capacity of the MSCs to modulate the immune component. The MSCs reprogrammed the macrophages to become regulatory cells involved in phagocytosis, thereby inhibiting the production of proinflammatory cytokines. Thus in the long term post-radiotherapy, this biotherapy allows the maintenance of tissue homeostasis and inhibits tumor progression [93]. MSCs inhibit fibrosis by reducing the expression of TGF-β1, modulating the inflammatory response, apoptosis, oxidative stress and remodeling of the extracellular matrix. In particular, preclinical studies have shown that MSCs could act on fibrosis by directing the polarization of macrophages and the differentiation of CD4+ T lymphocytes [94–96]. In response to signals derived from tissue damage, macrophages undergo reprogramming, which leads to the emergence of a spectrum of distinct functional phenotypes (Figure 2). A study by Chen et al. showed that MSCs couldpromote M2 macrophage polarization by secreting TGF-β3 and TSP1 [97]. Recent publications have shown that MSCs could induce M2 macrophages through the secretion of exosomes, and these effects could be due to the activation of transcription factors Stat6, MafB [98] and the secretion of miR-223 targeting PKNOX1 in macrophages [99]. These regulatory mechanisms are involved in acute inflammation. However, in the case of chronic radiation cystitis, fibrosis is triggered by chronic inflammation. MSCs could inhibit chronic inflammation by altering the polarization of macrophages to resolve chronic inflammation through the secretion of exosomes containing miR let-7b [100]. Moreover, HGF and TSG-6 have been shown to be major effectors of the antifibrotic activity of MSCs in several models (e.g., cutaneous and renal fibrosis [101–103]. HGF has been shown to be up the urine of prostate cancer survivors with a radiation history [104]. HGF could potentially play a dual role in radiation cystitis whereby it promotes angiogenesis and is protective against fibrosis [105]. TSG-6 is able to form hyaluronan polymers, which trigger the activation of NF-κB and the subsequent acquisition of the M1 phenotype [82]. Thus, TSG-6 could act as a negative regulator of M2 activity by promoting the availability of hyaluronan. As prolonged M2 activity has previously been associated with worsening fibrosis, newly secreted TSG-6 could be a major regulator of inflammation after MSC transplantation [106,107].

7. Discussion and Conclusions

Although irradiation techniques have improved over time, the incidence of radiation cystitis still poses a real problem for clinical management. Indeed, the management of radiation cystitis, especially in the late-stage, is based largely on symptomatic treatments. This was historically explained by the (theoretical) irreversibility of late-stage histological fibrotic lesions. Despite encouraging results, evidence that radiation cystitis can be modulated pharmacologically is insufficient and requires further confirmation as these findings are based only on small sample sizes or on retrospective analyses. The pathogenesis of fibrotic diseases remains a major challenge, due not only to the variety and multiplicity of initiating events but also to a large number of profibrotic mediators involved. Nevertheless, MSCs appear to be a promising therapeutic alternative for the treatment of fibrosis

in chronic radiation cystitis. The pro- or antitumor effects of biotherapies using MSCs have been widely discussed in the literature and are one major parameter that must be better understood before clinical application [108–110]. Other stem cells may be promising treatments of hemorrhagic cystitis. The placenta is a potential source of stromal cells, with decidual stromal cells (DSCs). These stem cells are easily amplified in vitro and have greater immunosuppressive potential than BM-MSCs. DSCs inhibit alloreactive T cell proliferation better than stromal cells from other sources and induce coagulation more effectively than BM-MSCs. Iterative infusions can be considered in patients with inflammatory pathologies [111–113]. In preclinical studies, compared to bone marrow-derived MSCs, DSCs had better viability [114]. Their clinical use must, however, be optimized. It should be noted that stromal cell injections must be carried out only in a patient with a long complete remission to limit their potential implantation near dormant cancer cells. Such safety issues may limit the use of MSC in clinics. MSC paracrine action is widely described in the literature [115,116]. To limit the implantation of these cells, it is possible to use the extracellular microvesicles (Evs-MSCs) that they secrete to reduce radiation-induced lesions, including fibrosis, without exposing patients to the risk of cancer reactivation [117–119].

To increase the likelihood of finding a potential preclinical treatment for radiation cystitis, it is imperative to test novel mitigators of the radio-induced inflammatory reaction. For example, TCDO/WF10 is a chemically stabilized chlorite matrix that has previously been shown to have a positive effect in the context of chronic inflammatory conditions. It induces natural immunity and stimulates cellular defense mechanisms through its actions on natural killer cells, cytotoxic T lymphocytes, and modification of the monocyte-macrophage system. It reduces inflammation quickly so that healing can begin [120,121]. In an early-stage clinical study, 20 patients with grade 3 radiation cystitis received intravenous TCDO treatment for 5 consecutive days. From 1 to 9 months after TCDO treatment, patients had no recurrent bleeding, and no side effects from treatment with TCDO were observed [122]. In a phase-II study involving 100 patients, Veerasarn et al. evaluated the effectiveness of WF10 in combination with standard care compared to standard care alone. The complete resolution rate for hematuria was comparable in both arms (74% vs. 64% in the experimental arm and in the standard arm, respectively). However, a significant reduction in the relapse of hematuria was noted among responders in the experimental arm (47% vs. 77%, p-0.01). No severe adverse events were reported [123,124].

To date, no preclinical treatment without reconstructive surgery appears to fully restore the function and structure of the bladder after radiation exposure. A number of preclinical studies have described strategies for limiting fibrosis (cf. Table 1). The majority of studies have been carried out in mice on a model of radio-induced pulmonary fibrosis. Those were mitigating and continuous treatments (isoflavone mixture gavage, oral clarithromycin) that were evaluated with respect to the inflammation and migration of immune cells, including macrophages, and the development of fibrosis [81,125]. Clarithromycin (CLA) administration, before and after lung radiation exposure, reduced expression levels of TNF-α, TNFR1, TNFR2, TGF-β1, CTGF and type I collagen, and inhibits both the increased acetylation of NF-κB p65 and the elevated expression of COX-2 with reduction of both fibrosis and macrophage infiltration [81]. To reduce fibrosis, as described by Chung et al., it is necessary to target type 2 cytokines such as IL13, limiting recruitment and polarization of Ym1/Chi3L3-positive macrophages, which are alternatively activated in the lungs following thoracic irradiation. Intraperitoneal injection of IL-13 neutralizing antibody does not completely suppress radiation-induced TGF-β expression, suggesting that sustained IL-13 or TGF-β neutralization therapy may be necessary to durably mitigate fibrotic progression [84]. Rapamycin is a potent immunosuppressive drug used in solid organ transplantation for the prevention of allograft rejection. In oncology, mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitors are currently being evaluated in several types of cancers. Targeting mTOR signaling may provide a therapeutic option for radiation-induced lung injury. Indeed, mTORC2 activity has been described in the non-canonical signaling of TGF-β, and mTORC2 inhibitors could thus be of interest in the case of fibrosis [126].

In rats, melatonin or metformin administration before irradiation using a ^{60}Co source of gamma rays in the thoracic area (i.e., heart and lungs) helped prevent the infiltration of macrophages and lymphocytes, as well as the upregulation of IL-4, IL4ra1, Duox1, andDuox2 [83,127]. Furthermore, metformin treatment could stimulate the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) [128]. Other antioxidants, such as fucoidan, have been orally administered preclinically after whole lung irradiation at 10Gy, mitigating different proteins (TIMP-1, CXCL1, MCP-1, MIP-2, and IL-1Ra) expression in pleural fluid, decreasing pleural fluid accumulation and reducing neutrophil and macrophage infiltration in lung tissues. Fucoidan changed the expression patterns of inflammatory cytokines, which may consequently attenuate lung fibrosis [129,130].

Many molecular mechanisms still need to be better understood in order to develop a targeted treatment for fibrosis and radiation cystitis. It is, therefore, necessary to broaden our knowledge of myeloid and lymphocytic dynamics in the development of this fibrosis induced after pelvic radiotherapy, based on data obtained in other models (ex: lung fibrosis). It is also necessary to follow a step-by-step translational development to ensure that patient outcome may be improved, through the integration of robust biomarkers of toxicity, as well as through the implementation of modern radiotherapy tools in clinical research to minimize the doses to organs at risk, including the bladder, and therefore improve the therapeutic index. The current knowledge on the biological processes involved in late radiation toxicity clearly suggests that it is indeed easier to prevent late toxicity than to reverse [131].

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rehailia-Blanchard, A.; He, M.Y.; Rancoule, C.; Guillaume, É.; Guy, J.-B.; Vial, N.; Nivet, A.; Orliac, H.; Chargari, C.; Magné, N. Medical prevention and treatment of radiation-induced urological and nephrological complications. *Cancer Radiother. J. Soc. Fr. Radiother. Oncol.* **2019**, *23*, 151–160.
2. Martin, S.E.; Begun, E.M.; Samir, E.; Azaiza, M.T.; Allegro, S.; Abdelhady, M. Incidence and Morbidity of Radiation-Induced Hemorrhagic Cystitis in Prostate Cancer. *Urology* **2019**, *131*, 190–195. [CrossRef] [PubMed]
3. Freites-Martinez, A.; Santana, N.; Arias-Santiago, S.; Viera, A. CTCAE versión 5.0. Evaluación de la gravedad de los eventos adversos dermatológicos de las terapias antineoplásicas. *Actas Dermo-Sifiliográficas* **2020**. [CrossRef] [PubMed]
4. Rigaud, J.; Hetet, J.-F.; Bouchot, O. Management of radiation cystitis. *Progres. En. Urol. J. Assoc. Fr. Urol. Soc. Fr. Urol.* **2004**, *14*, 568–572.
5. Smit, S.G.; Heyns, C.F. Management of radiation cystitis. *Nat. Rev. Urol.* **2010**, *7*, 206–214. [CrossRef]
6. Mazeron, R.; Castelnau-Marchand, P.; Dumas, I.; Del Campo, E.R.; Kom, L.K.; Martinetti, F.; Farha, G.; Tailleur, A.; Morice, P.; Chargari, C.; et al. Impact of treatment time and dose escalation on local control in locally advanced cervical cancer treated by chemoradiation and image-guided pulsed-dose rate adaptive brachytherapy. *Radiother. Oncol.* **2015**, *114*, 257–263. [CrossRef]
7. Zwaans, B.M.M.; Chancellor, M.B.; Lamb, L.E. Modeling and Treatment of Radiation Cystitis. *Urology* **2016**, *88*, 14–21. [CrossRef]
8. Cox, J.D.; Stetz, J.; Pajak, T.F. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1995**, *31*, 1341–1346. [CrossRef]
9. Denton, A.S.; Clarke, N.W.; Maher, E.J. Non-surgical interventions for late radiation cystitis in patients who have received radical radiotherapy to the pelvis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2002**, CD001773. [CrossRef]
10. Pavlidakey, P.G.; MacLennan, G.T. Radiation cystitis. *J. Urol.* **2009**, *182*, 1172–1173. [CrossRef]
11. Sun, R.; Koubaa, I.; Limkin, E.J.; Dumas, I.; Bentivegna, E.; Castanon, E.; Gouy, S.; Baratiny, C.; Monnot, F.; Maroun, P.; et al. Locally advanced cervical cancer with bladder invasion: Clinical outcomes and predictive factors for vesicovaginal fistulae. *Oncotarget* **2018**, *9*, 9299–9310. [CrossRef] [PubMed]
12. Marks, L.B.; Carroll, P.R.; Dugan, T.C.; Anscher, M.S. The response of the urinary bladder, urethra, and ureter to radiation and chemotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1995**, *31*, 1257–1280. [CrossRef]
13. Manea, E.; Escande, A.; Bockel, S.; Khettab, M.; Dumas, I.; Lazarescu, I.; Fumagalli, I.; Morice, P.; Deutsch, E.; Haie-Meder, C.; et al. Risk of Late Urinary Complications Following Image Guided Adaptive Brachytherapy for Locally Advanced Cervical Cancer: Refining Bladder Dose-Volume Parameters. *Int. J. Radiat. Oncol.* **2018**, *101*, 411–420. [CrossRef] [PubMed]
14. Mendenhall, W.M.; Henderson, R.H.; Costa, J.A.; Hoppe, B.S.; Dagan, R.; Bryant, C.M.; Nichols, R.C.; Williams, C.R.; Harris, S.E.; Mendenhall, N.P. Hemorrhagic Radiation Cystitis. *Am. J. Clin. Oncol.* **2015**, *38*, 331–336. [CrossRef] [PubMed]

15. Muruve, N.A. Radiation Cystitis. 2017. Available online: https://emedicine.medscape.com/article/2055124-overview (accessed on 23 December 2020).
16. D'Ancona, C.; Haylen, B.; Oelke, M.; Abranches-Monteiro, L.; Arnold, E.; Goldman, H.; Hamid, R.; Homma, Y.; Marcelissen, T.; Rademakers, K.; et al. The International Continence Society (ICS) report on the terminology for adult male lower urinary tract and pelvic floor symptoms and dysfunction. *Neurourol. Urodynam.* **2019**, *38*, 433–477. [CrossRef]
17. Pascoe, C.; Duncan, C.; Lamb, B.W.; Davis, N.F.; Lynch, T.H.; Murphy, D.G.; Lawrentschuk, N. Current management of radiation cystitis: A review and practical guide to clinical management. *BJU Int.* **2019**, *123*, 585–594. [CrossRef]
18. Martinez, D.R.; Ercole, C.E.; Lopez, J.G.; Parker, J.; Hall, M.K. A Novel Approach for the Treatment of Radiation-Induced Hemorrhagic Cystitis with the GreenLightTM XPS Laser. *Int. Braz. J. Urol.* **2015**, *41*, 584–587. [CrossRef]
19. Arrizabalaga, M.; Extramina, J.; Parra, J.L.; Ramos, C.; Gonzàlez, R.D.; Leiva, O. Treatment of Massive Haematuria with Aluminous Salts. *BJU Int.* **1987**, *60*, 223–226. [CrossRef]
20. Westerman, M.E.; Boorjian, S.A.; Linder, B.J. Safety and efficacy of intravesical alum for intractable hemorrhagic cystitis: A contemporary evaluation. *Int. Braz. J. Urol.* **2016**, *42*, 1144–1149. [CrossRef]
21. Donahue, L.A.; Frank, I.N. Intravesical formalin for hemorrhagic cystitis: Analysis of therapy. *J. Urol.* **1989**, *141*, 809–812. [CrossRef]
22. Shao, Y.; Lu, G.; Shen, Z. Comparison of intravesical hyaluronic acid instillation and hyperbaric oxygen in the treatment of radiation-induced hemorrhagic cystitis. *BJU Int.* **2012**, *109*, 691–694. [CrossRef] [PubMed]
23. Chuang, Y.-C.; Kim, D.K.; Chiang, P.-H.; Chancellor, M.B. Bladder botulinum toxin A injection can benefit patients with radiation and chemical cystitis. *BJU Int.* **2008**, *102*, 704–706. [CrossRef] [PubMed]
24. Hazewinkel, M.H.; Stalpers, L.J.A.; Dijkgraaf, M.G.; Roovers, J.-P.W.R. Prophylactic vesical instillations with 0.2% chondroitin sulfate may reduce symptoms of acute radiation cystitis in patients undergoing radiotherapy for gynecological malignancies. *Int. Urogynecol. J.* **2011**, *22*, 725–730. [CrossRef] [PubMed]
25. Bonfili, P.; Franzese, P.; Marampon, F.; La Verghetta, M.E.; Parente, S.; Cerasani, M.; Di Genova, D.; Mancini, M.; Vittorini, F.; Gravina, G.L.; et al. Intravesical instillations with polydeoxyribonucleotides reduce symptoms of radiation-induced cystitis in patients treated with radiotherapy for pelvic cancer: A pilot study. *Support. Care Cancer* **2013**, *22*, 1155–1159. [CrossRef]
26. Mićić, S.; Genbacev, O. Post-irradiation cystitis improved by instillation of early placental extract in saline. *Eur. Urol.* **1988**, *14*, 291–293.
27. Villeirs, L.; Tailly, T.; Ost, P.; Waterloos, M.; Decaestecker, K.; Fonteyne, V.; Van Praet, C.; Lumen, N. Hyperbaric oxygen therapy for radiation cystitis after pelvic radiotherapy: Systematic review of the recent literature. *Int. J. Urol.* **2019**, *27*, 98–107. [CrossRef]
28. Capelli-Schellpfeffer, M.; Gerber, G.S. The use of hyperbaric oxygen in urology. *J. Urol.* **1999**, *162*, 647–654. [CrossRef]
29. Dellis, A.; Deliveliotis, C.; Kalentzos, V.; Vavasis, P.; Skolarikos, A. Is there a role for hyberbaric oxygen as primary treatment for grade IV radiation-induced haemorrhagic cystitis? A prospective pilot-feasibility study and review of literature. *Int. Braz J. Urol.* **2014**, *40*, 296–305. [CrossRef]
30. Oscarsson, N.; Müller, B.; Rosén, A.; Lodding, P.; Mölne, J.; Giglio, D.; Hjelle, K.M.; Vaagbø, G.; Hyldegaard, O.; Vangedal, M.; et al. Radiation-induced cystitis treated with hyperbaric oxygen therapy (RICH-ART): A randomised, controlled, phase 2–3 trial. *Lancet Oncol.* **2019**, *20*, 1602–1614. [CrossRef]
31. Pereira, D.; Ferreira, C.; Catarino, R.; Correia, T.; Cardoso, A.; Reis, F.; Cerqueira, M.; Prisco, R.; Camacho, O. Hyperbaric oxygen for radiation-induced cystitis: A long-term follow-up. *Actas Urológicas Españolas (English Edition)* **2020**, *44*, 561–567. [CrossRef]
32. Cardinal, J.; Slade, A.; McFarland, M.; Keihani, S.; Hotaling, J.N.; Myers, J.B. Scoping Review and Meta-analysis of Hyperbaric Oxygen Therapy for Radiation-Induced Hemorrhagic Cystitis. *Curr. Urol. Rep.* **2018**, *19*, 38. [CrossRef]
33. Chong, K.T.; Hampson, N.B.; Corman, J.M. Early hyperbaric oxygen therapy improves outcome for radiation-induced hemorrhagic cystitis. *Urology* **2005**, *65*, 649–653. [CrossRef] [PubMed]
34. Nakada, T.; Nakada, H.; Yoshida, Y.; Nakashima, Y.; Banya, Y.; Fujihira, T.; Karasawa, K. Hyperbaric Oxygen Therapy for Radiation Cystitis in Patients with Prostate Cancer: A Long-Term Follow-Up Study. *Urol. Int.* **2012**, *89*, 208–214. [CrossRef] [PubMed]
35. Choong, S.K.; Walkden, M.; Kirby, R. The management of intractable haematuria. *BJU Int.* **2000**, *86*, 951–959. [CrossRef] [PubMed]
36. Loffroy, R.; Pottecher, P.; Cherblanc, V.; Favelier, S.; Estivalet, L.; Koutlidis, N.; Moulin, M.; Cercueil, J.; Cormier, L.; Krausé, D. Current role of transcatheter arterial embolization for bladder and prostate hemorrhage. *Diagn. Interv. Imaging* **2014**, *95*, 1027–1034. [CrossRef]
37. Gowda, G.G.; Vijayakumar, R.; Tigga, M.P. Endovascular Management of Radiation-Induced Hemorrhagic Cystitis. *Indian J. Palliat. Care* **2019**, *25*, 471–473.
38. Linder, B.J.; Tarrell, R.F.; Boorjian, S.A. Cystectomy for refractory hemorrhagic cystitis: Contemporary etiology, presentation and outcomes. *J. Urol.* **2014**, *192*, 1687–1692. [CrossRef]
39. Marquardt, D.; Williams, J.A.; Kučerka, N.; Atkinson, J.; Wassall, S.R.; Katsaras, J.; Harroun, T.A. Tocopherol Activity Correlates with Its Location in a Membrane: A New Perspective on the Antioxidant Vitamin E. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7523–7533. [CrossRef]
40. Jacobson, G.M.; Bhatia, S.; Smith, B.J.; Button, A.M.; Bodeker, K.; Buatti, J. Randomized Trial of Pentoxifylline and Vitamin E vs Standard Follow-up After Breast Irradiation to Prevent Breast Fibrosis, Evaluated by Tissue Compliance Meter. *Int. J. Radiat. Oncol.* **2013**, *85*, 604–608. [CrossRef]

41. Younus, H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int. J. Health Sci.* **2018**, *12*, 88–93.
42. Campana, F.; Zervoudis, S.; Perdereau, B.; Gez, E.; Fourquet, A.; Badiu, C.; Tsakiris, G.; Koulaloglou, S. Topical superoxide dismutase reduces post-irradiation breast cancer fibrosis. *J. Cell. Mol. Med.* **2007**, *8*, 109–116. [CrossRef]
43. Kharofa, J.; Cohen, E.P.; Tomic, R.; Xiang, Q.; Gore, E. Decreased risk of radiation pneumonitis with incidental concurrent use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and thoracic radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2012**, *84*, 238–243. [CrossRef] [PubMed]
44. Gensel, J.C.; Zhang, B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res.* **2015**, *1619*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
45. Bourgier, C.; Auperin, A.; Rivera, S.; Boisselier, P.; Petit, B.; Lang, P.; Lassau, N.; Taourel, P.; Tetreau, R.; Azria, D.; et al. Pravastatin Reverses Established Radiation-Induced Cutaneous and Subcutaneous Fibrosis in Patients With Head and Neck Cancer: Results of the Biology-Driven Phase 2 Clinical Trial Pravacur. *Int. J. Radiat. Oncol.* **2019**, *104*, 365–373. [CrossRef] [PubMed]
46. Chargari, C.; Supiot, S.; Hennequin, C.; Chapel, A.; Simon, J.-M. Treatment of radiation-induced late effects: What's new? *Cancer Radiother. J. Soc. Francaise Radiother. Oncol.* **2020**, *24*, 602–611.
47. Bentzen, S.M. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: Radiobiology meets molecular pathology. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 702–713. [CrossRef] [PubMed]
48. Wynn, T.A.; Vannella, K.M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* **2016**, *44*, 450–462. [CrossRef]
49. Mantovani, A.; Sica, A.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Vecchi, A.; Locati, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **2004**, *25*, 677–686. [CrossRef]
50. Shapouri-Moghaddam, A.; Mohammadian, S.; Vazini, H.; Taghadosi, M.; Esmaeili, S.A.; Mardani, F.; Seifi, B.; Mohammadi, A.; Afshari, J.T.; Sahebkar, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 6425–6440. [CrossRef]
51. Zhang, L.; Wang, Y.; Wu, G.R.; Xiong, W.N.; Gu, W.K.; Wang, C.Y. Macrophages: Friend or foe in idiopathic pulmonary fibrosis? *Respir. Res.* **2018**, *19*, 170. [CrossRef]
52. Malyshev, I.; Malyshev, Y. Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage 'Switch' Phenotype. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 341308. [CrossRef]
53. Zhou, D.; Huang, C.; Lin, Z.; Zhan, S.; Kong, L.; Fang, C.; Li, J. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell. Signal.* **2014**, *26*, 192–197. [CrossRef] [PubMed]
54. Lech, M.; Anders, H.-J. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1832*, 989–997. [CrossRef] [PubMed]
55. Braga, T.T.; Agudelo, J.S.H.; Camara, N.O.S. Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 602. [CrossRef] [PubMed]
56. Chou, J.; Chan, M.F.; Werb, Z. Metalloproteinases: A Functional Pathway for Myeloid Cells. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*, 1–15.
57. Pakshir, P.; Hinz, B. The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **2018**, *68–69*, 81–93. [CrossRef]
58. Wynn, T.A.; Barron, L. Macrophages: Master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin. Liver Dis.* **2010**, *30*, 245–257. [CrossRef]
59. Nikolic-Paterson, D.J.; Wang, S.; Lan, H.Y. Macrophages promote renal fibrosis through direct and indirect mechanisms. *Kidney Int. Suppl.* **2014**, *4*, 34–38. [CrossRef]
60. Sunderkötter, C.; Steinbrink, K.; Goebeler, M.; Bhardwaj, R.; Sorg, C. Macrophages and angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.* **1994**, *55*, 410–422. [CrossRef]
61. Vernon, M.A.; Mylonas, K.J.; Hughes, J. Macrophages and renal fibrosis. *Semin. Nephrol.* **2010**, *30*, 302–317. [CrossRef]
62. 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. *Vivo Athens Greece* **2019**, *33*, 1773–1784. [CrossRef]
63. Huang, Y.; Zhang, W.; Yu, F.; Gao, F. The Cellular and Molecular Mechanism of Radiation-Induced Lung Injury. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2017**, *23*, 3446–3450. [CrossRef] [PubMed]
64. 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 J. Biol. Chem.* **2016**, *7*, 231–239. [CrossRef] [PubMed]
65. Patel, V.; Noureddine, L. MicroRNAs and fibrosis. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2012**, *21*, 410–416. [CrossRef] [PubMed]
66. Zhu, H.; Luo, H.; Li, Y.; Zhou, Y.; Jiang, Y.; Chai, J.; Xiao, X.; You, Y.; Zuo, X. MicroRNA-21 in Scleroderma Fibrosis and its Function in TGF-β- Regulated Fibrosis-Related Genes Expression. *J. Clin. Immunol.* **2013**, *33*, 1100–1109. [CrossRef] [PubMed]
67. Mukherjee, D.; Coates, P.J.; Lorimore, S.A.; Wright, E.G. Responses to ionizing radiation mediated by inflammatory mechanisms. *J. Pathol.* **2014**, *232*, 289–299. [CrossRef] [PubMed]
68. Meziani, L.; Deutsch, E.; Mondini, M. Macrophages in radiation injury: A new therapeutic target. *Oncoimmunology* **2018**, *7*, e1494488. [CrossRef]
69. Ghita, M.; McMahon, S.J.; Thompson, H.F.; McGarry, C.K.; King, R.B.; Osman, S.O.S.; Kane, J.L.; Tulk, A.; Schettino, G.; Butterworth, K.T.; et al. Small field dosimetry for the small animal radiotherapy research platform (SARRP). *Radiat. Oncol.* **2017**, *12*, 204. [CrossRef]
70. Gieseck, R.L.; Wilson, M.S.; Wynn, T.A. Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18*, 62–76. [CrossRef]

71. Zwaans, B.M.; Krueger, S.; Bartolone, S.N.; Chancellor, M.B.; Marples, B.; Lamb, L.E. Modeling of chronic radiation-induced cystitis in mice. *Adv. Radiat. Oncol.* **2016**, *1*, 333–343. [CrossRef]
72. Oscarsson, N.; Ny, L.; Mölne, J.; Lind, F.; Ricksten, S.-E.; Seeman-Lodding, H.; Giglio, D. Hyperbaric oxygen treatment reverses radiation induced pro-fibrotic and oxidative stress responses in a rat model. *Free. Radic. Biol. Med.* **2017**, *103*, 248–255. [CrossRef]
73. Rajaganapathy, B.R.; Jayabalan, N.; Tyagi, P.; Kaufman, J.; Chancellor, M.B. Advances in Therapeutic Development for Radiation Cystitis. *Low. Urin. Tract Symptoms* **2014**, *6*, 1–10. [CrossRef] [PubMed]
74. Soler, R.; Vianello, A.; Füllhase, C.; Wang, Z.; Atala, A.; Soker, S.; Yoo, J.J.; Williams, J.K. Vascular therapy for radiation cystitis. *Neurourol. Urodynam.* **2010**, *30*, 428–434. [CrossRef] [PubMed]
75. Ferrara, N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: Therapeutic implications. *Semin. Oncol.* **2002**, *29*, 10–14. [CrossRef] [PubMed]
76. Palchesko, R.N.; Lathrop, K.L.; Funderburgh, J.L.; Feinberg, A.W. In vitro expansion of corneal endothelial cells on biomimetic substrates. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 7955. [CrossRef]
77. Magné, N.; Toillon, R.-A.; Bottero, V.; Didelot, C.; Van Houtte, P.; Gérard, J.-P.; Peyron, J.-F. NF-kappaB modulation and ionizing radiation: Mechanisms and future directions for cancer treatment. *Cancer Lett.* **2006**, *231*, 158–168. [CrossRef]
78. Hellweg, C.E. The Nuclear Factor κB pathway: A link to the immune system in the radiation response. *Cancer Lett.* **2015**, *368*, 275–289. [CrossRef]
79. Kowaliuk, J.; Sarsarshahi, S.; Hlawatsch, J.; Kastsova, A.; Kowaliuk, M.; Krischak, A.; Kuess, P.; Duong, L.; Dörr, W. Translational Aspects of Nuclear Factor-Kappa B and Its Modulation by Thalidomide on Early and Late Radiation Sequelae in Urinary Bladder Dysfunction. *Int. J. Radiat. Oncol.* **2020**, *107*, 377–385. [CrossRef]
80. Bauditz, J. Effective treatment of gastrointestinal bleeding with thalidomide–Chances and limitations. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 3158–3164. [CrossRef]
81. Lee, S.J.; Yi, C.O.; Song, D.H.; Cho, Y.J.; Jeong, Y.Y.; Kang, K.M.; Roh, G.S.; Lee, J.D. Clarithromycin Attenuates Radiation-Induced Lung Injury in Mice. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0131671. [CrossRef]
82. Abernathy, L.M.; Fountain, M.D.; Rothstein, S.E.; David, J.M.; Yunker, C.K.; Rakowski, J.; Lonardo, F.; Joiner, M.C.; Hillman, G.G. Soy Isoflavones Promote Radioprotection of Normal Lung Tissue by Inhibition of Radiation-Induced Activation of Macrophages and Neutrophils. *J. Thorac. Oncol.* **2015**, *10*, 1703–1712. [CrossRef]
83. Aliasgharzadeh, A.; Farhood, B.; Amini, P.; Saffar, H.; Motevaseli, E.; Rezapoor, S.; Nouruzi, F.; Shabeeb, D.H.; Musa, A.E.; Mohseni, M.; et al. Melatonin Attenuates Upregulation of Duox1 and Duox2 and Protects against Lung Injury following Chest Irradiation in Rats. *Cell J* **2019**, *21*, 236–242. [PubMed]
84. Chung, S.I.; Horton, J.A.; Ramalingam, T.R.; White, A.O.; Chung, E.J.; Hudak, K.E.; Scroggins, B.T.; Arron, J.R.; Wynn, T.A.; Citrin, D.E. IL-13 is a therapeutic target in radiation lung injury. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 39714. [CrossRef] [PubMed]
85. Van de Putte, D.; Demarquay, C.; Van Daele, E.; Moussa, L.; Vanhove, C.; Benderitter, M.; Ceelen, W.; Pattyn, P.; Mathieu, N. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Improve the Healing of Colonic Anastomoses Following High Dose of Irradiation Through Anti-Inflammatory and Angiogenic Processes. *Cell Transplant.* **2017**, *26*, 1919–1930. [CrossRef] [PubMed]
86. Murphy, M.B.; Moncivais, K.; Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells: Environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp. Mol. Med.* **2013**, *45*, e54. [CrossRef] [PubMed]
87. François, S.; Bensidhoum, M.; Mouiseddine, M.; Mazurier, C.; Allenet, B.; Semont, A.; Frick, J.; Saché, A.; Bouchet, S.; Thierry, D.; et al. Local Irradiation Not Only Induces Homing of Human Mesenchymal Stem Cells at Exposed Sites but Promotes Their Widespread Engraftment to Multiple Organs: A Study of Their Quantitative Distribution After Irradiation Damage. *Stem Cells* **2006**, *24*, 1020–1029. [CrossRef]
88. Sensebé, L.; Bourin, P. Mesenchymal stem cells for therapeutic purposes. *Transplantation* **2009**, *87*, S49–S53. [CrossRef]
89. Charbord, P. Bone marrow mesenchymal stem cells: Historical overview and concepts. *Hum. Gene Ther.* **2010**, *21*, 1045–1056. [CrossRef]
90. Khalifa, J.; François, S.; Rancoule, C.; Riccobono, D.; Magné, N.; Drouet, M.; Chargari, C. Gene therapy and cell therapy for the management of radiation damages to healthy tissues: Rationale and early results. *Cancer/Radiothérapie* **2019**, *23*, 449–465. [CrossRef]
91. Voswinkel, J.; François, S.; Simon, J.-M.; Benderitter, M.; Gorin, N.-C.; Mohty, M.; Fouillard, L.; Chapel, A.; Chapel, A. Use of Mesenchymal Stem Cells (MSC) in Chronic Inflammatory Fistulizing and Fibrotic Diseases: A Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2013**, *45*, 180–192. [CrossRef]
92. Zanoni, M.; Cortesi, M.; Zamagni, A.; Tesei, A. The Role of Mesenchymal Stem Cells in Radiation-Induced Lung Fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3876. [CrossRef]
93. François, S.; Usunier, B.; Forgue-Lafitte, M.-E.; L'Homme, B.; Benderitter, M.; Douay, L.; Gorin, N.-C.; Larsen, A.K.; Chapel, A. Mesenchymal Stem Cell Administration Attenuates Colon Cancer Progression by Modulating the Immune Component within the Colorectal Tumor Microenvironment. *Stem Cells Transl. Med.* **2019**, *8*, 285–300. [CrossRef]
94. Linard, C.; Busson, E.; Holler, V.; Strup-Perrot, C.; Lacave-Lapalun, J.-V.; Lhomme, B.; Prat, M.; Devauchelle, P.; Sabourin, J.-C.; Simon, J.-M.; et al. Repeated Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Injections Improve Radiation-Induced Proctitis in Pigs. *Stem Cells Transl. Med.* **2013**, *2*, 916–927. [CrossRef] [PubMed]

95. Bessout, R.; Semont, A.; Demarquay, C.; Charcosset, A.; Benderitter, M.; Mathieu, N. Mesenchymal stem cell therapy induces glucocorticoid synthesis in colonic mucosa and suppresses radiation-activated T cells: New insights into MSC immunomodulation. *Mucosal Immunol.* **2014**, *7*, 656–669. [CrossRef] [PubMed]
96. Bessout, R.; Demarquay, C.; Moussa, L.; René, A.; Doix, B.; Benderitter, M.; Sémont, A.; Mathieu, N. TH17 predominant T-cell responses in radiation-induced bowel disease are modulated by treatment with adipose-derived mesenchymal stromal cells. *J. Pathol.* **2015**, *237*, 435–446. [CrossRef] [PubMed]
97. Chen, X.; Yang, B.; Tian, J.; Hong, H.; Du, Y.; Li, K.; Li, X.; Wang, N.; Yu, X.; Wei, X. Dental Follicle Stem Cells Ameliorate Lipopolysaccharide-Induced Inflammation by Secreting TGF-β3 and TSP-1 to Elicit Macrophage M2 Polarization. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *51*, 2290–2308. [CrossRef] [PubMed]
98. Heo, J.S.; Choi, Y.; Kim, H.O. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote M2 Macrophage Phenotype through Exosomes. *Stem Cells Int.* **2019**, *2019*, 7921760. [CrossRef]
99. He, X.; Dong, Z.; Cao, Y.; Wang, H.; Liu, S.; Liao, L.; Jin, Y.; Yuan, L.; Li, B. MSC-Derived Exosome Promotes M2 Polarization and Enhances Cutaneous Wound Healing. *Stem Cells Int.* **2019**, *2019*, 1–16. [CrossRef]
100. Ti, D.; Hao, H.; Tong, C.; Liu, J.; Dong, L.; Zheng, J.; Zhao, Y.; Liu, H.; Fu, X.; Han, W. LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b. *J. Transl. Med.* **2015**, *13*, 1–14. [CrossRef]
101. Qi, Y.; Jiang, D.; Sindrilaru, A.; Stegemann, A.; Schatz, S.; Treiber, N.; Rojewski, M.; Schrezenmeier, H.; Beken, S.V.; Wlaschek, M.; et al. TSG-6 Released from Intradermally Injected Mesenchymal Stem Cells Accelerates Wound Healing and Reduces Tissue Fibrosis in Murine Full-Thickness Skin Wounds. *J. Investig. Dermatol.* **2014**, *134*, 526–537. [CrossRef]
102. Wu, Y.; Huang, S.; Enhe, J.; Ma, K.; Yang, S.; Sun, T.; Fu, X. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice. *Int. Wound J.* **2013**, *11*, 701–710. [CrossRef]
103. Wang, B.; Yao, K.; Huuskes, B.M.; Shen, H.H.; Zhuang, J.L.; Godson, C.; Brennan, E.P.; Wilkinson-Berka, J.L.; Wise, A.F.; Ricardo, S.D. Mesenchymal Stem Cells Deliver Exogenous MicroRNA-let7c via Exosomes to Attenuate Renal Fibrosis. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2016**, *24*, 1290–1301. [CrossRef] [PubMed]
104. Zwaans, B.M.M.; Bartolone, S.N.; Chancellor, M.B.; Nicolai, H.E.; Lamb, L.E. Altered Angiogenic Growth Factors in Urine of Prostate Cancer Survivors With Radiation History and Radiation Cystitis. *Urology* **2018**, *120*, 180–186. [CrossRef] [PubMed]
105. Zwaans, B.M.M.; Nicolai, H.E.; Chancellor, M.B.; Lamb, L.E. Prostate cancer survivors with symptoms of radiation cystitis have elevated fibrotic and vascular proteins in urine. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0241388. [CrossRef]
106. Wojtan, P.; Mierzejewski, M.; Osińska, I.; Domagała-Kulawik, J. Macrophage polarization in interstitial lung diseases. *Cent. Eur. J. Immunol.* **2016**, *41*, 159–164. [CrossRef]
107. Song, W.-J.; Li, Q.; Ryu, M.-O.; Ahn, J.-O.; Bhang, D.H.; Jung, Y.C.; Youn, H.-Y. TSG-6 Secreted by Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorates DSS-induced colitis by Inducing M2 Macrophage Polarization in Mice. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–14. [CrossRef]
108. Hong, I.-S.; Lee, H.-Y.; Kang, K.-S. Mesenchymal stem cells and cancer: Friends or enemies? *Mutat. Res.* **2014**, *768*, 98–106. [CrossRef]
109. Cortes-Dericks, L.; Galetta, D. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells in lung cancer: Benefits, risks and challenges. *Cell. Oncol. Dordr.* **2019**, *42*, 727–738. [CrossRef]
110. Galland, S.; Stamenkovic, I. Mesenchymal stromal cells in cancer: A review of their immunomodulatory functions and dual effects on tumor progression. *J. Pathol.* **2020**, *250*, 555–572. [CrossRef]
111. Karlsson, H.; Erkers, T.; Nava, S.; Ruhm, S.; Westgren, M.; Ringdén, O. Stromal cells from term fetal membrane are highly suppressive in allogeneic settings in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* **2012**, *167*, 543–555. [CrossRef]
112. Moll, G.; Ignatowicz, L.; Catar, R.; Luecht, C.; Sadeghi, B.; Hamad, O.; Jungebluth, P.; Dragun, D.; Schmidtchen, A.; Ringden, O. Different Procoagulant Activity of Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells Derived from Bone Marrow and Placental Decidua. *Stem Cells Dev.* **2015**, *24*, 2269–2279. [CrossRef]
113. Aronsson-Kurttila, W.; Baygan, A.; Moretti, G.; Remberger, M.; Khoein, B.; Moll, G.; Sadeghi, B.; Ringdén, O. Placenta-Derived Decidua Stromal Cells for Hemorrhagic Cystitis after Stem Cell Transplantation. *Acta Haematol.* **2018**, *139*, 106–114. [CrossRef] [PubMed]
114. Sadeghi, B.; Moretti, G.; Arnberg, F.; Samén, E.; Kohein, B.; Catar, R.; Kamhieh-Milz, J.; Geissler, S.; Moll, G.; Holmin, S.; et al. Preclinical Toxicity Evaluation of Clinical Grade Placenta-Derived Decidua Stromal Cells. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2685. [CrossRef] [PubMed]
115. Caplan, A.I.; Dennis, J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell. Biochem.* **2006**, *98*, 1076–1084. [CrossRef] [PubMed]
116. Gnecchi, M.; Danieli, P.; Malpasso, G.; Ciuffreda, M.C. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1416*, 123–146. [PubMed]
117. Xu, S.; Liu, C.; Ji, H.-L. Concise Review: Therapeutic Potential of the Mesenchymal Stem Cell Derived Secretome and Extracellular Vesicles for Radiation-Induced Lung Injury: Progress and Hypotheses. *Stem Cells Transl. Med.* **2019**, *8*, 344–354. [CrossRef]
118. Jafarinia, M.; Alsahebfosoul, F.; Salehi, H.; Eskandari, N.; Ganjalikhani-Hakemi, M. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: A Novel Cell-Free Therapy. *Immunol. Invest.* **2020**, *49*, 758–780. [CrossRef]
119. Cavallero, S.; Riccobono, D.; Drouet, M.; François, S. MSC-Derived Extracellular Vesicles: New Emergency Treatment to Limit the Development of Radiation-Induced Hematopoietic Syndrome? *Health Phys.* **2020**, *119*, 21–36. [CrossRef]

120. McGrath, M.S.; Kahn, J.O.; Herndier, B.G. Development of WF10, a novel macrophage-regulating agent. *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* **2002**, *3*, 365–373.
121. Giese, T.; McGrath, M.S.; Stumm, S.; Schempp, H.; Elstner, E.; Meuer, S.C. Differential effects on innate versus adaptive immune responses by WF10. *Cell. Immunol.* **2004**, *229*, 149–158. [CrossRef]
122. Srisupundit, S.; Kraiphibul, P.; Sangruchi, S.; Linasmita, V.; Chingskol, K.; Veerasarn, V. The efficacy of chemically-stabilized chlorite-matrix (TCDO) in the management of late postradiation cystitis. *J. Med Assoc. Thail.* **1999**, *82*, 798–802.
123. Veerasarn, V.; Khorprasert, C.; Lorvidhaya, V.; Sangruchi, S.; Tantivatana, T.; Narkwong, L.; Kongthanarat, Y.; Chitapanarux, I.; Tesavibul, C.; Panichevaluk, A. Reduced recurrence of late hemorrhagic radiation cystitis by WF10 therapy in cervical cancer patientsA multicenter, randomized, two-arm, open-label trial. *Radiother. Oncol.* **2004**, *73*, 179–185. [CrossRef]
124. Veerasarn, V.; Boonnuch, W.; Kakanaporn, C. A phase II study to evaluate WF10 in patients with late hemorrhagic radiation cystitis and proctitis. *Gynecol. Oncol.* **2006**, *100*, 179–184. [CrossRef] [PubMed]
125. Fountain, M.D.; Abernathy, L.M.; Lonardo, F.; Rothstein, S.E.; Dominello, M.M.; Yunker, C.K.; Chen, W.; Gadgeel, S.; Joiner, M.C.; Hillman, G.G. Radiation-Induced Esophagitis is Mitigated by Soy Isoflavones. *Front. Oncol.* **2015**, *5*, 238. [CrossRef] [PubMed]
126. Chung, E.J.; Sowers, A.; Thetford, A.; McKay-Corkum, G.; Chung, S.I.; Mitchell, J.B.; Citrin, D.E. Mammalian Target of Rapamycin Inhibition With Rapamycin Mitigates Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis in a Murine Model. *Int. J. Radiat. Oncol.* **2016**, *96*, 857–866. [CrossRef]
127. Farhood, B.; Aliasgharzadeh, A.; Amini, P.; Saffar, H.; Motevaseli, E.; Rezapour, S.; Nouruzi, F.; Shabeeb, D.; Musa, A.E.; Ashabi, G.; et al. Radiation-Induced Dual Oxidase Upregulation in Rat Heart Tissues: Protective Effect of Melatonin. *Medicina* **2019**, *55*, 317. [CrossRef]
128. Xu, G.; Wu, H.; Zhang, J.; Li, D.; Wang, Y.; Wang, Y.; Zhang, H.; Lu, L.; Li, C.; Huang, S.; et al. Metformin ameliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice. *Free. Radic. Biol. Med.* **2015**, *87*, 15–25. [CrossRef]
129. Senthilkumar, K.; Manivasagan, P.; Venkatesan, J.; Kim, S.-K. Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *60*, 366–374. [CrossRef]
130. Yu, H.-H.; Ko, E.C.; Chang, C.-L.; Yuan, K.S.-P.; Wu, A.T.; Shan, Y.; Wu, S.-Y. Fucoidan Inhibits Radiation-Induced Pneumonitis and Lung Fibrosis by Reducing Inflammatory Cytokine Expression in Lung Tissues. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 392. [CrossRef]
131. Chargari, C.; Levy, A.; Paoletti, X.; Soria, J.-C.; Massard, C.; Weichselbaum, R.R.; Deutsch, E. Methodological Development of Combination Drug and Radiotherapy in Basic and Clinical Research. *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26*, 4723–4736. [CrossRef]

Annexe 2: HGF and TSG-6 Released by Mesenchymal Stem Cells Attenuate Colon Radiation-Induced Fibrosis

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

HGF and TSG-6 Released by Mesenchymal Stem Cells Attenuate Colon Radiation-Induced Fibrosis

Benoît Usunier, Clément Brossard, Bruno L'Homme, Christine Linard, Marc Benderitter, Fabien Milliat and Alain Chapel *

Service de Recherche en Radiobiologie et en Médecine Régénérative (SERAMED), Laboratoire de Radiobiologie des Expositions Médicales (LRMED), Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), Fontenay-aux-Roses, F-92260 Paris, France; benoit.usunier@gmail.com (B.U.); clement.brossard@irsn.fr (C.B.); bruno.lhomme@irsn.fr (B.L.); christine.linard@irsn.fr (C.L.); marc.benderitter@irsn.fr (M.B.); fabien.milliat@irsn.fr (F.M.)
* Correspondence: alain.chapel@irsn.fr; Tel.: +33-1-583-595-46

Abstract: Fibrosis is a leading cause of death in occidental states. The increasing number of patients with fibrosis requires innovative approaches. Despite the proven beneficial effects of mesenchymal stem cell (MSC) therapy on fibrosis, there is little evidence of their anti-fibrotic effects in colorectal fibrosis. The ability of MSCs to reduce radiation-induced colorectal fibrosis has been studied in vivo in Sprague–Dawley rats. After local radiation exposure, rats were injected with MSCs before an initiation of fibrosis. MSCs mediated a downregulation of fibrogenesis by a control of extra cellular matrix (ECM) turnover. For a better understanding of the mechanisms, we used an in vitro model of irradiated cocultured colorectal fibrosis in the presence of human MSCs. Pro-fibrotic cells in the colon are mainly intestinal fibroblasts and smooth muscle cells. Intestinal fibroblasts and smooth muscle cells were irradiated and cocultured in the presence of unirradiated MSCs. MSCs mediated a decrease in profibrotic gene expression and proteins secretion. Silencing hepatocyte growth factor (HGF) and tumor necrosis factor-stimulated gene 6 (TSG-6) in MSCs confirmed the complementary effects of these two genes. HGF and TSG-6 limited the progression of fibrosis by reducing activation of the smooth muscle cells and myofibroblast. To settle in vivo the contribution of HGF and TSG-6 in MSC-antifibrotic effects, rats were treated with MSCs silenced for HGF or TSG-6. HGF and TSG-6 silencing in transplanted MSCs resulted in a significant increase in ECM deposition in colon. These results emphasize the potential of MSCs to influence the pathophysiology of fibrosis-related diseases, which represent a challenging area for innovative treatments.

Keywords: mesenchymal stem cells; colorectal; cancer; fibrosis; radiotherapy; inflammation; fibrosis; HGF; TSG-6

check for updates

Citation: Usunier, B.; Brossard, C.; L'Homme, B.; Linard, C.; Benderitter, M.; Milliat, F.; Chapel, A. HGF and TSG-6 Released by Mesenchymal Stem Cells Attenuate Colon Radiation-Induced Fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1790. https://doi.org/10.3390/ijms22041790

Received: 16 December 2020
Accepted: 5 February 2021
Published: 11 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Fibrosis appears in most tissues further to an injury. These pathologies greatly impact the quality of life of the patients, and their prevalence is high, particularly in developed countries. The potential number of patients who will suffer from colorectal fibrosis in the future may have been underestimated. The surgical removal of the fibrotic tissue is often required and is associated with a high morbidity/mortality, particularly in the case of colon and rectum diseases. The colon and rectum are susceptible to radiation-induced fibrosis and intestinal bowel diseases (IBDs), such as ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), which are often features of fibrosis [1].

Similar to IBDs, radiation can induce colorectal damage such as severe mucosal damage, chronic inflammation and activation of pro-fibrotic genes. Chronic insults, such as those induced by persisting inflammation, prevent proper tissue regeneration and continuously activate repair pathways. These injuries lead to differentiation of resident and

recruited myofibroblasts and the smooth muscle cells (SMCs) of the muscular layer in a pro-fibrotic phenotype by shifting from a contractile phenotype to a secretory phenotype [2,3]. Transforming growth factor beta (TGF-β)/small mother against decapentaplegic (SMAD) pathway is a major contributor to fibrogenic process [4]. Concomitant upregulation of the extra cellular matrix components (ECM), ECM-degrading enzymes (matrix metalloproteinases, MMPs) and their inhibitors; tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) causes a defect in ECM turnover [5]. Late phase of colorectal fibrosis is characterized by accumulation of ECM, which occasionally infiltrates the muscle layers, and a paucicellular microenvironment due to ischemia and mechanical stress [2,6].

The number of new cancer cases worldwide in 2020 was 19,292,789 cases, with 9,958,133 deaths [7]. Targeted cancer therapies may be more therapeutically beneficial for lung cancer, colorectal cancer, breast cancer, lymphoma and leukemia. Targeted molecular therapy, such as against programmed cell death ligand-1 (PD-L1) and genes from the neurotrophin tyrosine kinase receptor (NTRK) family, will probably reduce the amount of radiotherapy and will improve the consequence for cancer patients [8]. The abdomino-pelvic area is home to high-incidence cancers (e.g., prostate, colorectal and cervix), currently 60% of which are treated with ionizing radiations, often associated with chemotherapy and/or surgery [9]. An estimated 20% of patients suffer from late complications up to 20 years after pelvic radiotherapy [10]. One of the common features for the treatment of pelvic radiotherapy disease (PRD) comprising fibrosis is the fact that the treatment is mostly palliative. Indeed, especially in case of fibrosis no efficient curative treatment currently exists in spite of the availability of numerous candidate therapeutic drugs, including anti-inflammatory molecules and drugs that target TGF-β signaling pathway [1]. In contrast, a large number of preclinical and clinical studies suggest that cell therapy can inhibit fibrosis development in various organs, such as the heart, liver, kidneys and gut (reviewed in [1]. Mesenchymal stem cells (MSCs) have been identified to secrete specific anti-fibrotic proteins. Notably, HGF and TSG-6 have proven to be major effectors of the anti-fibrotic effects of MSCs in several models (e.g., skin and kidney fibrosis) [11,12]. However, despite the proven beneficial effects of MSC therapy on radiation enteritis [13,14], there is slight evidence of anti-fibrotic effects of MSCs in colorectal fibrosis [15]. Furthermore, the mechanisms underlying these effects are unknown.

Based on the need to better manage colorectal fibrosis, we aimed to investigate mediators and mechanisms that are involved in protection of MSCs against pelvic radiotherapy-induced fibrosis. An in vivo Sprague–Dawley rat's model of colorectal fibrosis using irradiation was implemented. We assessed the effects of injection of rat MSCs on colorectal fibrosis. We set up an in vitro model of human irradiated cocultured of MSCs in presence of the main pro-fibrotic cells in colon which are fibroblasts or smooth muscle cells irradiated. Then the role of HGF and TSG-6 as effectors of the anti-fibrotic effects of MSCs on colorectal fibrosis was explored on pro-fibrotic cells. Finally, to confirm the involvement of HGF and TSG-6 in MSC-mediated effects, rats were injected with MSCs that were silenced for either HGF or TSG-6.

2. Results

2.1. In Vivo Model of Colorectal Irradiation-Induced Fibrosis

Sprague–Dawley rats were exposed to a single dose of 29 Gy, which was delivered to a 2 × 3 cm colorectal (Figure 1A), in order to obtain severe radiation-induced epithelial alterations histologically. According to a previous report, in the above-mentioned model, lesions were also similar to those seen in patient treated with radiotherapy and who develop colorectal fibrosis [16]. In this model, chronology of fibrosis consisted in initiation of fibrosis (4 weeks), intermediate phase (5 weeks) and phase of established fibrosis (7 weeks) after irradiation. To characterize fibrogenesis in rats after colorectal irradiation, we first described changes in the expression profile of ECM-related genes (i.e., collagens, MMPs, TIMPs, etc.) using real-time quantitative PCR as follows: ECM components (collagen and secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC), MMPs (ECM-degrading enzymes, MMP-2,9,12,

14), serpine-1, Serpine Family H Member (SERPINH1) and TIMPs (MMP inhibitors, TIMP-1,2, 3, 4). SPARC influences fibrotic collagen deposition. Serpine-1 gene codes for the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) which is associated with fibrosis. The results are compared to the "Control" group (neither irradiated nor injected with MSCs).

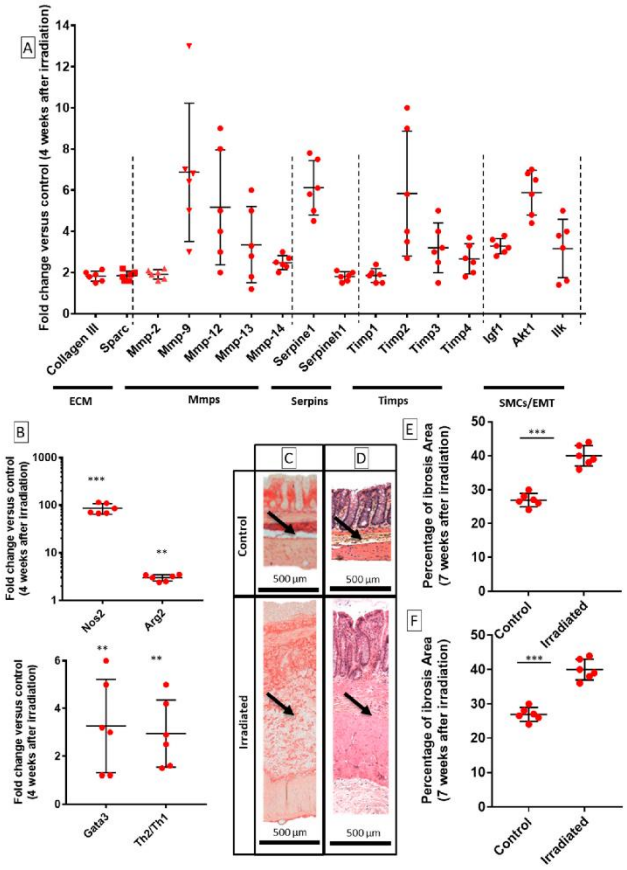


Figure 1. Features of radiation-induced colorectal fibrosis model in Sprague–Dawley rats. (**A**) mRNA fold changes of genes 4 weeks after irradiation that are normalized to Ywhaz and standardized against control (neither irradiated nor injected with mesenchymal stem cells (MSCs)). Extra cellular matrix (ECM) components, matrix metalloproteinases (MMPs), serpine-1 (PAI-1) and TIMPs were upregulated in colon–rectum area of irradiated rats. (**B**) mRNA fold changes of macrophage and T-cell response. (**C**) Representative histological images of colon of control and irradiated rats showing ECM (red) stained with Picrosirius Red (origin magnification: 40×). Seven weeks after irradiation, animals display oedema in submucosa that was caused by accumulation of ECM. (**D**) Representative images of colon of control and irradiated rats stained with HES 7 weeks after irradiation (original magnification: 40×). Black arrows indicate ECM accumulation compared to control. (**E**) Fibrosis deposition in the colon–rectum area of control and irradiated animals 7 weeks after irradiation. Percentage of fibrosis area quantified on Picrosirius Red-stained slides showing a significant increase in ECM deposition after irradiation. (**F**) Irradiation induces a significant thickening of tissue, particularly in submucosa and muscularis propria, 7 weeks after irradiation. Each group of animals was composed of 6 rats. Results were compared as follows: Irradiated group was compared to Control group. Two-group comparisons were performed with *t*-tests, while one-way ANOVAs, followed by Bonferroni *t*-tests, were used for multiple group comparisons. The results are expressed as mean ± standard deviation (SD). **: $p < 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

During initiation of fibrosis, four weeks post-irradiation, ECM components collagen III and SPARC were overexpressed compared to the Control group (Figure 1A). Serpine-1 (gene coding for PAI-1) was overexpressed 4 weeks after irradiation. PAI-1 is known to be significantly elevated in fibrotic tissues [1]. Genes encoding MMPs (2, 9, 12, 13 and 14) and TIMPs (1, 2, 3 and 4) were upregulated.

Chronic inflammation and fibrosis are often associated with specific immune infiltration. Activated macrophage markers nitric oxide synthase 2 (NOS2), arginine 2 (Arg2) were upregulated, 4 weeks post-irradiation compared to those in control rats (Figure 1B). Moreover, Gata-3 and Gata-3/T-bet (T-BoX transcription factor) ratio, which is indicative of Th2/Th1 ratio in T-helper (Th) cells, indicated a higher Th2 immune response (Figure 1B). Seven weeks post-irradiation, mucosal ulceration, oedema in submucosa stimulated by ECM accumulation, and overall thickening were observed (black arrows, Figure 1C,D). Irradiated animals showed a significant increase in ECM deposition in colon and rectum compared to control rats (Figure 1E) ECM and tissue thickening (Figure 1F).

To conclude, we described fibrosis-related features of irradiated colon–rectum area in Sprague–Dawley rats. After irradiation, an overall imbalance in components that regulate ECM turnover (i.e., ECM components, MMPs and TIMPs) might be related to an accumulation of ECM.

2.2. MSCs Inhibit Fibrogenesis Following Colorectal Irradiation

We have investigated whether MSC treatment may modulate the different phases of fibrogenesis after colorectal irradiation. We based our treatment procedures on previous reports from preclinical and clinical therapeutic protocols that employed exogenous MSCs to treat radiotherapy side effects and symptoms associated with an overdose of radiotherapy during prostate cancer treatment [13,15]. Rats were injected twice weekly with a quantity of 5 million of MSCs via tail vein according to our previous studies [7,17,18]. To potentiate the effect of MSCs, we performed repeated intravenous injection of MSCs before initiation of fibrosis, at 2 and 3 weeks after irradiation. As described in Figure 2A, to investigate effect of MSC therapy on radiation-induced fibrogenesis, rats were euthanized during first phase of fibrosis (4 weeks), intermediate phase (5 weeks) and lastly during stage of established fibrosis (7 weeks) after irradiation. The irradiated rats without the MSC transplantation ("Irradiated" group) were compared to animals receiving MSC injections ("Irradiated + MSCs group").

Irradiation induced an upregulation of ECM-related genes (Figure 2B, red dots), which was prevented by transplantation of MSCs (Figure 2B, blue dots). Four weeks after irradiation, Irradiated + MSCs group displayed a significant downregulation of pro-fibrotic gene connective tissue growth factor (CTGF), which was accompanied by inhibition of collagen I, collagen III, fibronectin and SPARC expression (Figure 2B, blue dots). Five weeks after irradiation, MMP-2 concentration in the colon–rectum area of Irradiated + MSCs group was significantly increased (Figure 2C, blue dots) compared to that in the control (Figure 2C, white dots) and Irradiated group (Figure 2C, red dots). Seven weeks after irradiation, Sirius Red staining of paraffin-embedded colon tissue confirmed a significant reduction in ECM deposition in the colon–rectum area of Irradiated + MSCs group, particularly in submucosa (Figure 2E, dark arrows) compared to Irradiated group (Figure 1C, dark arrows). This observation was confirmed by measuring surface of fibrosis in longitudinal tissue sections. Seven weeks after ECM deposition, which was dramatically increased in the irradiated group (Figure 2D, red dot), compared to control (Figure 2D, white dots) and was reduced in the Irradiated + MSCs group (Figure 2D blue dots). These results show potent inhibitory effects exerted by MSCs on radiation-induced colorectal fibrosis through downregulation of ECM components and a more efficient control over ECM turnover.

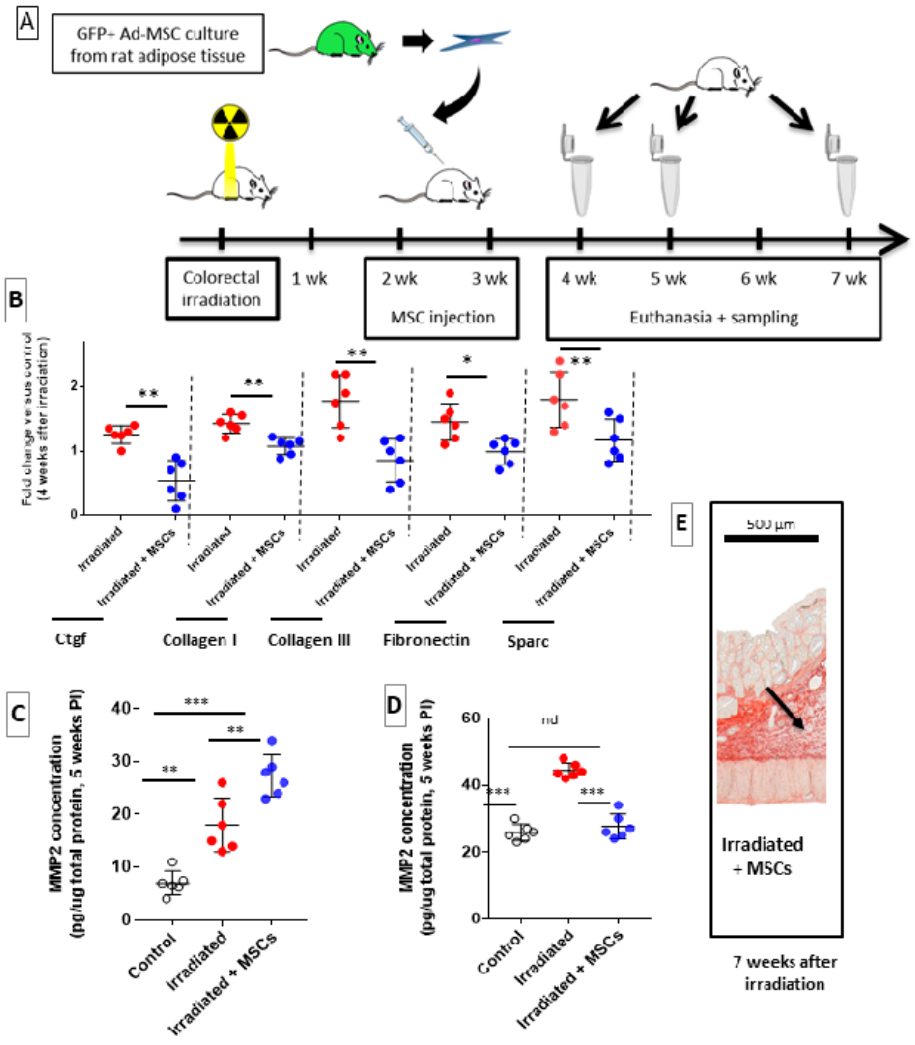


Figure 2. Effect of MSC transplantation on radiation-induced ECM remodeling. (**A**) Timeline of irradiation and MSC transplantation protocol. (**B**) mRNA fold changes of genes 4 weeks after irradiation (red dots) and 1 week after MSC injection (blue dots) that are normalized to Ywhaz and standardized against Control group. mRNA fold changes of genes encoding CTGF and ECM components indicate suppression of pro-fibrotic signals by MSCs. (**C**) Five weeks after irradiation: MSCs increase secretion of MMP-2 in the irradiated colon–rectum area. (**D**) Percentage of fibrosis area quantified on Picrosirius Red-stained slides. MSCs significantly inhibit ECM deposition in the colon–rectum area of irradiated animals as observed 7 weeks after irradiation. (**E**) Representative images showing ECM (black arrow) stained with Picrosirius red (original magnification: 40×) in the colon–rectum area of irradiated + MSCs group, 7 weeks after irradiation (original magnification: 40×). Each group of animals was composed of 6 rats. The results of each group were compared as follows: Irradiated group was compared to Control group; Irradiated + MSCs group was compared to control and Irradiated group. Two-group comparisons were performed with *t*-tests, while one-way ANOVAs, followed by Bonferroni *t*-tests, were used for multiple group comparisons. The results are expressed as mean ± SD. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

2.3. MSCs Act Directly on Fibroblasts and SMCs to Inhibit Their Pro-Fibrotic Phenotype

We compared effects of MSCs on human Colonic Smooth Muscle Cells (hCoSMCs) and human Intestinal Fibroblasts (hIFs) that are responsible of colon fibrosis as described in Figure 3A. The role of HGF and TSG-6 as effectors of the anti-fibrotic effects of MSCs on colorectal fibrosis was explored. Influence of unirradiated MSCs (with or without knockdown of HG or TSG-6 genes) was tested on irradiated hIFs and irradiated hCoSMCs cultures using a Transwell system that allowed molecular exchanges without cell-to-cell contact. Expression in irradiated hIFs and irradiated hCoSMCs cocultured with MSCs (irradiated + hMSCs) was compared to irradiated hIFs and irradiated hCoSMCs. Expression of the pro-fibrotic TGF-β/SMAD pathway, a major contributor to the fibrogenic process and ECM components, ECM degrading enzymes (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) were measured. The results in Figure 3B,C show the genes for which significant variations were measured. This experiment is in favor of a direct effect of MSCs on irradiated hCoSMCs and irradiated hIFs. When co-cultured with MSCs, irradiated hIFs revealed a marked reduction in expression of genes encoding TGF-β1, α-smooth muscle actin (α-SMA) and collagen III, compared with irradiated hIFs alone (Figure 3B, blue dots). Similarly, MSCs cocultured with irradiated hCoSMCs downregulated TGF-β1, collagen I and fibronectin gene expression compared with irradiated hCoSMCs alone (Figure 3C, blue dots). Expression in irradiated hIFs and irradiated hCoSMCs cocultured with MSCs silenced for HGF (irradiated + hMSCs siHGF) or silenced for TSG-6 (irradiated + hMSCs siTSG-6) was compared to irradiated hIFs and irradiated hCoSMCs. HGF silencing in MSCs lead to an overexpression of collagen III and fibronectin in irradiated hCoSMCs (Figure 3C, brown (siHGF) and green (siTSG-6) dots). TSG-6 silencing in MSCs induced upregulation of α-SMA, collagen III and fibronectin gene expression in irradiated hIFs (Figure 3B, green dots). The results are in favor of the anti-fibrotic potential of MSCs. We confirmed that both HGF and TSG-6 may play a role in MSC-mediated inhibition of colorectal-fibrosis in vitro.

2.4. MSCs Limit Proliferation of ECM-Producing Cells

The action of MSCs on intestinal fibroblasts to inhibit fibrosis was investigated in vivo. During fibrosis in the colon and rectum, subepithelial myofibroblasts that are located inside mucosa and SMCs inside muscularis mucosa and muscularis propria are responsible for synthesis of pathological ECM. To determine whether inhibition of ECM accumulation by MSCs was related to suppressive effect of pro-fibrotic cells, amount of myofibroblasts was quantified into mucosa. The results are compared to those from the Control group. Expression of α-SMA, which is a main marker of differentiated myofibroblasts, was decreased in colon–rectum area of in Irradiated + MSCs group, four weeks after irradiation (Figure 4A, blue dots), suggesting a reduction in myofibroblast proliferation. Four and 5 weeks after irradiation, MSC injection significantly reduced density of α-SMA positive cells in mucosa in the colon–rectum area (Figure 4D–E, blue dots) compared to that in the Irradiated group, (Figure 4D–E, red dots). Interestingly, while there was a high number of α-SMA positive cells in mucosa (Figure 4C, dark arrows) in the Irradiated group, submucosa showed no evidence of myofibroblastic differentiation, and α-SMA expression was restricted to blood vessels despite a marked increase in ECM deposition. MSCs also suppressed overexpression of insulin-like growth factor 1 (IGF-1), which is a major regulator of SMC maturation, and regulates their ECM secretory properties in the Irradiated + MSCs group, (Figure 4B, blue dots). MSCs, thus, appear to reduce ECM production by inhibiting activation of pro-fibrotic cells after colorectal irradiation.

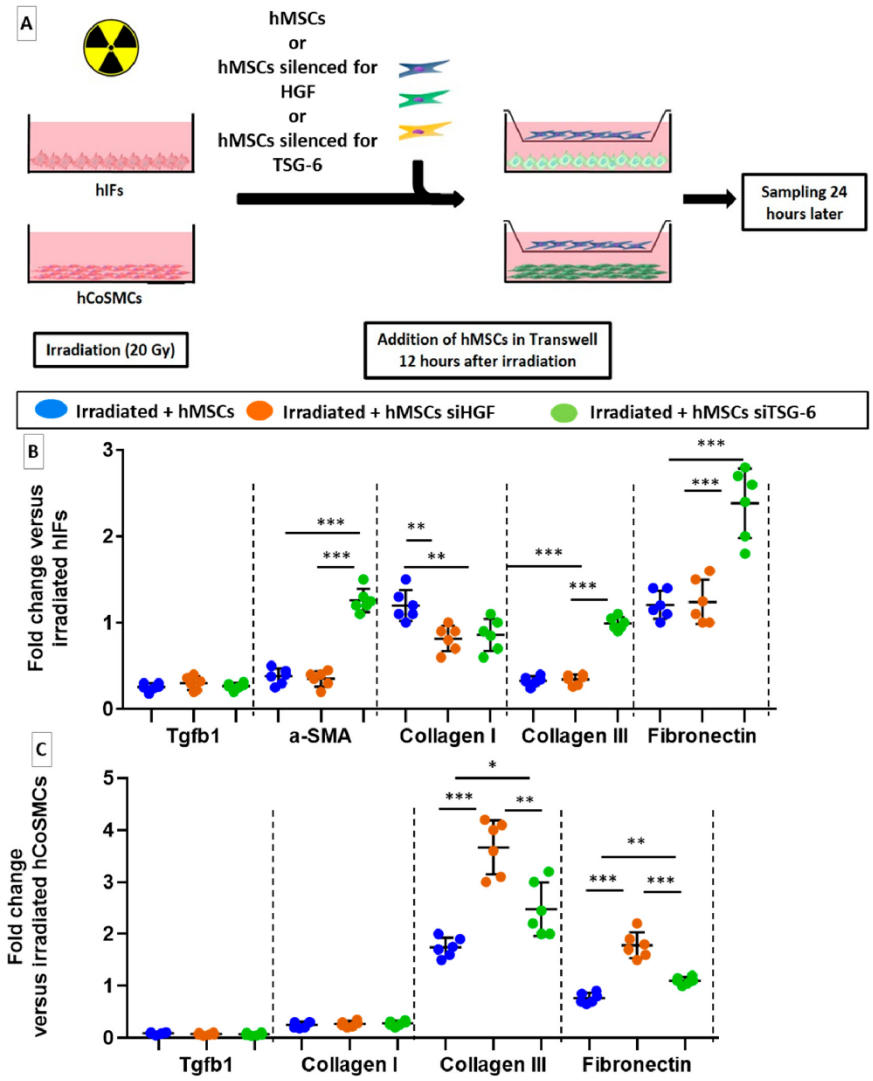


Figure 3. In vitro experiments show a direct effect of human MSCs and their effectors, HGF and TSG-6, on pro-fibrotic activity of irradiated hIFs and irradiated hCoSMCs. (**A**) hIFs and hCoSMCs were irradiated with a single dose of 20 Gy, and MSCs or MSCs silenced for HGF or TSG-6 were added to Transwell chambers 12 h after irradiation. (**B**,**C**) mRNA fold changes in fibrosis-related genes 24 h after MSC addition that are normalized to GAPDH and standardized against irradiated hIFs or irradiated hCoMSCs. (**B**) MSCs reduced common features of pro-fibrotic gene expression in irradiated hIFs and (**C**) irradiated hCoSMCs. (**B**) Silencing of TSG-6 in MSCs may counteract effect on α-SMA, collagen III and fibronectin expression in irradiated hIFs. (**C**) Silencing HGF in MSCs may counteract effect on collagen III and fibronectin expression in irradiated hCoSMCs. Two-group comparisons were performed with *t*-tests, while one-way ANOVAs, followed by Bonferroni *t*-tests, were used for multiple group comparisons. The results are expressed as mean ± SD. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

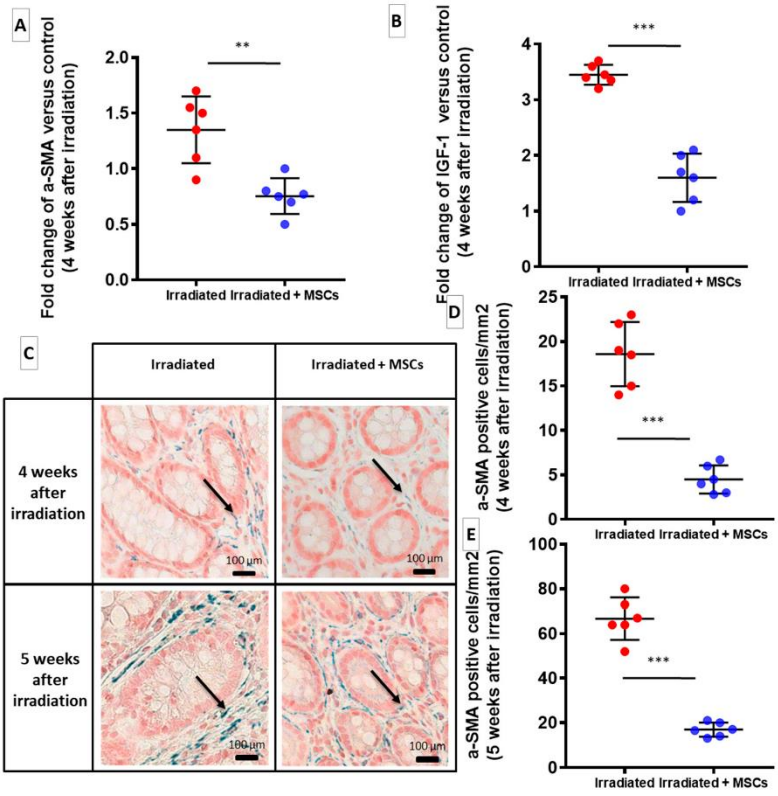


Figure 4. Involvement of myofibroblasts and SMCs in radiation-induced fibrosis and anti-fibrotic effects of MSCs. (**A**,**B**) mRNA fold changes of α-SMA and IGF-1, 4 weeks after irradiation and 1 week after the last MSC injection, which are normalized to Ywhaz and standardized against the Control group. (**A**) MSCs inhibit activation of α-SMA-positive myofibroblasts. (**B**) MSCs decrease expression of IGF-1, a potent activator of SMC's pro-fibrotic phenotype. (**C**) Representative histological images of paraffin-embedded slides of colon–rectum samples stained for α-SMA (black arrows): 4 weeks and 5 weeks after irradiation (Irradiated: left; Irradiated + MSCs: right; original magnification: 100×). (**D**,**E**) Quantification of α-SMA-positive cells in mucosa of colon–rectum area of Irradiated groups with or without MSC therapy. MSCs significantly decrease number of α-SMA-positive cells in mucosa of irradiated rats 4 weeks (**D**) and 5 weeks (**E**) after irradiation. Each group of animals was composed of 6 rats. The results of each group were compared as follows: Irradiated group was compared to Control group; Irradiated + MSCs group was compared to control and Irradiated group. Two-group comparisons were performed with *t*-tests, while one-way ANOVAs, followed by Bonferroni *t*-tests, were used for multiple group comparisons. The results are expressed as mean ± SD. **: $p < 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

2.5. MSCs Delay Fibrosis by Favoring Th2/M2 Response

In previous studies, we have shown the regenerative effect of MSCs colorectal damages induced by radiation exposure in pigs [13] and rats [14,16–18]. In these studies, MSCs appear to act through immunomodulation [13,14,18]. Based on these studies, we have investigated whether a treatment with MSCs may modulate MSC Th2 and M2 responses as mechanisms to reduce fibrosis in the colon after irradiation. Macrophages and T cells

are involved in fibrosis development through various mechanisms, potentially regulating fibrogenesis. Principally, the reports have revealed that MSCs could act on fibrosis by orienting polarization of macrophages and differentiation of CD4+ T cells [13]. The results are compared to those from the Control group. During the initiation phase of fibrosis, at four weeks after irradiation, an increase in alternatively activated macrophages (M2) was measured by evaluating arginase-1 transcripts (Arg-1) in Irradiated + MSCs group, (Figure 5A, blue dots). In Irradiated group, a decrease in proportion of M2 macrophages was quantified on paraffin-embedded slides that were stained with fluorescent antibodies directed against macrophage M2 marker CD206 (Figure 5D,E red dots). In irradiated + MSCs group, M2 polarization was increased (Figure 5B, blue dots) compared to that in Irradiated group (Figure 5B, red dots). Five weeks after irradiation, M2 promotion appeared to persist as mannose receptor gene (Mrc-1), which is expressed by M2 macrophages, was overexpressed in the Irradiated + MSCs group (Figure 5B, blue dots) compared to the Irradiated group (Figure 5B, red dots). Since T-helper type 2 response supports alternative activation of macrophages, Gata3/T-bet ratio of gene expression was evaluated. A higher ratio in the Irradiated + MSCs group (Figure 5C blue dots) compared to the Irradiated group was measured indicating a shift towards Th2 differentiation in T cells (Figure 5C red dots). MSCs may promote a burst in Th2/M2 cells, which might be necessary to effective degradation of pathological ECM. These cells have previously been associated with anti-inflammatory and ECM remodeling activity, particularly during fibrosis. Data showed that MSC injection might promote M2 and Th2 polarization finally reducing fibrosis in colon. The MSC-mediated regeneration in the colon–rectum area induced a significant improvement in the animals' survival. While 30% of the irradiated rats died before day 50 (Figure 5E red line), there was a 100% survival rate during the same time period in the MSC group (Figure 5F blue line). The reduction in the ECM deposition could, thus, ameliorate survival, most notably by restoring tissue functionality and preventing occlusion.

2.6. HGF Silencing in Transplanted-MSCs May Promotes Fibrosis through a TGF-β-Dependent Mechanism

Finally, in order to confirm the involvement of HGF and TSG-6 in MSC-induced effects against colorectal fibrosis, rats were injected with MSCs that were silenced for HGF (Irradiated + MSCs HGF group) or TSG-6 (Irradiated + MSCs TSG-6 group). The effect of HGF silencing was presented here, then in the following paragraph the effect of TSG-6 silencing. We retained to focus effect on established fibrosis. For this reason, we measured consequence of transplanted MSCs silencing for HGF in Irradiated + MSCs siHGF group at 7 weeks after irradiation. To check the effect of silencing, we compared Irradiated + siHGF (or siTSG-6) group with Irradiated group. HGF is a potent anti-fibrotic protein with pleiotropic activities, including immunosuppression and inhibition of TGF-β signaling. Because HGF has been shown to mediate anti-fibrotic effects of MSCs, RNA interference was used to knockdown HGF gene in MSCs prior to their injection in irradiated rats as described in Figure 6A. The knockdown of HGF in transplanted MSCs (Irradiated + MSCs siHGF) suppressed inhibition of TGF-β and ECM-related genes. Seven weeks after radiation exposure, TGFβ-1, TGFβ-2, TGFβ-3 and CTGF were upregulated in the colon–rectum area of animals transplanted with HGF-silenced MSCs (Irradiated + MSCs siHGF, Figure 6B, brown dots) compared to those in irradiated + MSCs group (blue dots). Concomitantly, collagen I, collagen III, fibronectin and spark (PAI-1), MMP-3, 9, 12, 13, TIMP-1, serpine-1 were overexpressed (Figure 6B,C, brown dots) in Irradiated + MSCs siHGF group. The stimulation of pro-fibrotic mechanisms resulted in an accumulation of pathological ECM, to a level comparable to that observed in non-transplanted irradiated rats. Thus, HGF that was secreted by MSCs in Irradiated + MSCs siHGF group prevented TGF-β mediated activation of fibrogenic pathways and consequent fibrosis as illustrated in Irradiated + MSCs siHGF group (Figure 6D brown dots) in comparison of Irradiated + MSCs group (Figure 6D blue dots).

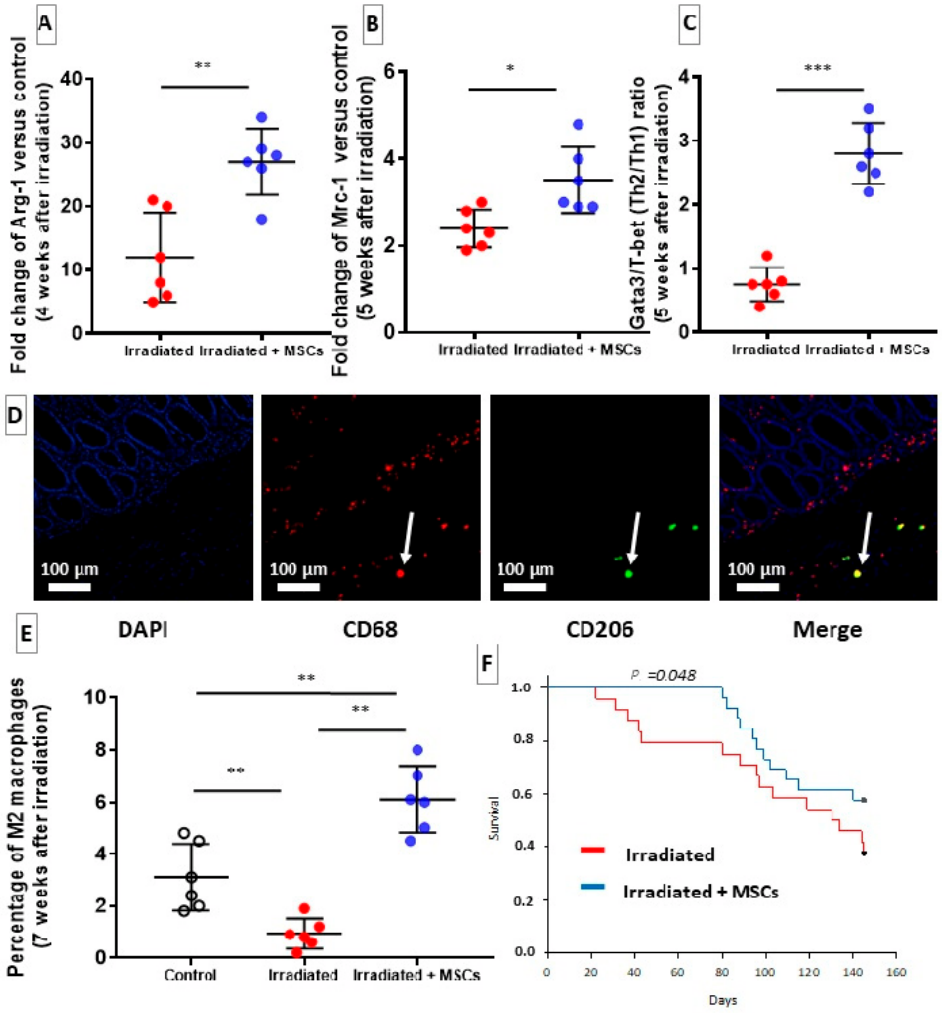


Figure 5. Effect of MSC transplantation on macrophage polarization in irradiated colon–rectum area. (**A**,**B**) mRNA fold changes of M2 markers Arginase-1 and Mannose Receptor-1 that are normalized to Ywhaz and standardized against control. (**C**) MSCs inverted Th2/Th1 balance in favor of Th2 cells 5 weeks after irradiation, as shown by increased Gata3/T-bet ratio gene expression. (**D**) M2 polarization was identified by co-staining paraffin-embedded tissue slides with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (cell nuclei, blue), CD68 antibody (red) and CD206 antibody (green). M2 macrophages are shown in yellow (merge) (original magnification: 100×). MSC injection induced a strong M2 polarization of macrophages 4 weeks after irradiation. (**E**) MSCs favor M2 polarization compared to control and Irradiated group. (**F**) Survival curve of Irradiated group (red line, n = 24) and Irradiated + MSCs group (blue line, n = 26). Risk comparison analysis showed a significant increase in survival after MSC transplantation ($p = 0.048$). Each group of animals was composed of 6 rats. Results of each group were compared as follows: Irradiated group was compared to Control group; Irradiated + MSCs group was compared to control and Irradiated group. Two-group comparisons were performed with *t*-tests, while one-way ANOVAs, followed by Bonferroni *t*-tests, were used for multiple group comparisons. Survival curves were compared with the log-rank test. The results are expressed as mean ± SD. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

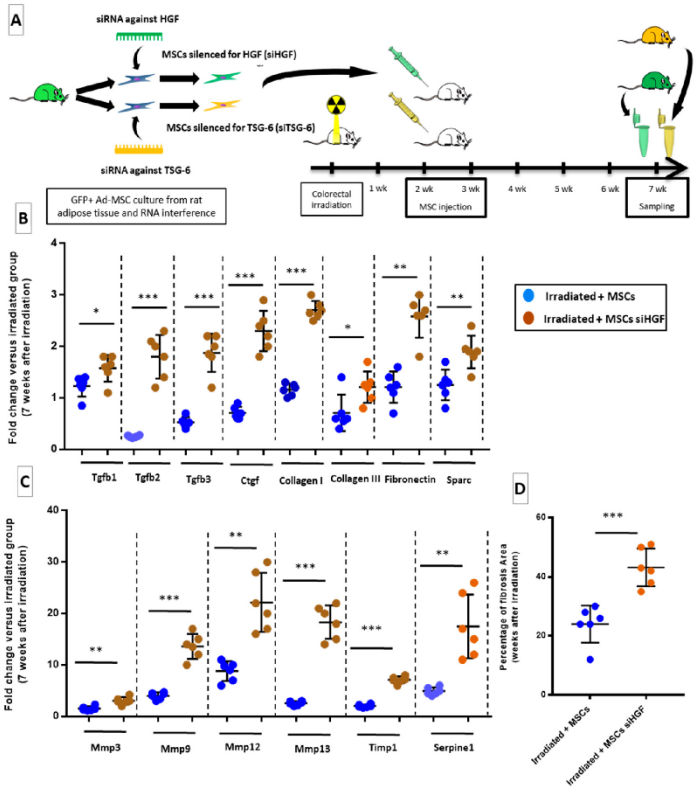


Figure 6. HGF silencing in transplanted MSCs induces pro-fibrotic signals in irradiated rats and stimulates ECM production (7 weeks after irradiation) (**A**) Protocol: two distinct groups of rats were injected with MSCs that were silenced for HGF and TSG-6 genes. (**B**,**C**) mRNA fold changes of genes 7 weeks after irradiation that are normalized to Ywhaz and standardized against irradiated group. MSCs silenced for HGF induce a significant remodeling in the colon–rectum area of irradiated rats, mainly by activating TGF-β signaling. (**B**) mRNA fold changes in genes encoding TGF-β family and ECM components. (**C**) mRNA fold changes in genes encoding MMPs, TIMP-1 and serpine-1 (PAI-1). (**D**) Percentage of fibrosis area quantified on Picrosirius Red-stained paraffin-embedded slides show a significant increase in ECM deposition after transplantation of MSCs silenced for HGF. Each group of animals was composed of 6 rats. The results of each group were compared as follows: Irradiated + MSCs siHGF and Irradiated + MSCs siTSG-6 groups were compared to Irradiated + MSCs group. Two-group comparisons were performed with *t*-tests, while one-way ANOVAs, followed by Bonferroni *t*-tests, were used for multiple group comparisons. The results are expressed as mean ± SD. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

2.7. TSG-6 May Inhibit Fibrosis by Deregulating Macrophage Polarization

By silencing TSG-6 in the MSCs, the TSG-6 role in suppressing colon fibrosis was investigated. Effect of transplanted MSCs silencing for TSG-6 was evaluated on an established fibrosis, 7 weeks after irradiation. TSG-6 protein is produced during inflammation. TSG-6 is involved in hyaluronan-induced leucocyte recruitment. Thus, immunomodulatory and anti-fibrotic properties of MSCs have been previously partially associated with their production of TSG-6. A TSG-6 knockdown in MSCs by RNA interference was performed (Irradiated + MSCs TSG-6). In irradiated + MSCs siTSG-6 group an upregulation of IGF-1 and collagen I and III (Figure 7A, green dots) was evidenced. Since TSG-6 protein was described as able to influence macrophage polarization, as observed in our model, proportion

of M2 macrophages in the Irradiated + MSCs TSG-6 group was quantified (Figure 7B). In the Irradiated + MSCs TSG-6 group a significant increase in proportion of M2 macrophages (Figure 7B, green dots) was evidenced compared to Irradiated + MSCs group (Figure 7C, blue dots). Finally, ECM deposition was significantly increased in the colon–rectum area of Irradiated + MSCs—TSG-6-treated rats (Figure 7C, green dots) compared to that in Irradiated + MSCs group (Figure 7C, blue dots). Similar to HGF, TSG-6 secretion by MSCs could be necessary for anti-fibrotic effects.

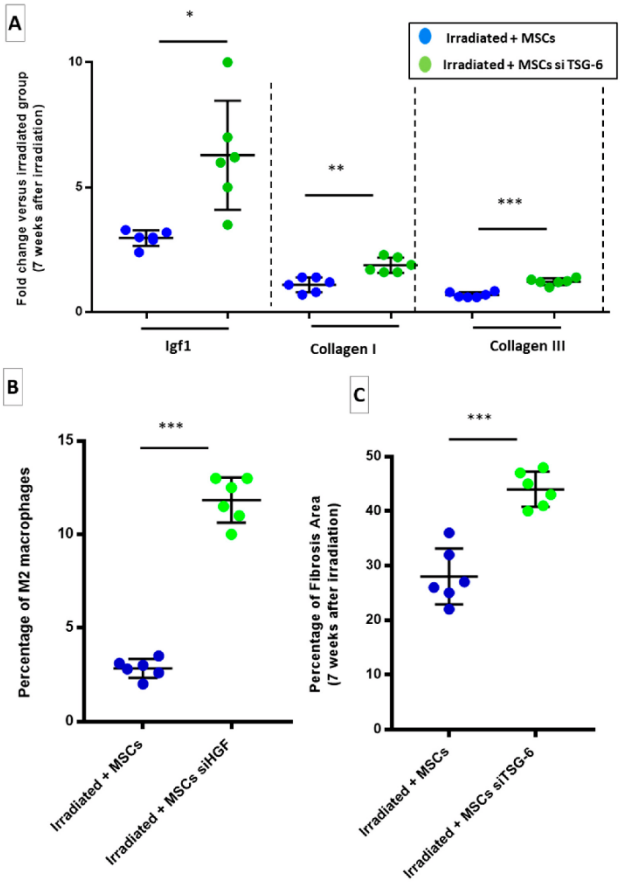


Figure 7. TSG-6 silencing in transplanted MSCs induces pro-fibrotic signals in irradiated rats and stimulates ECM production (7 weeks after irradiation). (**A**) mRNA fold changes in fibrosis-related genes 7 weeks after irradiation that are normalized to Ywhaz and standardized against irradiated group. MSCs silenced for TSG-6 induce a strong remodeling in colon–rectum area of irradiated rats, mainly by collagen produced by SMCs activated by IGF-1. (**B**) Percentage of M2 macrophages 7 weeks after irradiation (4 weeks after MSC injection) as identified by CD68-CD206 co-staining. MSCs silenced for TSG-6 stimulate chronic activation of pro-fibrotic M2 macrophages. (**C**) Percentage of fibrosis area quantified on Picrosirius Red-stained paraffin-embedded slides show a significant increase in ECM deposition after transplantation of MSCs silenced for TSG-6. Each group of animals was composed of 6 rats. The results of each group were compared as follows: Irradiated + MSCs siHGF and Irradiated + MSCs siTSG-6 groups were compared to Irradiated + MSCs group. Two-group comparisons were performed with *t*-tests, while one-way ANOVAs, followed by Bonferroni *t*-tests, were used for multiple group comparisons. The results are expressed as mean ± SD. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

3. Discussion

Colorectal fibrosis is a feature of many chronic inflammatory disorders, including Crohn's disease and severe chronic complications of pelvic radiotherapy. Efficient therapy for these disorders has not been set up so far. MSCs exert various anti-fibrotic effects in human and animal models. MSCs have regenerative and anti-inflammatory properties that have been used to treat inflammatory pathologies, including graft-versus-host disease (GvHD) [19] and radiological burns [20]. In this report, our results imply that MSCs limit activation of pro-fibrotic cells, particularly myofibroblasts, SMCs and macrophages, by releasing HGF and TSG-6.

Our in vivo study confirms the anti-fibrotic effect of MSCs by controlling ECM turnover. The in vitro results suggest that HGF and TSG-6 act via different mechanisms on myofibroblasts and SMCs. MSCs that are silenced TSG-6 appears to have a selective effect on hIFs and MSCs silenced HGF have a selective effect on HCoSMCs. MSCs that are silenced for HGF induced a strong upregulation of collagen III and fibronectin in HCoSMCs. TSG-6 silencing in MSCs may induce an upregulation of myofibroblasts marker α-SMA and genes encoding collagen III and fibronectin. To settle these results, it would be necessary to validate the involvement of HGF and TSG-6 by a neutralizing antibody study. In agreement with previous studies on fibrosis, we observed that HGF and TSG-6 may exert complementary function necessary for anti-fibrotic effects of MSCs during radiation-induced fibrosis [21–23].

Our in vivo study shows that, following irradiation, a dense population of α-SMA positive sub-epithelial myofibroblasts was evidenced, which likely accounted for ECM deposition in mucosa. α-SMA expression was restricted to blood vessels nevertheless to confirm that the α-SMA increase corresponds to an increase in capillary formation, a CD31 labelling might be necessary. MSC transplantation, induced a decrease of myofibroblast population that could explain lower ECM gene expression. Moreover, the colon–rectum area of the MSC-treated animals exhibited a lower CTGF expression. CTGF prolongs fibrogenesis during chronic stage of radiation-induced fibrosis [24]. Indeed the downregulation of CTGF could, thus, reduce pro-fibrotic signals in tissue, including myofibroblastic differentiation [1]. Furthermore, thickening of the muscularis propria and ECM deposition surrounding muscle fibers after irradiation support involvement of pro-fibrotic SMCs that we observed in accordance with a previous study [14]. We have shown that the most important effect of the HGF silencing is the upregulation of genes encoding TGF-β, ECM components, MMP and TIMP. The consequence was an in favor of an increased fibrosis. Our results are in accordance with a previous study which demonstrated that MSCs that overexpress HGF produce improved anti-fibrotic effects on lung and liver fibrosis compared to wild-type MSCs [21–23]. This report puts forward that MSCs secrete HGF, which may be necessary to maintain low TGF-β signaling, resulting in inhibition of fibrogenesis as previously reported in other models of fibrosis [1].

Similarly, TSG-6 silencing in transplanted MSCs resulted in an increase in ECM deposition in the colon and rectum. This result is in agreement with previous studies which establish that TSG-6 is involved in regulation of pro-inflammatory and pro-fibrotic hyaluronan activity [25,26]. TSG-6 secreted by MSCs could participate in regulation of macrophage activity. MSC treatment induced a significant increase in M2/M1 ratio of macrophage polarization, which was supported by Th2 immune response. In agreement with previous reports, we hypothesize that MSCs might limit fibrosis, by modulating macrophage polarization [1].

The impact of HGF and TSG-6 silencing may highlight importance of secretion of a wide range of factors by therapeutic MSCs. Compared to pharmacological treatments, MSC therapy offers advantage of providing a pleiotropic response by activating multiple mechanisms instead of acting on a single pathway.

4. Materials and Methods

We retained the use of human cells to identify key effectors secreted by MSCs on cell types which induced colon fibrosis. Then, the results were validated in a rat model of colon fibrosis.

4.1. In Vitro Experiments

A co-culture system was implemented to investigate influence of MSCs on intestinal fibroblasts and colonic smooth muscle Cells that are responsible for colon fibrosis. Human MSCs were cultured in a minimal essential medium α containing 20% FBS, 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine, which were obtained from Thermo Fisher Scientific (Illkrich, France). Cells were used between passages 2 and 5.

Primary human colonic smooth muscle cells (hCoSMCs, ref: 2940) and human intestinal fibroblasts (hIFs, ref: 2920-SC) were obtained from ScienCell (6076 Corte Del Cedro, Carlsbad, CA 92011, USA) and cultivated, respectively, in smooth muscle Growth Medium-2 (SmGM-2™, ref: CC-3182) and Fibroblasts Growth Medium-2 (FGM-2™, ref: CC-3132), which were obtained from Lonza Verviers (Verviers, Belgium).

In summary, 6000 MSCs/cm^2 were seeded on Transwell® chambers with 0.4 µm pores (Corning Life Sciences) and hIFs or hCoSMCs were seeded on 6-well plates (Falcon) at a density of 6000 and 5000 cells/cm^2, respectively. After 4 days, hIFs and hCoSMCs were irradiated with a single dose of 20 Gy (2.43 Gy/min) to induce pro-fibrotic phenotype. After 12 hours, MSCs (upper part of transwell) were transferred to hIF and hCoSMC cultures. HIFs and hCoSMCs were collected 12 hours after transfer, and dry cell pellets were stored at −80 °C prior to RNA extraction. Additional details regarding this protocol are provided in Figure 3A.

4.2. RNA Interference against HGF and TSG-6

HGF and TSG-6 are major effectors of anti-fibrotic effect of MSCs as evidenced by both in vitro and in vivo experiments. HGF and TSG-6 genes were silenced in MSCs in both in vitro co-culture and in vivo transplantation experiments. ON-TARGETplus SMARTpools of siRNAs, which were designed to improve knockdown efficiency, and other transfection reagents were purchased from GE Healthcare Sa (Vélizy-Villacoublay, France). SiRNAs used in these experiments were specific for following genes: human HGF (reference L-006650-00-0050), rat HGF (reference L-089896-02-0050), human TSG-6 (ref: L-012379-00-0050) and rat TSG-6 (ref: L-108341-00-0050). The transfection of human and rat MSCs was performed as instructed by manufacturer. In brief, human or rat MSCs were seeded at a density of 3000 cells/cm^2. Cells were transfected at 80% confluence with a solution containing 2 µL/mL Dharmafect1 (ref: T-2001-03) and 1 µM of siRNA in a complete MSC growth medium (as described before). A preliminary experiment was performed to assess silencing efficiency. RNA interference against GAPD gene was used as a positive control (ON-TARGETplus GAPD Control Pool, ref: D-001830-10-05), and a non-targeting siRNA served as a negative control (ref: D-001810-10-05). mRNA was extracted from these cells, and expression levels of HGF and TSG-6 were quantified using RT-qPCR. In in vitro and in vivo experiments, MSCs were used 48 hours after transfection, when silencing was most effective. The silencing of HGF and TSG-6 genes is effective over a period of one week.

4.3. In Vivo Experiments

All experiments were implemented in agreement with French laws and guidelines for animal experiments (Act no. 92–333 of 2 October 2009) and approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation "CEEA number 810" (Protocol numbers: P09–10). In total, 104 Sprague–Dawley (SD) male rats (300 g) were purchased from Janvier Labs (LeGenest St Isle, France). eGFP transgenic rats (strain "green rat CZ-C04 Tg Act eGFP") derived from Sprague–Dawley strain were obtained by the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN) from Pr. Otabe (Osaka University, Osaka, Japan)

with MTA and subsequently bred in the IRSN's animal housing facility. The progeny of the eGFP rats were systematically tested for expression of transgene. Transgenic rats were used as the source of the GFP-labelled MSCs. The animals were housed in double-decker cages (two or three per cage) with ad libitum access to food and water and light and dark cycles. All efforts were made to minimize suffering, and all experiments were performed under gaseous anesthesia with isoflurane (Aerrane, Baxter SA, Lessines, Belgium). Animal behavioral and physiological parameters (e.g., bleeding and diarrhea) were monitored daily, and suffering animals were euthanized. Euthanasia was performed in a Co_2 chamber. Sprague–Dawley rats, aged ten weeks (250–300 g) at the beginning of experiment, were divided into 2 batches. The Control batch consisted of 6 animals that were neither irradiated nor injected with MSCs ("Control" group). Other batch underwent colorectal irradiation, followed by transplantation of MSCs. In total, 18 animals were irradiated without the MSC transplantation ("Irradiated" group), and 18 animals received injections with wild-type MSCs ("Irradiated + MSCs" group). Additional details of protocol are shown in Figure 2A. Finally, two groups of 6 animals received GFP-MSCs that were silenced for either HGF ("Irradiated + MSCs siHGF" group) or TSG-6 ("Irradiated + MSCs siTSG-6" group). Additional details are provided in Figure 6A.

In another experiment, 24 rats were irradiated, and 26 rats were irradiated and injected with MSCs according to the protocol described above to determine effect of the MSCs on survival of the irradiated rat (Figure 5F).

4.4. Isolation, Characterization and Culture of MSCs

GFP-MSCs were extracted from adipose tissue obtained from seven-week-old eGFP transgenic rats as previously described [14]. Briefly, subcutaneous inguinal adipose tissue was removed from eGFP-SD rats, finely minced and enzymatically digested with 0.1% collagenase type I (reference: C0130, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) at 37 °C, and then filtered through a 30 µm filter. This process was repeated three times, and remaining collagenase was neutralized with 10% Foetal Bovine Serum (FBS) in extract. Cells were washed with Phosphate Buffered Saline (PBS) and suspended in MEM-α containing 20% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin and 1% L-Glutamine. Cells were seeded at 1000 cells/cm^2, and medium was changed after 4 days. On day 7, a monolayer of adherent cells was trypsinized (trypsin-0.25% EDTA, Thermo Fisher Scientific), washed three times with PBS and suspended in 10 millions of cells/mL. Phenotype of amplified Ad-MSCs was verified by flow cytometry. Presence of CD90 (clone OX-7; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and CD73 (clone 5F/B9; BD Biosciences) was assessed in culture, and absence of haematopoietic lineage cells was verified with CD34 (clone ICO115; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA) and CD45 (clone OX-1; BD Biosciences) markers. Controls were performed using isotype identical antibodies. Adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation capacity of MSCs was evaluated as described by Rochefort et al. 25. The ability to form Colony-Forming Unit Fibroblasts (CFU-F) was also analysed. CFU-Fs were stained with crystal violet and counted 10 days after initial seeding.

4.5. Configuration of Irradiation, MSC Treatment and Tissue Sampling

Rats were exposed to an X-ray source (2.43 Gy/min) and received a single radiation dose of 29 Gy as previously described [14]. Radiation field was confined to a 2 × 3 cm window that was localized to colon–rectum area. According to our previous studies, the groups of rats treated ("Irradiated + MSCs" group) were injected twice weekly with quantity of 5 million of adipose MSCs via the tail vein. Injections occurred before fibrosis at 2 and 3 weeks after irradiation during initiation of fibrosis. To investigate the effect of the MSC therapy on the radiation-induced fibrogenesis, rats were euthanized during the first phase of fibrosis (4 weeks), intermediate phase (5 weeks) and the phase of established fibrosis (7 weeks) after the irradiation. Rats that received MSC-siHGF or MSC-siTSG-6 ("Irradiated + MSCs siHGF" group and "Irradiated + MSCs siTSG-6" group) were euthanized 7 weeks after the irradiation. Colon and rectum were sampled to evaluate the

progression of the radiation-induced lesions (e.g., mucosal damage and ECM deposition). Additional details regarding this protocol are provided in Figures 2A and 6A. Euthanasia was performed under isoflurane anesthesia. After euthanasia, we sampled 3 cm of the colon–rectum area, which was included in the radiation field. The colon–rectum area was opened lengthwise, separated into 3 longitudinal sections and processed for future experiments. RNALater® (ref: AM7024, Qiagen, Les Ulis, France) was used to preserve samples that were used for gene expression analysis. For protein quantification, samples that were used for RNA extraction were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C. Final sections were immersed in 4% buffered formaldehyde, dehydrated and paraffin-embedded. Each group of animals was composed of 6 rats for a given period of time (e.g., 6 weeks). The results of each group were compared as follows: Irradiated group was compared to Control group; Irradiated + MSCs group was compared to control and Irradiated group; and Irradiated + MSCs siHGF and Irradiated + MSCs siTSG-6 groups were compared to Irradiated + MSCs group.

4.6. RNA Isolation, Reverse Transcription, Quantitative Real-Time PCR, and Array Analysis

Tissue and cell total RNA were extracted using RNeasy® Mini Kit (ref: 74106, Qiagen) from cell cultures and RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (ref: 74704) from colon–rectum samples. Rat samples were first disrupted using TissueRuptor disposable probes (ref: Qiagen). Purity and concentration of RNA extracts were assessed by spectrophotometry before reverse transcription. One µg of mRNA was used to produce cDNAs for each sample using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ref: 4368813, Thermo Fisher Scientific). RT-qPCR was performed using TaqMan® Universal PCR Master Mix (ref: 4326708) and TaqMan® Gene Expression Assays (ref: 4331182), which were purchased from Thermo Fisher Scientific. QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (ref: 4471090, Thermo Fisher Scientific) was used to evaluate gene expression profiles. Gene expression data analysis was performed using QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR Software and ExpressionSuite Software 1.1 (Thermo Fisher Scientific). Relative Quantity (RQ) of each gene was calculated using the 2-ΔΔCt method. In the in vitro experiments, GAPDH served as an endogenous control, and irradiated cells were selected as reference group. The gene expression profiles of rats were assessed using Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta (Ywhaz) as an endogenous control. Gene-specific Taqman probe and primer sets were obtained from Thermo Fisher Scientific as Assays-on-Demand gene expression products. For the in vitro study, the identification numbers were Hs00998133_m1for TGF-β1, Hs00426835_g1 for α-SMA, Hs00164099_m1 for collagen I, Hs00943809_m1 for collagen III, Hs00365052_m1 for fibronectin and Hs02758991_g1 for the human GAPDH endogenous control. For the in vivo study, the identification numbers were Rn00572010_m1 for TGF-β1, Rn00676060_m1 for TGF-β2, Rn00565937_m1 for TGF-β3, Rn01526721_m1 for collagen I, Rn01437681m1 for collagen III, Rn00692663_m1 for fibronectin, Rn01470624_m1 for SPARC, Rn01759928 for MMP-2, Rn00579162m1 for MMP-9, Rn01448194_m1 for MMP-13, Rn00579172_m1 for MMP-14, Rn01481341_m1 for Serpine-1, Rn00567777_m1 for Serpinh1, Rn01430873_g for TIMP-1, Rn00573232_m1 for TIMP-2, Rn00441826_m1 for TIMP-3, Rn01459160_m1 for TIMP-4, Rn00710306_m1 for IGF-1, Rn00583646_m1 for akt1, Rn00591471_m1 for ilk and Rn00755072_m1 for ywhaz the rat endogenous control.

4.7. Protein Extraction, Quantification and ELISAs

Tissue samples that were stored at −80 °C were thawed and finely minced prior to protein extraction. Proteins were extracted by tissue disruption using TissueRuptor (Qiagen) in ice-cold PBS containing protease inhibitors (Complete Mini, Roche SAS, Boulogne-Billancourt, France). After centrifugation, protein concentration was assessed in supernatants using Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). ELISAs for rat MMP-2 (ref: EK0639, Boster Biological Technology Co., Ltd., Pleasanton, CA, USA), MMP-9 (ref: E-EL-

R0624, Elabscience Co., Ltd., Wuhan Shi, China) and TGF-β1 (ref: EK0514, Boster Biological Technology Co., Ltd.) were performed as instructed by their respective manufacturers.

4.8. Histology and Immunohistochemistry (IHC)

The paraffin-embedded samples were cut into 4 µm sections and stained with Hematoxylin-Eosin-Safran (HES) or PicroSirius (Direct Red 80, ref: 365548-25G, Sigma-Aldrich®, Lyon, France). The lengths and fibrosis areas in full-length longitudinal tissue sections were analysed. ECM areas were automatically measured using Histolab software (Microvision Instruments, Lisses, France) to automatically detect Picrosirius stained surfaces (magnification 40×). Percentage of fibrosis area was obtained by dividing ECM area by total surface of tissue in each field, which was manually measured by Histolab. For immunohistochemical protocols, paraffin-embedded sections were dewaxed, rehydrated, and then permeabilized with a solution containing 0.1% Triton (N3020-100 ML, Sigma-Aldrich) to characterize myofibroblast. The staining of α-SMA required an extra step in methanol solution containing 0.3% H_2O_2 to inhibit endogenous peroxidases. The antigen retrieval was performed by 3 × 5 min microwave cycles in Target Retrieval Solution (ref: S169984-2, Agilent Technologies, Les Ulis, France). Primary antibodies against α-SMA (ref: A2547, Sigma-Aldrich), CD68 (ab125212, Abcam, Paris, France) and CD206 (bs-2664R, Bioss antibodies™, Woburn, MA, USA) were used for myofibroblast and macrophage quantification. We used an HRP Horse Anti-Mouse IgG secondary antibody (ref: PI-2000, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) and Histogreen (ref: E109, Linaris, Dossenheim, Germany) to reveal α-SMA staining, followed by a counterstaining with Nuclear Fast Red solution (ref: N3020, Sigma-Aldrich). For co-staining of CD68 and CD206, secondary antibodies that were conjugated with fluorescent dyes Alexa Fluor 568 (Goat anti-Rabbit, red, ref: A-11011, Thermo Fisher Scientific) and Alexa Fluor 488 (Donkey anti-Rabbit, green, ref: A-21206, Thermo Fisher Scientific) were employed, respectively to characterized M2 macrophage. The fluorescent slides were mounted with Vectashield® HardSet Antifade Mounting Medium with DAPI (ref: H-1500, Vector Laboratories, Inc.) to show cell nuclei in blue under a fluorescence microscope. We used Fiji software (Fiji Is Just ImageJ, http://imagej.net/Fiji) to perform measurements on these slides. Myofibroblasts and M1 and M2 macrophages were numbered on their respective slides with 5 fields per sample (magnification: 100×), and total surface of tissue in each field was measured to calculate cell density. M1 macrophages stained positive for CD68 only (red) and negative for CD206 (green), while M2 macrophages appeared yellow because they stained positive for both CD68 and CD206. Staining was correlated with corresponding PCR results.

4.9. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SigmaPlot v11 (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany). Two-group comparisons were performed with *t*-tests, while one-way ANOVAs, followed by Bonferroni *t*-tests, were used for multiple group comparisons. Survival curves were compared with log-rank test. The results are expressed as mean ± SD. A value of $p \leq 0.05$ is considered statistically significant. In figures, asterisks correspond to $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.05$ (*).

A Log-Rank survival analysis was performed using R (R Foundation). The competitive risk methodology was used to discriminate between non-radiation-related deaths (during anaesthesia or MSC injection) and radiation-induced mortality.

5. Conclusions

Fibrosis is a leading cause of death in occidental countries, and therapies are palliative. The increasing number of patients with fibrosis requires innovative approaches. We identified for the first time two key effectors that are secreted in vivo by transplanted MSCs that limited the sustained progression of colon fibrosis. We characterized molecular mechanisms of these two effectors in inflammatory cells and pro-fibrotic cells and demonstrated their differing and complementary effects. These findings have important implications

for the use of radiotherapy in cancer patients and inflammatory bowel disease (IBD) and should encourage the clinical use of MSCs. These results further emphasize the potential of MSCs to influence the pathophysiology of fibrosis-related diseases, which represent a challenging area for future research.

Author Contributions: B.U. and A.C., conception of the study, manuscript writing, and final approval of the manuscript; B.U., study design, data collection, data analysis, interpretation of the data, and animal assistance; C.B., B.L., C.L., technical support; M.B., F.M. and C.B., manuscript revision and final approval of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: All experiments were implemented in agreement with French laws and guidelines for animal experiments (Act no. 92–333 of 2 October 2009) and approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation "CEEA number 810" (Protocol numbers: P09–10).

Informed Consent Statement: Not applicable.

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

Acknowledgments: The authors thank the Support Group to Animal Testing (GSEA, Groupe de Soutien à l'Experimentation Animale) of the IRSN for their excellent technical assistance. We would like to express our special appreciation and thanks to Choffel de Witte Ilma for proofreading and grammatical correction.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

Arg-2	Arginine 2
CD	Crohn's Disease
CFU-F	Colony-Forming Unit-Fibroblasts
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DAPI	4′,6-diamidino-2-phenylindole
DOAJ	Directory of Open Access Journals
ECM	Extra Cellular Matrix
FBS	Foetal Bovine Serum
FGM	Fibroblasts Growth Medium
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GvHD	Graft-versus-Host Disease
hCoSMC	human Colonic Smooth Muscle Cells
HES	Hematoxylin-Eosin-Safran
HGF	Hepatocyt Growth Factor
hIF	human Intestinal Fibroblasts
IBD	Intestinal Bowel Diseases
IGF	Insulin-like Growth Factor
LD	Linear Dichroism
MDPI	Multidisciplinary Digital Publishing Institute
MMP	Matrix MetalloProteinases
MRC	Mannose Receptor
MSC	Mesenchymal stem cell
NOS-2	Nitric Oxide Synthase 2
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD-L1	Programmed Cell Death Ligand-1
NTRK	Neurotrophin Tyrosine Kinase Receptor
PRD	Pelvic Radiotherapy Disease
SERPINE -1	Serpin Family E Member 1

SERPINH 1	Serpin Family H Member 1
SMAD	Small Mother Against Decapentaplegic
SMC	Smooth Muscle Cells
SPARC	Secreted Pprotein Aacidic and Rrich in Ccysteine
TGF-β	Transforming Growth Factor β
Th	T-helper
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TLA	Three Letter Acronym
TSG-6	Tumor Necrosis Factor-stimulated gene 6
UC	Ulcerative Colitis
α-SMA	α-Smooth Muscle Actin

References

1. Usunier, B.; Benderitter, M.; Tamarat, R.; Chapel, A. Management of Fibrosis: The Mesenchymal Stromal Cells Breakthrough. *Stem Cells Int.* **2014**, *2014*, 340257. [CrossRef]
2. Haydont, V.; Vozenin-Brotons, M.C. Maintenance of radiation-induced intestinal fibrosis: Cellular and molecular features. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 2675–2683. [CrossRef]
3. Graham, M.F.; Bryson, G.R.; Diegelmann, R.F. Transforming growth factor beta 1 selectively augments collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* **1990**, *99*, 447–453. [CrossRef]
4. Meng, X.M.; Nikolic-Paterson, D.J.; Lan, H.Y. TGF-beta: The master regulator of fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* **2016**, *12*, 325–338. [CrossRef]
5. Strup-Perrot, C.; Mathe, D.; Linard, C.; Violot, M.; Milliat, F.; François, A.; Bourhis, J.; Vozenin-Brotons, M.-C. Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **2004**, *287*, G875–G885. [CrossRef]
6. François, A.; Milliat, F.; Guipaud, O.; Benderitter, M. Inflammation and Immunity in Radiation Damage to the Gut Mucosa. *Biomed. Res. Int.* **2013**, *2013*, 123241. [CrossRef] [PubMed]
7. The Global Cancer Observatory: International Agency for Research on Cancer: World Health Organization 2020 (Globocan). Number of New Cases in 2020 Both Sexes, all Ages and Number of Deaths in 2020, Both Sexes, All Ages. *November 2020.* Available online: https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf (accessed on 25 January 2021).
8. Breen, W.G.; Leventakos, K.; Dong, H.; Merrell, K.W. Radiation and immunotherapy: Emerging mechanisms of synergy. *J. Thorac. Dis.* **2020**, *12*, 7011–7023. [CrossRef] [PubMed]
9. Hauer-Jensen, M.; Denham, J.W.; Andreyev, H.J.N. Radiation enteropathy—Pathogenesis, treatment and prevention. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 470–479. [CrossRef] [PubMed]
10. Walters, J.R.; Wotherspoon, A.; Denham, J.W.; Hauer-Jensen, M. "Pelvic radiation disease": New understanding and new solutions for a new disease in the era of cancer survivorship. *Scand. J. Gastroenterol.* **2010**, *46*, 389–397.
11. Qi, Y.; Jiang, D.; Sindrilaru, A.; Stegemann, A.; Schatz, S.; Treiber, N.; Rojewski, M.; Schrezenmeier, H.; Beken, S.V.; Wlaschek, M.; et al. TSG-6 Released from Intradermally Injected Mesenchymal Stem Cells Accelerates Wound Healing and Reduces Tissue Fibrosis in Murine Full-Thickness Skin Wounds. *J. Investig. Derm.* **2014**, *134*, 526–537. [CrossRef]
12. Wu, H.; Yiu, W.H.; Li, R.X.; Wong, D.W.L.; Leung, J.C.K.; Chan, L.Y.Y.; Zhang, Y.; Lian, Q.; Lin, M.; Tse, H.-F.; et al. Mesenchymal Stem Cells Modulate Albumin-Induced Renal Tubular Inflammation and Fibrosis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e90883. [CrossRef]
13. Linard, C.; Busson, E.; Holler, V.; Strup-Perrot, C.; Lacave-Lapalun, J.-V.; Lhomme, B.; Prat, M.; Devauchelle, P.; Sabourin, J.-C.; Simon, J.-M.; et al. Repeated Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Injections Improve Radiation-Induced Proctitis in Pigs. *Stem Cells Transl. Med.* **2013**, *2*, 916–927. [CrossRef] [PubMed]
14. Bessout, R.; Demarquay, C.; Moussa, L.; René, A.; Doix, B.; Benderitter, M.; Sémont, A.; Mathieu, N. TH17 predominant T-cell responses in radiation-induced bowel disease are modulated by treatment with adipose-derived mesenchymal stromal cells. *J. Pathol.* **2015**, *237*, 435–446. [CrossRef] [PubMed]
15. Moussa, L.; Usunier, B.; Demarquay, C.; Benderitter, M.; Tamarat, R.; Sémont, A.; Mathieu, N. Bowel Radiation Injury: Complexity of the Pathophysiology and Promises of Cell and Tissue Engineering. *Cell Transpl.* **2016**, *25*, 1723–1746. [CrossRef] [PubMed]
16. Durand, C.; Pezet, S.; Eutamène, H.; Demarquay, C.; Mathieu, N.; Moussa, L.; Daudin, R.; Holler, V.; Sabourin, J.-C.; Milliat, F.; et al. Persistent visceral allodynia in rats exposed to colorectal irradiation is reversed by mesenchymal stromal cell treatment. *Pain* **2015**, *156*, 1465–1476. [CrossRef]
17. émont, A.; Demarquay, C.; Bessout, R.; Durand, C.; Benderitter, M.; Mathieu, N. Mesenchymal Stem Cell Therapy Stimulates Endogenous Host Progenitor Cells to Improve Colonic Epithelial Regeneration. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e70170.
18. Bessout, R.; Semont, A.; Demarquay, C.; Charcosset, A.; Benderitter, M.; Mathieu, N. Mesenchymal stem cell therapy induces glucocorticoid synthesis in colonic mucosa and suppresses radiation-activated T cells: New insights into MSC immunomodulation. *Mucosal Immunol.* **2014**, *7*, 656–669. [CrossRef]
19. Munneke, J.M.; Spruit, M.J.; Cornelissen, A.S.; van Hoeven, V.; Voermans, C.; Hazenberg, M.D. The Potential of Mesenchymal Stromal Cells as Treatment for Severe Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease: A Critical Review of the Literature. *Transplantation* **2016**, *100*, 2309–2314. [CrossRef]

20. Tamarat, R.; Lataillade, J.J.; Bey, E.; Gourmelon, P.; Benderitter, M. Stem cell therapy: From bench to bedside. *Radiat. Prot. Dosim.* **2012**, *151*, 633–639. [CrossRef]
21. Gazdhar, A.; Susuri, N.; Hostettler, K.K.; Gugger, M.; Knudsen, L.; Rotha, M.; Ochs, M.; Geiser, T. HGF Expressing Stem Cells in Usual Interstitial Pneumonia Originate from the Bone Marrow and Are Antifibrotic. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e65453. [CrossRef]
22. Seo, K.-W.; Sohn, S.-Y.; Bhang, D.-H.; Nam, M.-J.; Lee, H.-W.; Youn, H. Therapeutic effects of hepatocyte growth factor-overexpressing human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on liver fibrosis in rats. *Cell Biol. Int.* **2013**, *38*, 106–116. [CrossRef] [PubMed]
23. Lai, L.; Chen, J.; Wei, X.; Huang, M.; Hu, X.; Yang, R.; Jiang, X.; Shan, H. Transplantation of MSCs Overexpressing HGF into a Rat Model of Liver Fibrosis. *Mol. Imaging Biol.* **2015**, *18*, 43–51. [CrossRef] [PubMed]
24. Vozenin-Brotons, M.C.; Milliat, F.; Sabourin, J.C.; de Gouville, A.C.; Francois, A.; Lasser, P.; Morice, P.; Haie-Meder, C.; Lusinchi, A.; Antoun, S.; et al. Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2003**, *56*, 561–572. [CrossRef]
25. Sanggaard, K.W.; Scavenius, C.; Rasmussen, A.J.; Wisniewski, H.G.; Thogersen, I.B.; Enghild, J.J. The TSG-6/HC2-mediated transfer is a dynamic process shuffling heavy chains between glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 21988–21993. [CrossRef] [PubMed]
26. Tolg, C.; Hamilton, S.R.; Zalinska, E.; McCulloch, L.; Amin, R.; Akentieva, N.; Winnik, F.; Savani, R.; Bagli, D.J.; Luyt, L.G.; et al. A RHAMM mimetic peptide blocks hyaluronan signaling and reduces inflammation and fibrogenesis in excisional skin wounds. *Am. J. Pathol.* **2012**, *181*, 1250–1270. [CrossRef] [PubMed]

Annexe 3: Understanding Molecular Mechanisms and Identifying Key Processes in Chronic Radiation Cystitis

International Journal of *Molecular Sciences*

MDPI

Review

Understanding Molecular Mechanisms and Identifying Key Processes in Chronic Radiation Cystitis

Clément Brossard [1], Anne-Charlotte Lefranc [1], Jean-Marc Simon [2], Marc Benderitter [1], Fabien Milliat [1] and Alain Chapel [1,*]

[1] Service de recherche en radiobiologie et en médecine régénérative (SERAMED), Laboratoire de Radiobiologie des expositions médicales (LRMED), Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), 31 avenue de la division Leclerc, Fontenay-aux-Roses, F-92260 Paris, France; clement.brossard@irsn.fr (C.B.) ; charlotte1810.lefranc@gmail.com (A.-C.L.); marc.benderitter@irsn.fr (M.B.); fabien.milliat@irsn.fr (F.M.)

[2] APHP, Hôpital universitaire Pitié-Salpêtrière, Radiotherapy-Oncology Department, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, CEDEX 13, 75651 Paris, France; jean-marc.simon@ap-hp.fr

* Correspondence: alain.chapel@irsn.fr

Abstract: Chronic radiation cystitis (CRC) is a consequence of pelvic radiotherapy and affects 5–10% of patients. The pathology of CRC is without curative treatment and is characterized by incontinence, pelvic pain and hematuria, which severely degrades patients' quality of life. Current management strategies rely primarily on symptomatic measures and have certain limitations. Thanks to a better understanding of the pathophysiology of radiation cystitis, studies targeting key manifestations such as inflammation, neovascularization and cell atrophy have emerged and are promising avenues for future treatment. However, the mechanisms of CRC are still better described in animal models than in human models. Preclinical studies conducted to elucidate the pathophysiology of CRC use distinct models and are most often limited to specific processes, such as fibrosis, vascular damage and inflammation. This review presents a synthesis of experimental studies aimed at improving our understanding of the molecular mechanisms at play and identifying key processes in CRC.

Keywords: chronic radiation cystitis; radiotherapy; cancer; inflammation; vascular lesions; fibrosis; molecular mechanism

Citation: Brossard, C.; Lefranc, A.-C.; Simon, J.-M.; Benderitter, M.; Milliat, F.; Chapel, A. Understanding Molecular Mechanisms and Identifying Key Processes in Chronic Radiation Cystitis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1836. https://doi.org/10.3390/ijms23031836

Academic Editors: James A. Bonner, Christopher D. Willey

Received: 26 December 2021
Accepted: 26 January 2022
Published: 6 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

With more than 19 million new cases and 9.9 million deaths in 2020, cancer is the second most common cause of death worldwide. Abdomino-pelvic cancers account for approximately 25% of all cancers, with the most common being cancer of the prostate, colon and rectum [1]. Radiotherapy is used in 50% of cancer treatments [2] and is one of the most effective cancer treatments. Currently, 5% of patients will develop pelvic complications. However, advances in radiation therapy improve outcomes and enhance survival. In the bladder, uterus, and prostate cancer, the organs at risk following radiotherapy are the rectum and the bladder. The most common symptoms are proctopathy (5–20%) and radiation-induced cystitis (3.5%) [3]. Radiation-induced cystitis tends to be clinically severe and can cause extreme pain, hematuria, and irritative voiding symptoms. There is no definitive time frame that constitutes the "at risk" window for radiation-induced cystitis.

Patients can experience a wide range of symptoms, from mild pelvic pain to life-threatening hemorrhagic cystitis weeks, months, or even years after treatment. To date, there is no way to predict which subset of radiation treatment patients will experience this potentially devastating complication. In its severe form, pain and hemorrhagic cystitis

impair patient quality of life, prolong hospitalization and may be life-threatening complications [4]. Moreover, despite recovery, patients who have experienced radiation-induced hemorrhagic cystitis have lower overall and event-free survival compared to patients who have not experienced hemorrhagic cystitis [5]. Treatment is limited to managing the symptoms and is not always effective because the causes may be multiple. The etiology of the disease requires in-depth knowledge of the mechanisms involved, which remain poorly understood [6,7]. It is, therefore necessary to develop a thorough understanding of these mechanisms so that we can propose alternative therapies. Based on molecular knowledge from preclinical studies, we present a synthesis of the mechanisms involved in radiation-induced cystitis in order to identify key effectors.

2. Radiosensitivity of the Bladder

The goal of radiotherapy is to eliminate the tumor while preserving the surrounding healthy organs, called the at-risk organs. The total dose that at-risk organs can tolerate depends on the sensitivity of each organ to irradiation, and on the fraction of the organ irradiated. The risk to an organ depends on its sensitivity to irradiation, the dose and the exposed volume (depending on the proximity of the targeted tumor, the delimitation of the tumor), the prescribed fractionation and the type and energy of irradiation used (photon, neutron, electron, proton, carbon, etc.). The bladder is an organ at risk in all radiation treatments for pelvic cancers, particularly prostate cancer (Table 1).

Table 1. Organs at risk according to the organ of the abdomino-pelvic sphere treated by radiotherapy.

Organ Treated by Radiotherapy	Organ at Risk
Rectum	Small intestine
Anal canal	Small intestine, bladder, vulva, labia majora
Cervix	Rectum, bladder, anal canal, small intestine, sigmoid colon, vagina
Endometrium	Rectum, bladder, anal canal, small intestine, sigmoid colon, vagina
Vulva	Rectum, bladder, urethra, anal canal, small intestine, sigmoid
Prostate	Rectum, bladder, anal canal
Bladder	Rectum, anal canal, small intestine, sigmoid colon
Testis	Spinal cord, kidney, stomach, small intestine, colon

The long-term complication rate is influenced by the three key components of the irradiation protocol, as follows:

1. The exposed bladder volume and surface area—if involved, the trigone is more problematic than the bladder dome.
2. The dose rate—a rate below 0.8 Gy/h reduces the risk of cystitis and the dose of the daily fraction of irradiation. Doses higher than 2 Gy per fraction increase the risk of delayed sequelae.
3. The total dose—toxicity is higher when the overall dose is higher than 60 Gy to the bladder; conformal beam therapy provides higher doses to the target tissue while retaining a lower total dose in the bladder. (Figure 1) [8].

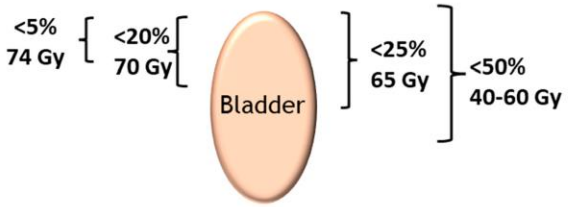


Figure 1. Bladder dose constraints in conformal radiotherapy as a function of the percentage of whole bladder exposed. Establishing the dose constraints for the bladder for a given surface area makes it possible to assess a dose-volume effect on urinary toxicity. The tolerance dose is often expressed as follows: Vx < Y%, which means that the dose X Gy must not be delivered in more than Y% of the V volume of the organ at risk [9,10].

3. Incidence of CRC

The risk of urinary toxicity increases linearly over time but without a plateau [11–14]. The percentage of lesions for urinary toxicity in the case of three-dimensional conformal radiation therapy (3DCRT) and intensity modulated radiotherapy (IMRT) for a total dose from 50 to 80 Gy and for a volume of bladder irradiated from 2 to 20% is presented in Figure 2.

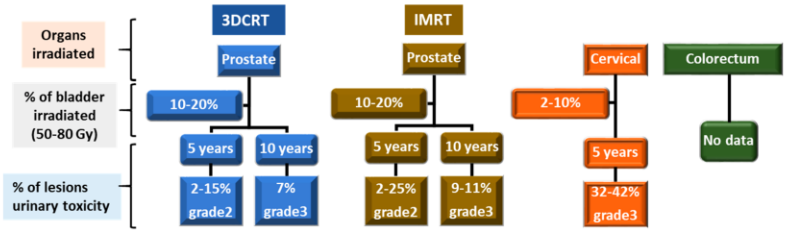


Figure 2. CRC symptoms are a function of the dose and the surface area of the bladder irradiated. This Figure summarizes our knowledge regarding chronic lesions of the bladder for 3DCRT and IMRT for urinary toxicity. The percentage of grade 2 or 3 lesions for a dose range from 50 to 80 Gy is indicated for 5 and 10 years after radiotherapy.

However, it is difficult to determine the % of CRC and its symptoms. Indeed, the large number of irradiation techniques, as well as the related radiotherapy protocols, means that the percentages for each symptom can vary greatly. In addition, there are few studies on these subjects and often little or no detail is provided, making it difficult to synthesize the data. Here, we have given an overview of the frequency of the different symptoms depending on the organ treated and the time after radiotherapy.

4. Pathophysiology of CRC in Patients

The acute phase of radiation cystitis mostly occurs during radiation treatment. The early effects are damage to the urothelium and microvasculature. Microvascularization damage induces the development of edema in the bladder wall [15]. Edema of the mucosa, submucosa and lamina propria develops, accompanied by acute inflammation. At the level of the cells of the urothelium, nuclear pycnosis and hyperchromatic nuclear coloration are observed; the nuclei may also be enlarged and atypical. Tight junctions and the polysaccharide layer are disrupted, allowing hypertonic urine and isotonic tissue to come into contact, resulting in tissue inflammation and early symptomatic acute radiation cystitis.

Damage to the mucosal wall may be caused by local necrosis of the urothelial cells. These lesions may appear in the first few months after irradiation or appear more than a year after exposure when the chronic phase is initiated. Vascular endothelial cells are thought to be the primary target cells for bladder injury after radiation, with late bladder fibrosis occurring because of vascular ischemia of the bladder wall. Vascular endothelial cell edema is evident at three months and endothelial cell proliferation is evident at six months. The main features are vascular endothelial cell edema, endothelial cell proliferation, perivascular fibrosis. Vascular ischemia, edema, and cell destruction cause the re-

placement of bladder smooth muscle fibers by fibroblasts and increased collagen deposition. The foremost processes are smooth muscle edema, smooth muscle replacement by fibroblasts, increased collagen deposition, and vascular ischemia [16,17].

The impact is that urinary frequency, dysuria and lower bladder capacity increase [18]. Edemas of the mucosa, submucosa and lamina propria potentiate these effects. Hematuria may develop in relation to petechiae into the lamina propria and submucosa. It should be noted that the appearance and intensity of acute lesions are not related to the severity observed at the chronic level [19,20].

The chronic effects of radiation cystitis differ from the acute effects. Chronic radiation cystitis can develop between 6 months and 20 years after radiation therapy. Factors related to the patient, as well as to the tumor and treatment, increase the risk of developing chronic radiation cystitis. Diabetes, hypertension and previous abdominal surgery are risk factors. Surgery, postoperative sequelae, and chemotherapy can contribute to the development of chronic radiation cystitis. The volume of tissue irradiated, the dose to the bladder as well as concomitant treatments and individual radiosensitivity are aggravating factors. The symptoms of the chronic phase are the result of a combination of processes that range from the deregulation of urothelium homeostasis, hyperactivation of the endothelium, inflammation, hypoxia, oxidative stress, defect in neuroregulation and fibrosis. These processes potentiate each other, allowing the progressive worsening of the CRC. Ischemia, fibrosis and neuroinflammation appear to be the main factors responsible for the symptoms of CRC; however, they are permanently potentiated by all the processes stated above. Consequently, some symptoms of CRC appear years after radiotherapy, the most obvious of which are bladder contraction, ulcer formation, fistula, and bladder dysfunction. Therefore, the pathology of CRC should include the following urinary symptoms: frequency, urgency, dysuria, hematuria, pain, degradation of quality of life [21]. Cytoscopy can be used to classify the three main forms of CRC [22]: a predominantly inflammatory form with edema, mucosal pallor and possible ulceration, a predominantly bleeding form with friability, spontaneous hemorrhage and telangiectasia, and a mixed form with features of inflammatory CRC and hemorrhagic CRC [19,22–25].

5. Grading CRC

Lesions can range from a simple inflammatory reaction to almost complete loss of bladder function. The main clinical symptoms are macroscopic hematuria accompanied by pain and pollakiuria. Different scales for rating the severity of CRC exist. The European Organization for Research and Treatment of Cancer and Radiation Oncology Therapy Group (RTOG/EORTC) scale for calculating radiation toxicity of exposed organs is the most widely used. Another commonly used scale is the LENT-SOMA scale, which stands for Late Effects Normal Tissue (LENT)-Subjective Objective Management and Analytic (SOMA) assessment. Each known individual organ or tissue has its own LENT-SOMA scale [26]. The LENT-SOMA scale is a comprehensive system and provides a great deal of information but can be difficult to implement outside clinical trials (Table 2). Several classification systems for the severity of hemorrhagic cystitis have been used in published reports and are presented in Table 2 [27–32]. Today, the most widely used system is the CTCAE v5.0 system [33]. All these scales are mainly based on the degrees of hematuria (microscopic to macroscopic) and their frequency as well as patients' bladder capacity. The classifications do not take into account the degradation in patients' quality of life due to CRC, whereas the bladder seems to tolerate high doses of ionizing radiation, as demonstrated by the long-term follow-ups of bladder cancers treated with radiotherapy by Lars Henningsohn et al. [34]. In this study, the symptoms are studied one by one, which makes it possible to advance and understand the underlying pathophysiology. This study has the great merit of correlating symptoms and pathophysiology with the long-term quality of life of patients after radiotherapy, which is too rarely done. This study shows that it is

essential to take account of the patients' distress, their pain, the degradation of their quality of life and their sexual comportment in pathophysiological investigations and in the classifications.

Table 2. Classification systems for the severity of cystitis.

Grade	CTCAE v5.0 [33]	RTOG/EORTC [26]	LENT-SOMA [32]
I	Minimal or microscopic bleeding intervention not indicated	Slight epithelial atrophy Minor telangiectasia (microscopic hematuria)	Hematuria occasional and microscopic Dysuria occasional Incontinence weekly episodes
II	Gross bleeding, medical intervention or urinary tract irrigation indicated	Moderate frequency Generalized telangiectasia Intermittent macroscopic hematuria	Hematuria intermittent, macroscopic and <10% decrease hemoglobin Dysuria intermittent Incontinence daily episodes
III	Transfusion, interventional radiology, endoscopic or operative intervention indicated, radiation therapy (i.e., hemostasis of bleeding site)	Severe frequency and dysuria Severe generalized telangiectasia (often with petechiae) Frequent hematuria Reduction in bladder capacity (<150 cc)	Hematuria persistent, macroscopic and 10–20% decrease hemoglobin Dysuria persistent and intense Incontinence daily episodes
IV	Life-threatening consequences, major urgent intervention indicated	Necrosis/ Contracted bladder (capacity <100 cc) Severe hemorrhagic cystitis	Hematuria persistent, >20% decrease hemoglobin Dysuria refractory and excruciating Incontinence complete refractory

Abbreviations: CTCAE = Common Terminology Criteria for Adverse Events; RTOG/EORTC = Toxicity criteria of the Radiation Oncology Group (RTOG)/European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC); LENT-SOMA = Late Effects Normal Tissue (LENT)-Subjective Objective Management Analytic (SOMA).

6. Clinical Management of Radiation Cystitis

Conventional treatments focus on reducing the episodes and intensity of hematuria and inflammation (Figure 3) [35]. In the case of inflammatory CRC, problems mainly occur during the urine storage phase, urination and/or chronic pain. Treatments for pain in the voiding phase are α1-adrenoceptor antagonists (α1-blockers), corticosteroids, as well as catheterization to avoid pain. General pain can be treated with paracetamol or non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) [22,36].

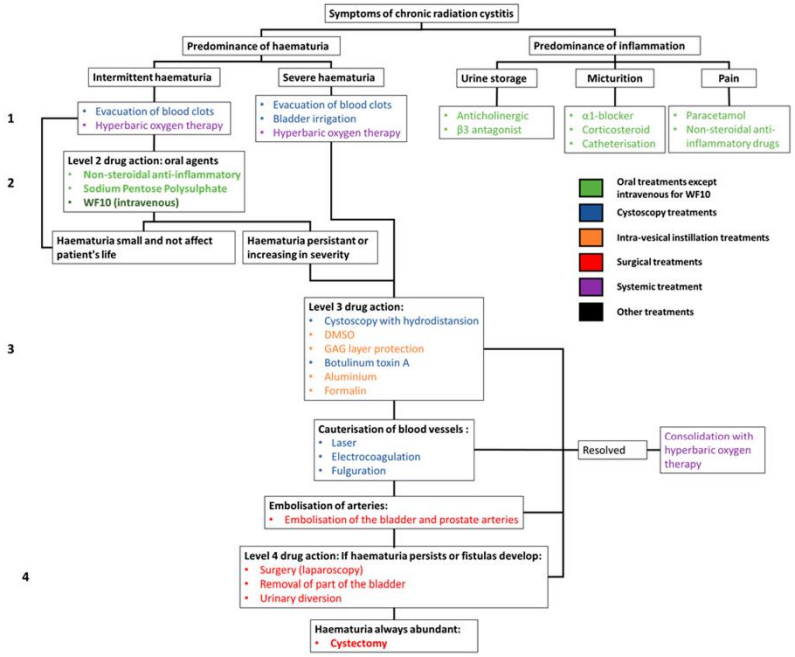


Figure 3. Decision tree for the management of chronic radiation cystitis and its treatment.

In the case of hemorrhagic CRC, the first step is to establish the origin of the bleeding. To do this, a cystoscopy is performed to check the condition of the bladder wall and that of the blood vessels. The treatment of hemorrhagic CRC will depend on the intensity of the hematuria.

First-line treatments for hemorrhagic CRC can be used for grade 1 on the LENT-SOMA scale. These include blood clot evacuation and hyperbaric oxygen therapy. In cases where the hematuria is sudden and severe, blood transfusion may be required, followed by hyperbaric oxygen therapy [37].

For intermittent but persistent hematuria, oral treatments such as nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and glycosaminoglycan (GAG) protectors (WF10 intravenous and sodium polysulphate) are prescribed.

If the hematuria continues to worsen (above grade 2 on the LENT-SOMA scale) more severe treatments are required. These include cystoscopy with hydrodistention or botulinum toxin injection. Intravesical instillations are also used. These include dimethyl sulfoxide (DMSO) or GAG layer protectors (sodium pentose polysulphate, heparin, etc.) and, as a last resort, aluminum and formalin.

If the CRC continues to worsen, it is possible to cauterize the blood vessels (via laser, fulguration, or electrocoagulation) and then embolize the bladder and prostate arteries. If this is not enough, it is possible to perform laparoscopy, partial bladder removal or urinary diversion and, as a last resort, a cystectomy [6,7,22,38–41]. The effect of treatment on the parameters of pollakiuria, dysuria and pain have not been extensively studied, the result of only a partial evaluation of the effectiveness of the therapies tested. Various side effects of these therapies are known, including risk of intoxication, bladder rupture, kidney failure, fibrosis and even death. According to the literature, these techniques and methods may show some slight decrease in hematuria grades [5,42–55]. The results may

be short-term effects with significant side effects such as intense pain, to the point of having to interrupt treatment [40]. Hyperbaric oxygen therapy may be the method that seems to show the highest efficacy (75% improvement within six months) with the least side effects, which can include barotraumatic otitis, transient visual disturbances and paresthesia of the fingers. However, hyperbaric oxygen treatment is constraining and expensive, requiring 30–40 sessions of 80–90 min over two months, plus the effects diminish with time and may recur a few years after treatment, up to 40%, especially in the most serious cases [37,56] (Figure 3).

7. Mechanisms of CRC: Lesson from Preclinical Studies

The chronicity of the effects of radiation therapy involves mechanisms common to most healthy tissue exposed to radiation. These mechanisms are also found for CRC. The chronicity of radiation effects on healthy tissue is associated with endothelial damage with late vascular repercussions and disruption of angiogenesis. This phenomenon induces a chronic inflammation. In the longer term, the implementation of these mechanisms leads to fibrosis and disorganization of the muscle layers. As detailed below, analysis of preclinical data confirms that the mechanisms are similar although they are less detailed in CRC. The pathology of CRC shows that there are two predominant forms, namely an inflammatory form and a hemorrhagic form, which can be combined (as described above). Based on this observation, there seem to be two major mechanisms of CRC: chronic inflammation and vascular damage. Given that inflammation is linked to pain, it seems likely that there is a role for neuro-inflammation in this process, inducing a lack of neurogenic control. (Figure 4).

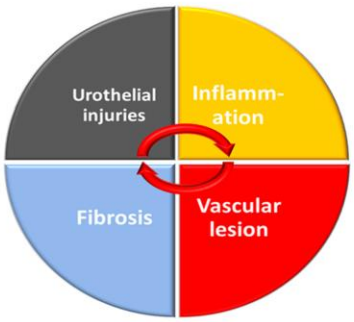


Figure 4. Relationship between the main mechanisms involved in CRC.

However, clinical trials, as well documented as they are, unfortunately do not explain the mechanisms of CRC. On the other hand, preclinical studies provide more information regarding homogeneous animal cohorts in term of doses as well as irradiation protocols, combined with a precise monitoring of the animals for long-term follow-up. However, one must keep in mind the limitations of animal models when extrapolating mechanisms to human pathology. To illustrate this, in humans, hemorrhages are a major component of CRC, but they appear very sparsely in animals. A review of original articles was performed using PubMed from 1950 to 2020. We used the following search terms: Chronic radiation cystitis, radiation cystitis, radiation-induced cystitis, radiation-induced hemorrhagic cystitis, radiation damage bladder. We retained only articles discussing mechanisms, and excluded articles referring to treatments. Then we selected only those articles that study the chronic phase. In all, eighteen articles have been selected, as summarized in Table 3.

Table 3. Summary of Pre-Clinical Studies of Chronic Radical Cystitis (1978 to 2021).

Model	Dose	Irradiation Source	Study Time	Main Characteristic Studied	Method Used	Main Results	Ref
CBA Female Mouse	Single dose from 10 to 40 Gy (5 Gy increments)	Linear accelerator (1.8 MeV, 75 pulses/sec). 112.5 Gy/min	Monthly (for 16 months)	Miction	Metabolic Cage	Increase in urinary frequency with the irradiation dose	[57]
CBA Female Mouse	Single dose from 10 to 40 Gy (5 Gy increments)	Linear accelerator (1.8 MeV, 75 pulses/sec). 112.5 Gy/min	3, 7, 9, 12, 19 and 22 months	Urothelium regeneration Endothelium regeneration	Tritium marking Tritium marking	Increase in urothelium regeneration speed between 6 and 22 months inversely proportional to the dose Dose-dependent increase in endothelium regeneration rate between 6 and 22 months.	[58]
CBA Female Mouse	Single or fraction dose: 2 (24 h) and 5 fractions (4 days) Single dose: 15 to 32.5 Gy (2.5 Gy increments) Dose for 2 fractions: 22.5 to 37.5 Gy (5 Gy increments) Dose for 5 fractions: 30 to 55 Gy (5 Gy increments)	Linear accelerator (1.8 MeV, 75 pulses/sec). 112.5 Gy/min	6 to 15 months (monthly)	Miction Bladder capacity	Metabolic Cage	Increase in urinary frequency with the irradiation dose, but decrease in urinary frequency with the number of fractions from 12 months onwards. Progressive reduction of bladder capacity proportional to dose and increase of capacity proportional to the number of fractionations starting at 12 months.	[59]
Female mouse CBA/Ht Gy f BSVS	Fractionation: 1, 5, 10 or 20 fractions (equal dose per fraction spread over 1 to 2 weeks (condition 20 fractions = 2 fractions per day separated by 5 h)) Irradiation dose for 1 fraction: 20, 25 and 30 Gy. For 5 fractions: 35, 45, 55 and 60 Gy. For 10 fractions: 45, 55, 65 and 75 Gy. For 20 fractions: 50 to 90 Gy (increment of 10 Gy).	Linear accelerator (1.8 MeV, 75 pulses/sec). 112.5 Gy/min	9, 10, 11, 13, 14 months	Miction Bladder capacity	Metabolic cage	Increase in urinary frequency with the irradiation dose, but decrease in urinary frequency with the number of fractions from 10 months onwards Progressive reduction of bladder capacity proportional to dose and increase of capacity proportional to the number of fractionations starting at 10 months.	[60]

Female mouse CBA/Ht Gy f BSVS	**Electron**: 1 fraction: 17.5, 22.5, 25, 30 Gy 2 fractions: 22,5, 27.5, 32.5, 37.5 Gy; 4 fractions: 35, 45, 55 Gy 8 fractions: 35, 45, 55, 65 Gy **Neutron:** 1 fraction: 7, 8, 9, 10 Gy 2 fractions: 7.5, 9, 11, 12.5 Gy 4 fractions: 8, 10, 12, 14 Gy 8 fractions: 8, 10, 12, 14, 16 Gy	1.8 MeV electron linear accelerator or 3 MeV neutron linear accelerator	9 to 14 months (monthly)	Miction	Metabolic cage	Increase in urinary frequency with the irradiation dose but decrease in urinary frequency with the number of fractions from 9 months onwards Irradiation with electron is less damaging.	[25]
Female mouse CBA/Ht Gy BSVS	Single dose from 15 to 32.5 (2.5 Gy increments)	Linear accelerator (1.8 MeV, 75 pulses/sec). 112.5 Gy/min	16 months (monthly)	Miction Urothelium regeneration Endothelium regeneration	Metabolic cage Tritium marking Tritium marking	Increase in urinary frequency from 7 months and proportional to the irradiation dose Limited urothelium regeneration in the first 3 months after irradiation. Limited regeneration of the endothelium in the first 3 months after irradiation.	[61]
Female mouse C3H/Hen Af-nu+	Single dose of 10, 15, 20, 25, 27.5 and 30 Gy	X-rays 250 kV, filtered at 0.5 mm Cu, at 15 mA. At 2.1 Gy/min	Day 5, 12, 19 then every 4 to 6 weeks (over 53 weeks)	Urinary frequency Max. bladder volume Urothelium	Metabolic cage Cystoscopy Histology	Increase in urinary frequency as a function of time (acute phase in the 1st month) and proportional to the dose. Decrease in max. bladder volume as a function of time (acute phase in the 1st month) and proportional to the dose	[62]

						Epithelial denudation and focal hyperplasia, with fibrosis and ulceration.	
New Zealand male rabbit	Fractionated doses over 5 consecutive days (once a day) for a total of 33, 36 and 39 Gy. Irradiation of the entire bladder or half of the bladder on the cranial or caudal side.	X-ray of 300 kV 0.8 Gy/min (Seifert isovolt 3002; filtration: 1.0 mm Al)	100 weeks	Miction	Metabolic cage	Increase in frequency of urination decrease in max. volume for 100 weeks for dose 39 Gy or 36 Gy (total bladder irradiation), and from 20 weeks onwards for irradiation on half of the bladder (39 Gy at the cranial part of the bladder and 39 Gy or 36 Gy at the caudal part)	[63]
New Zealand male rabbit	Fractionated doses over 5 consecutive days (once a day) for a total of 33, 36 and 39 Gy. Irradiation of the entire bladder or half of the bladder on the cranial or caudal side.	X-ray of 300 kV 0.8 Gy/min (Seifert isovolt 3002; filtration: 1.0 mm Al)	100 weeks	Tissue alteration	Histology	Dose-dependent urothelial hyperplasia or atrophy of the urothelium and more pronounced in the body of the bladder and trigone, submucosal and muscular tissues showed dose-dependent fibrosis and changes in the blood and lymphatic vessels, the body and trigone are more sensitive to radiation (more fibrosis, changes in the vessels)	[64]
Female mouse C3H/Hen Af-nu+	Single dose of 10, 15, 20, 22.5, and 25 Gy	X-ray 250 kV, filtered at 0.5 mm Cu, at 15 mA, 2.1 Gy/min	1, 2 and 4 weeks after irradiation then monthly up to 61 weeks (irradiation in week 4 or 12)	Urinary frequency Volume per voiding Max. bladder volume	Absorbent paper (15 cm/h) Scanning tablet (Calcomp B.V., Amstelveen, The Netherlands) with special program Cystoscopy	Increased frequency in acute phase during the first 4 weeks, and late phase from 15 to 37 weeks (dose-dependent). Volume reduction per voiding between 52 and 56 weeks for 25 Gy. Decrease in total bladder volume as a function of the dose.	[65]

Female mouse C3H/Neu Female mouse C3H/Hen Af-nu+	Single dose of 19 Gy Single dose of 25 Gy and 14 Gy.	Seifert Isovolt 320 300kV, 5.3 Gy/min Seifert Isovolt 320 250kV 2.1 Gy/min	90 to 360 days	Bladder function Fibrosis Urothelium	Cystoscopy Immunohistochemistry Histology	Correlation between decrease in max. bladder volume and the expression of TGFβ and collagen, decrease in total bladder volume Increased tissue protein expression in TGFβ (in both strains) as a function of time and dose, increased collagen I and III from 180 days after irradiation, but decreased collagen I/III ratio in C3H/Hen Af-nu+ mice and increased in CH3/Neu mice Increased denudation or hyperplasia as a function of the dose, edema.	[66]
Female mouse C3H/Neu	Single dose of 20 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	2, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 days (early), then on days 90, 120, 180, 240 and 360 (late) after irradiation.	Vascular	Immunohistochemistry	Increased COX-2 expression in the blood vessel wall during the precocious phase (4 to 16 days) but not in the late phase.	[67]
Female mouse C3H/Neu	Single dose of 20 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	2, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 days (early), then on days 90, 120, 180, 240 and 360 (late) after irradiation.	Urothelium	Immunohistochemistry	Decrease in superficial cells in early phase (day 0 to 31) until the beginning of late phase (90 to 120 days), progressive loss of Uroplakine III expression at the cell surface correlated with the loss of superficial cells, but increase in cytoplasmic expression of Uroplakine III in superficial cells until the beginning of late phase (120 days)	[68]

Female mouse C3H/Neu	Single dose of 20 Gy	Seifert Isovolt 320/20 x-ray machine (Seifert X-Ray Corp., Fairview Village, PA) 200kV, 0,85 Gy/min	90, 120, 180, 240 and 360 (late response phase) after irradiation	Fibrosis Vascular	Histology Immunohistology	Infiltration of albumin around small blood vessels in early and late phase Increase in collagen deposition in the bladder.	[69]
Lewis Rats female	Single dose of 20 Gy	Cesium irradiation (about 4 Gy/min)	1,5 and 3 months	Fibrosis Vascular lesion	Histology Histology and transcriptomic	Increase in collagen at 3 months in muscle with fibrosis and overexpression of the TGF β gene at 3 months. Decrease in the number of blood vessels at 1.5 and 3 months, preferably in the dome, without increasing the expression of the VEGF gene.	[70]
Female mouse C3H/HeN	Single dose of 20 Gy	Small Animal Radiation Research Platform (SARRP), 2 Gy/min 220 kV and 13 mA	19 weeks	Miction Fibrosis Urothelium Inflammation	Metabolic cage Histology, Immunohistology Histology	Increase in urinary frequency with decrease in volume per void. Increased fibrosis Decreased Upk III, E-cadherin and CD31 expression, hyperplasia. Increase of mast cells	[20]
Female mouse C57Bl/6	Single dose of 10 Gy, external bladder	X-RAD 320 biological irradiator (Precision X-Ray, North Branford, CT), dose rate not given	1, 2, 4, 6 and 9 and 12 weeks	Miction Bladder contraction Fibrosis	Whatman filter paper Electromyogram Histology	Increase in urinary frequency / incontinence 9 weeks after irradiation Decrease in contractility and compliance, increase in passive tension 9 weeks after irradiation. Increased collagen deposition (changes wall relaxation).	[71]

Female Mouse C57BL/6, C3H and BALB/c	Single dose of 40 Gy	Small Animal Radiation Research Platform (SARRP), 2 Gy/min 220 kV et 13 mA	12 months	Miction Fibrosis Vascular	Metabolic Cage Histology, immunohistology Photos	Increased urinary frequency with decreased volume per void in C57BL/6 Increased fibrosis, collagen densification in C57BL/6 and BALB/c, increase in collagen I and III than in C57BL/6. Pale avascular lesions, hemorrhages and telangiectasias.	[15]

7.1. Urothelium: Unknown Actor but May Be the Key Element in Inflammation: A Paradigm Shift?

We decided to approach CRC through the loss of impermeability of the urothelium, although the endothelium is described as the key element in chronic radiation sequelae on healthy tissue. The loss of impermeability of the urothelium is the loss of a protective barrier of the bladder. This is the first element allowing deterioration of the underlying tissues. Maintaining the impermeability defect over time due to a defective repair may enable implementation of the mechanisms observed during the chronic phase. Many agents can maintain these lesions of the urothelium in patients and could be facilitating agents for the establishment of CRC. The observation that visible lesions on the urothelium occur early in CRC and may be the result of improper acute phase repair confirms that the urothelium may be the initiating point of CRC. This lack of repair can lead to inflammation, which can participate in vascular damage and thus lead to the development of CRC.

Damage to the visible structure of the urothelium occurs mainly with hyperplasia. The urothelium also undergoes molecular changes, with a decrease in tight junctions such as uroplakine III or E-cadherin inducing an increase in bladder permeability. In the first phase of CRC, a decrease in the number of superficial cells was observed [20,68]. In the late phase, the main feature in studies is that the urothelium presented lesions at the structural level. In the studies of Zwaans et al. and Jaal et al., a decrease in the expression of uroplakine 3 was detected in superficial cells as well as in the expression of E-cadherin. These decreases induced a diminution in bladder tightness. Infiltration of urine into the tissues maintained inflammation and urothelium lesions accompanied by hyperplasia and edemas [20,68]. Hyperplasia remained the most frequent phenomenon [20,64,68,72]. In preclinical studies, hyperplasia, erosion of the urothelium, atrophy and cellular edema, especially in the basal cells, are common mechanisms found for several animal species and irradiation configurations. Edema and hyperplasia were also described in CRC patients [72]. The integrity of the urothelium is maintained through a complex process of migration, proliferation and differentiation of stem cells. All preclinical studies confirm the damage to the urothelium resulting in edema, hyperplasia and a decrease in the thickness of the urothelium. There seem to be abnormalities in the regeneration of this tissue, which could be related to a deregulation of the proliferation and differentiation of stem cells of the urothelium. Accelerated proliferation can occur in various bladder pathologies. For example, during the use of chemical agents such as cyclophosphamide that damage the umbrella cell layer [73,74]. Slow urothelial cell turnover and differentiation can be influenced by exogenous factors, including epithelial growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) and other molecules such as retinoic acid [75–77]. We can hypothesize that during CRC there is a deregulation of urothelial stem cells and that factors such as EGF, PDGF and PPAR could contribute to this deregulation (Figure 5).

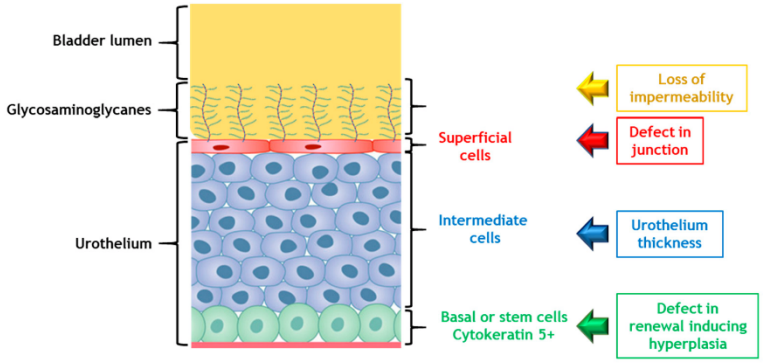


Figure 5. Abnormalities in urothelium regeneration and loss of impermeability.

7.2. Vascular Lesions Are the Checkpoint in Chronicity Development

7.2.1. Vascular Damage Implicated in Late Radiation Injury

In survivors of radiation-treated cancers, vascular damage contributes to the initiation and subsequent progression of radiation-induced tissue damage [78]. Ionizing radiation, through its effects on the endothelium, mediates initiation and progression of radiation-induced damage to healthy tissue. Endothelial apoptosis increases vascular permeability, endothelial activation and recruitment of inflammatory cells, and activation of the coagulation system, contributing to the progression of radiation-induced tissue damage [79]. Endothelial cells play a key role in the control of vascular tonicity by secreting molecules that act on vascular smooth muscle cells [80]. The main effects are radiation-induced cell death, loss of thromboresistance and secretion of soluble factors, such as cytokines or growth factors. Thrombomodulin deficiency is demonstrated after irradiation and is chronically perpetuated in rats and humans [81,82]. The mechanisms responsible for the decrease in thrombomodulin expression are related both to the direct effects of irradiation through the production of reactive oxygen species and to indirect secondary effects related to radiation-induced inflammation [83]. The loss of endothelial thromboresistance following ionizing stress results from the stimulation of fibrinogenesis and a decrease in fibrinolysis associated with overexpression of tissue factor [84], von Willebrand factor [85] and a decrease in the expression of prostacyclin [86] and thrombomodulin [87]. Activation of the coagulation system is one of the physiological processes stimulated after irradiation. The endothelium is in a chronic procoagulant state, which may contribute to the long-term persistence of the deleterious effects of irradiation. A correlation exists between vascular thickening and radiation-induced tissue damage [80]. The late effects are tissue hypoxia related to vascular ischemia and chronicity of endothelial dysfunction (Figure 6).

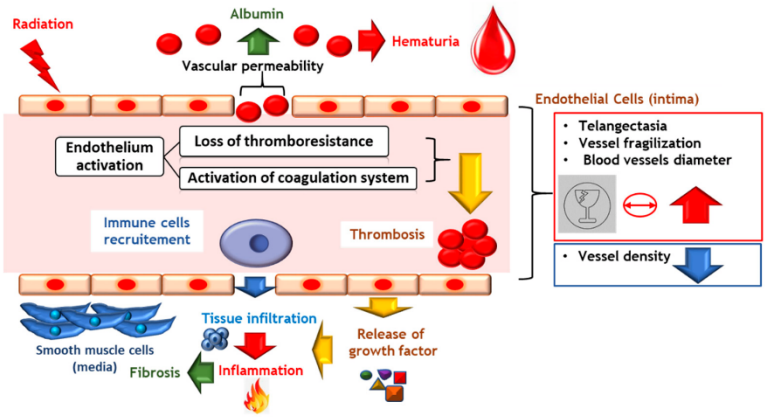


Figure 6. Endothelial activation induces vascular permeability and tissue infiltration and stimulates a pro-thrombotic and pro-inflammatory phenotype that leads to thrombosis and leukocyte recruitment.

7.2.2. Vascular Lesions: Key Factor in the Onset of CRC

As described for preclinical studies, it appears that in CRC, as in other chronic radiation pathologies, early events in endothelial cells contribute to the progression of radiation-induced vascular and tissue damage. The late presence of vascular lesions might be explained by the slow renewal of the endothelium [58]. According to Stewart et al., irradiation with a single dose starting at 25 Gy induced compensatory proliferation of the endothelium, but the response did not initiate until several months later. Endothelial cell proliferation started from six months and continued until 22 months after irradiation (end of study). Irradiation seems to accelerate the rate of proliferation of endothelial cells. According to the authors, the rate of endothelial cell renewal increased from one week to 6 months after irradiation, whereas the rate of endothelial cell renewal is one year for non-irradiated controls. Furthermore the increase in proliferative activity was dose-dependent at 22 months after irradiation [58,61].

Irradiation doses, corresponding to a therapeutic dose or following irradiation accidents, have deleterious effects on the neovascularization process. In preclinical models of CRC, vascular lesions, joined with telangiectasias and the presence of albumin, have led to the activation of macrophages and mast cells that released large quantities of pro-inflammatory molecules, including tryptase, which maintained and amplified vascular lesions and fibrosis [88,89]. These alterations, might, as they worsen, lead to microscopic then macroscopic hematuria visible under cystoscopy in patients with CRC [90,91]. Vascular lesions are the key focus of CRC. Vascular lesions are due to irradiation and appear after the acute phase due to slow endothelial cell turnover. These lesions appear in the chronic phase, inducing inflammation and neo-vascularization. In patients, an increase in the Placental Growth Factor protein (PGF) was measured in the urine at an early stage up to one year after irradiation. This molecule promotes angiogenesis by binding to the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor, VEGFR2. VEGFα, another major player in angiogenesis, is an increased protein concentration in the urine of patients with hemorrhagic cystitis.

Soler et al. observed a decrease in the number of blood vessels in irradiated rats (20 Gy) up to 90 days post-irradiation (end of study). Despite this decrease there was no change in gene expression of VEGF alpha in the bladder wall, no hypoxia (based on the level of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) α expression). The loss of vessel density was greater in the cranial part of the bladder (the dome) [70]. Jaal et al. measured an increase

in blood vessel surface area throughout the late phase for up to one year [67]. These two results do not contradict each other. Soler's study measured the number of vessels, while Jaal's study quantified the total surface area of the vessels, not their number. Therefore, there was a decrease in the number of vessels, but these vessels were wider, which was in agreement with the telangiectasias visible in the Zwaans [15,20] and Kohler studies [64].

The vascular lesions are a common mechanism found in these studies independently of animal models and the irradiation configuration. Telangiectasia is the most commonly observed phenomenon, which is not the case for hematuria, as opposed to what is observed among patients. These lesions are one of the first visible phenomena of CRC. Telangiectasias are accompanied by an increase in the permeability of the small blood vessels. All these changes cause the small blood vessels to deteriorate, enabling their rupture during bladder contraction and distention. Original studies by Zwaans et al. indicated significant blood vessel alteration with pale avascular lesions, hemorrhagic lesions and telangiectasias on the largest blood vessels one year after irradiation at 40 Gy. Telangiectasia is defined as permanent dilatation with thickening of the blood vessel wall. It should be pointed out that lesions were visible in all strains of mice tested [15]. Telangiectasias were also noticeable in histology 130 days after irradiation (about 4 months) in the submucosa from 20 Gy in CH3/HeN mice [20]. Telangiectasia was similarly measured in rabbits in the study of Kohler et al. two years after irradiation from 33 Gy and found to be proportional to the irradiation dose. Telangiectasias mostly affected the caudal part of the bladder, although without being statistically significant [64]. The telangiectasias of the small blood vessels make them more fragile with regard to the contractions and dilations undergone by the bladder. Jaal et al. [69] revealed an increase in the permeability of the blood vessels characterized by the presence of albumin around these vessels. The presence of albumin was detected throughout the late phase from 90 days to 360 days. However, albumin was not observed around the large blood vessels.

As opposed to CRC human pathology, the majority of preclinical studies did not show hematuria. Only the model of Kohler et al. showed microhematuria. This presence of hematuria might be explained by higher doses compared to the other models studying vascular lesions. Another explanation could be the longer study time—two years—compared to one year in the studies of Zwaans and Jaal [20,68,69,92]. This observation regarding the absence of hematuria in animal models of CRC leads us to question the limitations of preclinical studies in explaining the mechanisms of CRC in humans.

7.3. Inflammation Is a Major Tissue Response to Irradiation, Inducing Chronic Tissue Damage

Inflammation is a complex mechanism that results in damage to the vascular system, induces migration of leukocytes into the irradiated area and secretion of multiple immune system agents [92,93]. Irradiation modifies the functions of immune cells. The multiplication of macrophages and T cells leads to the production of inflammatory mediators, such as Nuclear Factor NFκB (nuclear factor-kappa B) and SMAD2/3 (mothers against decapentaplegic), and cytokines, including (interleukin) IL-1, IL-2, IL6, IL-8, IL-33, TNFα (tumor necrosis factor-α), TGF-β (transforming growth factor-β), and IFNγ (interferon γ), [94]. A close association exists between chronic inflammation and oxidative damage following irradiation [95]. The high amount of inflammatory mediators is combined with the production of prostaglandins and free radicals, which include reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) [96]. The persistent exchange between the immune system and the radiation-damaged tissues in turn amplifies the inflammatory loops mobilizing more inflammatory cells.

The lack of data in preclinical studies on chronic inflammation in CRC, the main inflammatory cells involved, and the regulatory processes are real obstacles to understanding the role of inflammation in CRC pathology. Only the presence of mast cells at the initial phase of CRC has been demonstrated. Compared to similar pathologies, such as interstitial cystitis, we may suggest that degradation of the urothelium leads to the release

of histamine, IL-6, VEGF and tryptase [87]. The release of these factors could activate mast cells, which may favor chronic inflammation in CRC. In preclinical studies, the mechanisms of chronic inflammation have only partially been studied in CRC. However, at cellular level, several studies revealed an increasing number of pro-inflammatory cells. Zwaans et al. demonstrated a slight increase in the number of mast cells 130 days after irradiation into the submucosa. [20]. However, mast cells appeared at the end of the early phase [52] and remained in the late phase into the submucosa [69]. No other studies have investigated pro-inflammatory mechanisms in the chronic phase. However, Jaal et al. demonstrated that COX-2 (Cyclooxygenase-2), which had a role in inflammation, was not expressed in late-phase tissue [67]. The presence of mast cells at the end of the early phase and at the initiation of the late phase supported chronic inflammation. Mast cells actively participated in the production of pro-inflammatory cytokines and in vascular injury.

Chronic inflammation plays a pivotal factor in the acquisition and evolution of CRC, as well as in many chronic diseases. What is not described in CRC and yet is the main feature of chronic inflammation is the prominent presence of macrophages and lymphocytes, including B cells, plasma cells and T cells. Therefore, it is possible that the chronic inflammation that characterizes CRC might include macrophages and T cells, in addition to the mast cells described in the clinical trials.

Are Neuro-Inflammation and Lack of Neurogenic Control the Cause of Spasms and Pain?

The nervous compartment has a very important role during urination, ordering the detrusor muscles to contract to empty the bladder. Radiation cystitis is associated with a functional disorder between the nervous system and the bladder generating random and incomplete contractions (phenomenon of the overactive bladder), which contributes to incontinence but also in the pain expressed by patients. In interstitial cystitis, it has been shown that there is significant neuro-inflammation involving mast cells via different signals (nerve growth factor (NGF), substance P (SP)) and leading to the "suffering" of nerve fibers [88,97–102]. In the case of radiation cystitis, such neuro-inflammation could also play a prominent role, especially in its initiation and development. Studies by Durand et al. have shown that colon irradiation induces visceral hypersensitivity, partly by acting on mast cell activation and their interaction with nerve fibers within the colon [103]. Based on all these arguments, we hypothesize that this neuro-inflammation could be one of the mechanisms of action generating pain and spasm during CRC. It is important to recognize that a key point that is missing from our understanding of this pathology is that radiation-induced cystitis should not be viewed solely as a chronic inflammation of the bladder wall. As suggested by Giglio et al. (2018), it could be a lack of neurogenic control inducing a loss of functional control [104]. Irradiation affects several levels of neural control of the bladder, notably by sensitizing the micturition reflex. The efferent part of the neuronal control of bladder function would be depressed by irradiation of the bladder, while the afferent part of the neuronal control would be sensitized. The neural control of the irradiated bladder would change from a cholinergic regulation modulated by the interstitial cells to a purinergic regulation. Regulation by these interstitial cells on the micturition reflex would lead to increased sensitivity of the inputs of afferent neurons after irradiation of the bladder [104]. These interstitial cells could be mast cells [105].

7.4. Fibrosis: Key Point in Maintaining the CRC

In irradiated tissue, fibrosis is closely associated and overlaps with inflammation. In all the models studying fibrosis, an increase in collagen density was observed, together with infiltration of extracellular matrix (ECM) in the muscular part, within two to six months after irradiation and for doses of 20 to 40 Gy. Fibrosis is a key issue in maintaining CRC. Tissue rigidification will contribute to bladder contractility problems. Both sets of factors promote vascular damage, notably by causing the rupture of these vessels, creating hematuria and generating inflammation again. TGF-β1 is a major contributor to fibrosis

in chronic radiation cystitis. Kraft's study [66] shows that TGF-β 1 is strongly expressed in the urothelium and submucosa, and diffusely in muscle layers. Overall, the studies revealed that the release of TGF-β 1 is correlated with the irradiation dose and post-irradiation time. The increase in collagen has been studied in several models. The study published by Kraft et al. showed an increase in the expression of collagens I and III in tissues and mainly in the submucosa and muscle from 180 days (six months) after irradiation [66]. However, the collagen I/III ratio differed between mouse strains [20]. The study performed with the C3H/HeN Af- nu+ strain showed a decrease in this ratio while the C3H/Neu strain showed an increase. Type I collagen is important for the healing, elasticity and maintenance of connective tissue. Collagen III is the major constituent of the extracellular matrix. Change in ratio could indicate scar tissue. In the model of Zwaans et al., an increase in the density of collagen fibers was evidenced but not in their length or diameter in mice one year after irradiation for a single dose of 40 Gy. An increase in collagen-positive cells I and III was observed in C57BL/6 mice but not in CH3 and BALB/c mice. An important point to emphasize is that the genetic parameter of mice strain plays an important role in response to radio-induced fibrosis [15,20]. Fibrosis was measured in CH3/HeN mice 130 days after irradiation (approximately four months) for a single dose of irradiation of 20 Gy [20]. In the study by Soler et al., an increase in the collagen/muscle ratio was demonstrated at three months post-irradiation in Lewis rats for a single dose of 20 Gy [70]. Histological sections revealed an infiltration of the extra cellular matrix between muscle fibers. Moreover, this increase was homogeneous in the three parts of the bladder (dome, body and trigone) [70]. In the model used by Ikeda et al., fibrosis was also visible 60 days after irradiation [71]. Finally, the fibrosis process is well described in CRC and the pathway is identified.

7.5. The Impaired Muscle Induces Contractility Deficit, and Increases Frequency of Miction as Well as Decreasing the Volume of Miction

Excessive deposition of ECM impairs muscle function and muscle regeneration after irradiation. The mechanism by which profibrotic factors activate muscle fibrosis is an essential step toward developing anti-fibrotic treatments. According to Ikeda et al., the increase in collagen density and the invasion of the extracellular matrix into the muscles leads to a loss of muscle and bladder contractile capacity. The consequence is incomplete, sudden and involuntary bladder contractions [63]. Based on studies by Stewart et al. and Zwaans et al., the loss of contractility causes an increase in urinary frequency but no change in the volume of urine. The importance of incontinence increases with the irradiation dose, but not the time of initiation, which occurs between four months and one year after irradiation [49,51,53,54,64]. In the Stewart study, the increased urinary frequencies are correlated with a decrease in total bladder volume [49,51,53,54]. Fragmentation plays a very important role in the onset of symptoms. The higher the number of fractionations, the greater the total radiation dose must be to have the same physiological effect. Based on the Stewart et al. and Kolher et al. studies, fractionation has a protective role on the bladder's capacities [54,68,74]. Further in-depth studies will therefore be needed to elucidate the mechanisms underlying these effects and to understand the possible implications of fibrosis on the loss of bladder contraction (Figure 7).

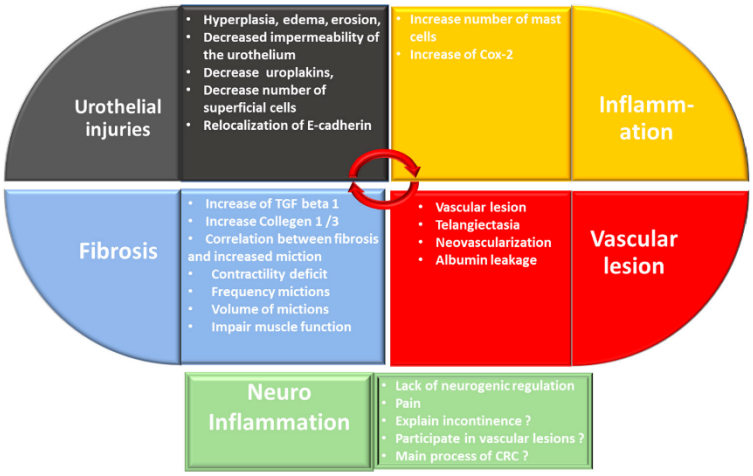


Figure 7. Synthesis of knowledge on the CRC and avenues for future study.

8. Conclusion

The etiology of CRC is poorly understood and is mainly related to urothelium degradation and hemorrhage. The reason for this is that there is only a small number of preclinical studies on the subject, thus limiting our understanding of this pathology. Furthermore, the studies that do exist focus mainly on telangiectasia, fibrosis, hematuria and loss of bladder function. The molecular process remains poorly described in terms of inflammation and detrusor muscle damage. There is a need to deepen our knowledge in order to develop a better understanding of the CRC pathology and be able to propose innovative treatments (Figure 8).

One point that has been poorly studied is the role of the urothelium in initiating CRC. Imperfect repair could explain the latency phase observed between the acute and chronic phases. The urothelium could be the initial element in the onset of the chronic phase of radiation cystitis. During the chronic phase, structural abnormalities of the urothelium, such as hyperplasia and cellular edema, favor incomplete repair and a decrease in the impermeability of the urothelium, allowing urine to infiltrate the tissues, thus promoting inflammation. During CRC, the urothelium presents molecular abnormalities with a decrease in Uroplakine III (Upk3) and E-cadherin (E-cad), which results in a decrease in impermeability. The complex processes of deregulation of the homeostasis of the urothelium may induce hyperplasia, thinning and loss of impermeability. A study of the correlation over time of the multiple cellular lesions of the urothelium, the renewal of the urothelium and its impermeability together would be necessary to better understand this process. Overall, preclinical studies tend to agree on the vascular origin of the appearance of CRC. The lesions caused by irradiation and by reactive oxygen species (ROS) to epithelial cells are proportional to the irradiation dose [57] and release pro-inflammatory factors. Activation of mast cells by these pro-inflammatory factors leads to neo-vascularization and permeability of the blood vessels [82]. The consequence is a presence of albumin outside the vessels that promotes the recruitment and activation of new mast cells. These leakages maintain the inflammation, which becomes chronic.

Inflammation induces significant fibrosis of the tissue (through the TGF and SMAD pathway) which invade the detrusor and the submucosa, particularly around the blood vessels, making them less "flexible". This fibrosis causes a decrease in bladder capacity and difficulties in contractions leading to spasms, emergencies, etc. The spasms provoke the rupture of the vessels, inducing microscopic and then macroscopic hematuria, which

favors inflammation. From then on, there will be a vicious circle with vascular damage producing inflammation, neuroinflammation, lack of neurogenic control promoting pain, fibrosis and vascular lesions. According to Steineck et al. [106], we might find new insights if we try to better understand which pathophysiological processes are triggered by radiotherapy at the organ level. For the irradiated bladder, is there a chronological sequence of pathophysiological events or a neurogenic lack of definitive controls leading to CRC?

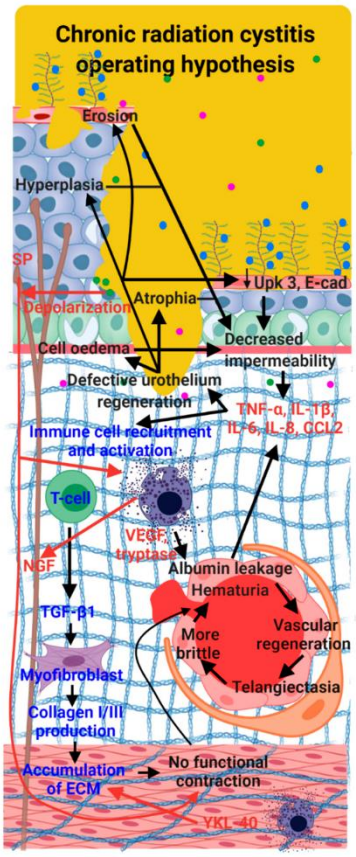


Figure 8. Hypothesis of CRC mechanisms in red. The first step is urothelium destruction mediating hyperplasia, cellular edema or atrophy. The secretion of inflammatory factors produced by urothelial injuries (TNF- , IL1-β, IL-6, IL-8 and chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)) induces enrolment and stimulation of immune cells (mast cells). Mast cells secrete VEGF and tryptases, which induce vascular damage and imperfect vascular regeneration, telangiectasia, amplified vascular permeability, hematuria. This leads to the release of albumin. Albumin strengthens the secretion of pro-inflammatory factors which increase inflammation and may lead to the preservation of urothelial injuries. Mast cells, through the secretion of NGF, mediate the hyperactivation of nerve fibers. Secretion of TGF-β could mediate excessive deposition of ECM (collagen I and III, fibronectin) in the submucosa and smooth muscle. Black arrows indicate specific mechanisms of CRC, blue arrows designate shared mechanisms between CRC, interstitial and hemorrhagic cystitis; and red arrows specify hypotheses of how radiation cystitis may operate based on mechanisms of both interstitial and hemorrhagic cystitis.

Author Contributions: C.B., A.-C.L. and A.C. conception and interpretation, manuscript writing. J.-M.S., F.M., and M.B.: manuscript revision. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: No funding.

Figure: Figure 8 is an original creation, created with BioRender.com (Agreement number: NZ23IA1G8U)

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. The Global Cancer Observatory: International Agency for Research on Cancer: World Health Organization 2020 (Globocan). Number of new cases in 2020 bs, all ages and number of deaths in 2020, both sexes, all ages. Available online: https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf (accessed on 2 February 2022).
2. INCA. Institut National du Cancer: Les cancers en France en 2018 - L'essentiel des faits et chiffres (édition 2019). France: Institut national du cancer; Février 2019. 28 p. Available online: https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Les-cancers-en-France-en-2018-L-essentiel-des-faits-et-chiffres-edition-2019 (accessed on 2 february 2022).
3. Andreyev, H.J.; Wotherspoon, A.; Denham, J.W.; Hauer-Jensen, M. "Pelvic radiation disease": New understanding and new solutions for a new disease in the era of cancer survivorship. *Scand. J. Gastroenterol.* **2011**, *46*, 389–397. https://doi.org/10.3109/00365521.2010.545832.
4. Trotman, J.; Nivison-Smith, I.; Dodds, A. Haemorrhagic cystitis: Incidence and risk factors in a transplant population using hyperhydration. *Bone Marrow Transplant.* **1999**, *23*, 797–801. https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1701644.
5. Cesaro, S.; Brugiolo, A.; Faraci, M.; Uderzo, C.; Rondelli, R.; Favre, C.; Zecca, M.; Garetto, G.; Dini, G.; Pillon, M.; et al. Incidence and treatment of hemorrhagic cystitis in children given hematopoietic stem cell transplantation: A survey from the Italian association of pediatric hematology oncology-bone marrow transplantation group. *Bone Marrow Transplant.* **2003**, *32*, 925–931. https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1704252.
6. Rigaud, J.; Hetet, J.F.; Bouchot, O. Management of radiation cystitis. *Prog. Urol. J. Assoc. Fr. Urol. Soc. Fr. Urol.* **2004**, *14*, 568–572.
7. Smit, S.G.; Heyns, C.F. Management of radiation cystitis. *Nat. Rev. Urol.* **2010**, *7*, 206–214. https://doi.org/10.1038/nrurol.2010.23.
8. Helissey, C.; Cavallero, S.; Brossard, C.; Dusaud, M.; Chargari, C.; Francois, S. Chronic Inflammation and Radiation-Induced Cystitis: Molecular Background and Therapeutic Perspectives. *Cells* **2020**, *10*, 21. https://doi.org/10.3390/cells10010021.
9. Duverge, L.; Castelli, J.; Lizee, T.; de Crevoisier, R.; Azria, D. Doses to organs at risk for conformational and stereotactic radiotherapy: Bladder. *Cancer Radiother. J. Soc. Fr. Radiother. Oncol.* **2017**, *21*, 597–603. https://doi.org/10.1016/j.canrad.2017.07.038.
10. SFRO. GUIDE DES PROCEDURES DE RADIOTHERAPIE EXTERNE 2007. France: Société Française de Radiothérapie Oncologique, 2007. Available online: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2008-08/guide_de_rth_des_tumeurs_v7_complet.pdf (accessed on 2 February 2022).
11. Devisetty, K.; Mell, L.K.; Salama, J.K.; Schomas, D.A.; Miller, R.C.; Jani, A.B.; Roeske, J.C.; Aydogan, B.; Chmura, S.J. A multi-institutional acute gastrointestinal toxicity analysis of anal cancer patients treated with concurrent intensity-modulated radiation therapy (IMRT) and chemotherapy. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2009**, *93*, 298–301. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2009.07.006.
12. Vieillot, S.; Fenoglietto, P.; Lemanski, C.; Moscardo, C.L.; Gourgou, S.; Dubois, J.B.; Ailleres, N.; Azria, D. IMRT for locally advanced anal cancer: Clinical experience of the Montpellier Cancer Center. *Radiat. Oncol.* **2012**, *7*, 45. https://doi.org/10.1186/1748-717X-7-45.
13. Kachnic, L.A.; Pugh, S.L.; Tai, P.; Smith, M.; Gore, E.; Shah, A.B.; Martin, A.G.; Kim, H.E.; Nabid, A.; Lawton, C.A. RTOG 0518: Randomized phase III trial to evaluate zoledronic acid for prevention of osteoporosis and associated fractures in prostate cancer patients. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2013**, *16*, 382–386. https://doi.org/10.1038/pcan.2013.35.
14. Upadhyay, R.; Carthikeyan, S.M.; Pathy, S. Radiation cystitis: A late effect of radiotherapy in a patient with cervical rhabdomyosarcoma. *J. Cancer Res. Ther.* **2021**, *17*, 580–583. https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_500_19.
15. Zwaans, B.M.M.; Wegner, K.A.; Bartolone, S.N.; Vezina, C.M.; Chancellor, M.B.; Lamb, L.E. Radiation cystitis modeling: A comparative study of bladder fibrosis radio-sensitivity in C57BL/6, C3H, and BALB/c mice. *Physiol. Rep.* **2020**, *8*, e14377. https://doi.org/10.14814/phy2.14377.
16. Stewart, F.A. Mechanism of bladder damage and repair after treatment with radiation and cytostatic drugs. *Br. J. Cancer. Suppl.* **1986**, *7*, 280–291.
17. El-Benhawy, S.A.; Sadek, N.A.; Kamel, M.M.; Sharaf, A.M.; Abderhman, I.G.; Morsi, M.I.; Abobakr, A. Study the relationship of endothelial damage/dysfunction due to occupational exposure to low dose ionizing radiation versus high dose exposure during radiotherapy. *Cancer Treat. Res. Commun.* **2020**, *25*, 100215. https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2020.100215.
18. Parsons, C.L.; Stein, P.C.; Bidair, M.; Lebow, D. Abnormal sensitivity to intravesical potassium in interstitial cystitis and radiation cystitis. *Neurourol. Urodyn.* **1994**, *13*, 515–520. https://doi.org/10.1002/nau.1930130503.

19. Marks, L.B.; Carroll, P.R.; Dugan, T.C.; Anscher, M.S. The response of the urinary bladder, urethra, and ureter to radiation and chemotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1995**, *31*, 1257–1280. https://doi.org/10.1016/0360-3016(94)00431-J.
20. Zwaans, B.M.; Krueger, S.; Bartolone, S.N.; Chancellor, M.B.; Marples, B.; Lamb, L.E. Modeling of chronic radiation-induced cystitis in mice. *Adv. Radiat. Oncol.* **2016**, *1*, 333–343. https://doi.org/10.1016/j.adro.2016.07.004.
21. Akiyama, Y.; Luo, Y.; Hanno, P.M.; Maeda, D.; Homma, Y. Interstitial cystitis/bladder pain syndrome: The evolving landscape, animal models and future perspectives. *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.* **2020**, *27*, 491–503. https://doi.org/10.1111/iju.14229.
22. Vanneste, B.G.L.; Van Limbergen, E.J.; Marcelissen, T.A.; van Roermund, J.G.H.; Lutgens, L.C.; Arnoldussen, C.; Lambin, P.; Oelke, M. Development of a Management Algorithm for Acute and Chronic Radiation Urethritis and Cystitis. *Urol. Int.* **2022**, *106*, 63–74. https://doi.org/10.1159/000515716.
23. Fajardo, L.F.; Berthrong, M. Radiation injury in surgical pathology. Part I. *Am. J. Surg. Pathol.* **1978**, *2*, 159–199. https://doi.org/10.1097/00000478-197806000-00005.
24. Gowing, N.F. Congenital fibro-elastosis of the endocardium. *J. Pathol. Bacteriol.* **1953**, *65*, 13–28. https://doi.org/10.1002/path.1700650103.
25. Stewart, F.; Randhawa, V.; Maughan, R. The RBE for mouse bladders after irradiation with 1 to 8 fractions of d(4)+Be neutrons. *Br. J. Radiol.* **1986**, *59*, 61–68. https://doi.org/10.1259/0007-1285-59-697-61.
26. Pavy, J.J.; Denekamp, J.; Letschert, J.; Littbrand, B.; Mornex, F.; Bernier, J.; Gonzales-Gonzales, D.; Horiot, J.C.; Bolla, M.; Bartelink, H.; EORTC Late Effects Working Group. Late effects toxicity scoring: The SOMA scale. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **1995**, *35*, 11–15. https://doi.org/10.1016/0167-8140(95)97448-m.
27. Droller, M.J.; Saral, R.; Santos, G. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. *Urology* **1982**, *20*, 256–258. https://doi.org/10.1016/0090-4295(82)90633-1.
28. Brugieres, L.; Hartmann, O.; Travagli, J.P.; Benhamou, E.; Pico, J.L.; Valteau, D.; Kalifa, C.; Patte, C.; Flamant, F.; Lemerle, J. Hemorrhagic cystitis following high-dose chemotherapy and bone marrow transplantation in children with malignancies: Incidence, clinical course, and outcome. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **1989**, *7*, 194–199. https://doi.org/10.1200/JCO.1989.7.2.194.
29. Bearman, S.I.; Appelbaum, F.R.; Buckner, C.D.; Petersen, F.B.; Fisher, L.D.; Clift, R.A.; Thomas, E.D. Regimen-related toxicity in patients undergoing bone marrow transplantation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **1988**, *6*, 1562–1568. https://doi.org/10.1200/JCO.1988.6.10.1562.
30. Arthur, R.R.; Shah, K.V.; Baust, S.J.; Santos, G.W.; Saral, R. Association of BK viruria with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants. *N. Engl. J. Med.* **1986**, *315*, 230–234. https://doi.org/10.1056/NEJM198607243150405.
31. Tucker, S.L.; Dong, L.; Bosch, W.R.; Michalski, J.; Winter, K.; Mohan, R.; Purdy, J.A.; Kuban, D.; Lee, A.K.; Cheung, M.R.; et al. Late rectal toxicity on RTOG 94-06: Analysis using a mixture Lyman model. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2010**, *78*, 1253–1260. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.01.069.
32. LENT SOMA scales for all anatomic sites. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1995**, *31*, 1049–1091. https://doi.org/10.1016/0360-3016(95)90159-0.
33. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 5.0. United States of America: National Cancer Institute, 27 November 2017. Available online: https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcae_v5_quick_reference_5x7.pdf (accessed on 2 February 2022).
34. Henningsohn, L.; Wijkstrom, H.; Dickman, P.W.; Bergmark, K.; Steineck, G. Distressful symptoms after radical radiotherapy for urinary bladder cancer. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2002**, *62*, 215–225. https://doi.org/10.1016/s0167-8140(01)00455-8.
35. Soytas, M.; Kactan, C.; Guven, S. Recurrent bladder cystitis: Who takes the role? *World J. Urol.* **2020**, *38*, 2755–2760. https://doi.org/10.1007/s00345-020-03192-1.
36. Kelleher, C.; Hakimi, Z.; Zur, R.; Siddiqui, E.; Maman, K.; Aballea, S.; Nazir, J.; Chapple, C. Efficacy and Tolerability of Mirabegron Compared with Antimuscarinic Monotherapy or Combination Therapies for Overactive Bladder: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *Eur. Urol.* **2018**, *74*, 324–333. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.03.020.
37. Villeirs, L.; Tailly, T.; Ost, P.; Waterloos, M.; Decaestecker, K.; Fonteyne, V.; Van Praet, C.; Lumen, N. Hyperbaric oxygen therapy for radiation cystitis after pelvic radiotherapy: Systematic review of the recent literature. *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.* **2020**, *27*, 98–107. https://doi.org/10.1111/iju.14130.
38. Browne, C.; Davis, N.F.; Mac Craith, E.; Lennon, G.M.; Mulvin, D.W.; Quinlan, D.M.; Mc Vey, G.P.; Galvin, D.J. A Narrative Review on the Pathophysiology and Management for Radiation Cystitis. *Adv. Urol.* **2015**, *2015*, 346812. https://doi.org/10.1155/2015/346812.
39. Dautruche, A.; Delouya, G. A contemporary review about the management of radiation-induced hemorrhagic cystitis. *Curr. Opin. Supportive Palliat. Care* **2018**, *12*, 344–350. https://doi.org/10.1097/SPC.0000000000000375.
40. Pascoe, C.; Duncan, C.; Lamb, B.W.; Davis, N.F.; Lynch, T.H.; Murphy, D.G.; Lawrentschuk, N. Current management of radiation cystitis: A review and practical guide to clinical management. *BJU Int.* **2019**, *123*, 585–594. https://doi.org/10.1111/bju.14516.
41. Sanguedolce, F.; Sancho Pardo, G.; Mercade Sanchez, A.; Balana Lucena, J.; Pisano, F.; Cortez, J.C.; Territo, A.; Huguet Perez, J.; Gaya Sopena, J.; Esquina Lopez, C.; et al. Radiation-induced haemorrhagic cystitis after prostate cancer radiotherapy: Factors associated to hospitalization and treatment strategies. *Prostate Int.* **2021**, *9*, 48–53. https://doi.org/10.1016/j.prnil.2020.07.006.

42. Haldar, S.; Dru, C.; Bhowmick, N.A. Mechanisms of hemorrhagic cystitis. *Am. J. Clin. Exp. Urol.* **2014**, *2*, 199–208.
43. Choong, S.K.; Walkden, M.; Kirby, R. The management of intractable haematuria. *BJU Int.* **2000**, *86*, 951–959. https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.2000.00900.x.
44. Seear, M.D.; Dimmick, J.E.; Rogers, P.C. Acute aluminum toxicity after continuous intravesical alum irrigation for hemorrhagic cystitis. *Urology* **1990**, *36*, 353–354. https://doi.org/10.1016/0090-4295(90)80247-k.
45. Koc, S.; Hagglund, H.; Ireton, R.C.; Perez-Simon, J.A.; Collins, S.J.; Appelbaum, F.R. Successful treatment of severe hemorrhagic cystitis with cystectomy following matched donor allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **2000**, *26*, 899–901. https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1702611.
46. Ajith Kumar, S.; Prasanth, P.; Tripathi, K.; Ghosh, P. Hyperbaric oxygen—A new horizon in treating cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. *Indian J. Urol. IJU J. Urol. Soc. India* **2011**, *27*, 272–273. https://doi.org/10.4103/0970-1591.82849.
47. Pasquier, D.; Hoelscher, T.; Schmutz, J.; Dische, S.; Mathieu, D.; Baumann, M.; Lartigau, E. Hyperbaric oxygen therapy in the treatment of radio-induced lesions in normal tissues: A literature review. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2004**, *72*, 1–13. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2004.04.005.
48. Neheman, A.; Nativ, O.; Moskovitz, B.; Melamed, Y.; Stein, A. Hyperbaric oxygen therapy for radiation-induced haemorrhagic cystitis. *BJU Int.* **2005**, *96*, 107–109. https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2005.05577.x.
49. Heath, J.A.; Mishra, S.; Mitchell, S.; Waters, K.D.; Tiedemann, K. Estrogen as treatment of hemorrhagic cystitis in children and adolescents undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **2006**, *37*, 523–526. https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705280.
50. Demesmay, K.; Tissot, E.; Bulabois, C.E.; Bertrand, M.A.; Racadot, E.; Woronoff-Lemsi, M.C.; Cahn, J.Y.; Deconinck, E. Factor XIII replacement in stem-cell transplant recipients with severe hemorrhagic cystitis: A report of four cases. *Transplantation* **2002**, *74*, 1190–1192. https://doi.org/10.1097/00007890-200210270-00024.
51. Pihusch, M.; Bacigalupo, A.; Szer, J.; von Depka Prondzinski, M.; Gaspar-Blaudschun, B.; Hyveled, L.; Brenner, B. Recombinant activated factor VII in treatment of bleeding complications following hematopoietic stem cell transplantation. *J. Thromb. Haemost.* **2005**, *3*, 1935–1944. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01523.x.
52. Ippoliti, C.; Przepiorka, D.; Mehra, R.; Neumann, J.; Wood, J.; Claxton, D.; Gajewski, J.; Khouri, I.; van Besien, K.; Andersson, B.; et al. Intravesicular carboprost for the treatment of hemorrhagic cystitis after marrow transplantation. *Urology* **1995**, *46*, 811–815. https://doi.org/10.1016/s0090-4295(99)80349-5.
53. Fanourgiakis, P.; Georgala, A.; Vekemans, M.; Triffet, A.; De Bruyn, J.M.; Duchateau, V.; Martiat, P.; De Clercq, E.; Snoeck, R.; Wollants, E.; et al. Intravesical instillation of cidofovir in the treatment of hemorrhagic cystitis caused by adenovirus type 11 in a bone marrow transplant recipient. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2005**, *40*, 199–201. https://doi.org/10.1086/426594.
54. Bridges, B.; Donegan, S.; Badros, A. Cidofovir bladder instillation for the treatment of BK hemorrhagic cystitis after allogeneic stem cell transplantation. *Am. J. Hematol.* **2006**, *81*, 535–537. https://doi.org/10.1002/ajh.20567.
55. Linder, B.J.; Tarrell, R.F.; Boorjian, S.A. Cystectomy for refractory hemorrhagic cystitis: Contemporary etiology, presentation and outcomes. *J. Urol.* **2014**, *192*, 1687–1692. https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.06.030.
56. Cardinal, J.; Slade, A.; McFarland, M.; Keihani, S.; Hotaling, J.N.; Myers, J.B. Scoping Review and Meta-analysis of Hyperbaric Oxygen Therapy for Radiation-Induced Hemorrhagic Cystitis. *Curr. Urol. Rep.* **2018**, *19*, 38. https://doi.org/10.1007/s11934-018-0790-3.
57. Stewart, F.A.; Michael, B.D.; Denekamp, J. Late radiation damage in the mouse bladder as measured by increased urination frequency. *Radiat. Res.* **1978**, *75*, 649–659.
58. Stewart, F.A.; Denekamp, J.; Hirst, D.G. Proliferation kinetics of the mouse bladder after irradiation. *Cell Tissue Kinet.* **1980**, *13*, 75–89. https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1980.tb00451.x.
59. Stewart, F.A.; Randhawa, V.S.; Michael, B.D.; Denekamp, J. Repair during fractionated irradiation of the mouse bladder. *Br. J. Radiol.* **1981**, *54*, 799–804. https://doi.org/10.1259/0007-1285-54-645-799.
60. Stewart, F.A.; Randhawa, V.S.; Michael, B.D. Multifraction irradiation of mouse bladders. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **1984**, *2*, 131–140. https://doi.org/10.1016/s0167-8140(84)80049-3.
61. Stewart, F.A. The proliferative and functional response of mouse bladder to treatment with radiation and cyclophosphamide. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **1985**, *4*, 353–362. https://doi.org/10.1016/s0167-8140(85)80123-7.
62. Stewart, F.A.; Lundbeck, F.; Oussoren, Y.; Luts, A. Acute and late radiation damage in mouse bladder: A comparison of urination frequency and cystometry. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1991**, *21*, 1211–1219. https://doi.org/10.1016/0360-3016(91)90278-c.
63. Kohler, M.; Eppenberger, H.M.; Cordt-Riehle, I.; Michel, C. Urination frequency and cystic pressure resistance after fractionated whole or partial irradiation of the rabbit urinary bladder. *Acta Oncol.* **1992**, *31*, 673–677. https://doi.org/10.3109/02841869209083852.
64. Kohler, M.; Michel, C.; Zimmermann, A. Histological changes after fractionated whole or partial irradiation of the rabbit urinary bladder. *Acta Oncol.* **1995**, *34*, 199–204. https://doi.org/10.3109/02841869509093956.
65. Post, J.G.; te Poele, J.A.; Oussoren, Y.G.; Stewart, F.A. Radiation tolerance of normal mouse bladders after intravesical chemotherapy. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **1995**, *34*, 30–38. https://doi.org/10.1016/0167-8140(94)01471-e.

66. Kraft, M.; Oussoren, Y.; Stewart, F.A.; Dorr, W.; Schultz-Hector, S. Radiation-induced changes in transforming growth factor beta and collagen expression in the murine bladder wall and its correlation with bladder function. *Radiat. Res.* **1996**, *146*, 619–627.
67. Jaal, J.; Dorr, W. Radiation induced inflammatory changes in the mouse bladder: The role of cyclooxygenase-2. *J. Urol.* **2006**, *175*, 1529–1533. https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)00658-0.
68. Jaal, J.; Dorr, W. Radiation-induced damage to mouse urothelial barrier. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2006**, *80*, 250–256. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2006.07.015.
69. Jaal, J.; Dorr, W. Radiation induced late damage to the barrier function of small blood vessels in mouse bladder. *J. Urol.* **2006**, *176*, 2696–2700. https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.07.138.
70. Soler, R.; Vianello, A.; Fullhase, C.; Wang, Z.; Atala, A.; Soker, S.; Yoo, J.J.; Koudywilliam, J. Vascular therapy for radiation cystitis. *Neurourol. Urodyn.* **2011**, *30*, 428–434. https://doi.org/10.1002/nau.21002.
71. Ikeda, Y.; Zabbarova, I.V.; Birder, L.A.; Wipf, P.; Getchell, S.E.; Tyagi, P.; Fry, C.H.; Drake, M.J.; Kanai, A.J. Relaxin-2 therapy reverses radiation-induced fibrosis and restores bladder function in mice. *Neurourol. Urodyn.* **2018**, *37*, 2441–2451. https://doi.org/10.1002/nau.23721.
72. Lane, Z.; Epstein, J.I. Pseudocarcinomatous epithelial hyperplasia in the bladder unassociated with prior irradiation or chemotherapy. *Am. J. Surg. Pathol.* **2008**, *32*, 92–97. https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3180eaa1dc.
73. Kreft, M.E.; Jezernik, K.; Kreft, M.; Romih, R. Apical plasma membrane traffic in superficial cells of bladder urothelium. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1152*, 18–29. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.04004.x.
74. Kreft, M.E.; Hudoklin, S.; Jezernik, K.; Romih, R. Formation and maintenance of blood-urine barrier in urothelium. *Protoplasma* **2010**, *246*, 3–14. https://doi.org/10.1007/s00709-010-0112-1.
75. Varley, C.L.; Stahlschmidt, J.; Smith, B.; Stower, M.; Southgate, J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma reverses squamous metaplasia and induces transitional differentiation in normal human urothelial cells. *Am. J. Pathol.* **2004**, *164*, 1789–1798. https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63737-6.
76. Varley, C.L.; Stahlschmidt, J.; Lee, W.C.; Holder, J.; Diggle, C.; Selby, P.J.; Trejdosiewicz, L.K.; Southgate, J. Role of PPARgamma and EGFR signalling in the urothelial terminal differentiation programme. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 2029–2036. https://doi.org/10.1242/jcs.01042.
77. Sun, T.T. Altered phenotype of cultured urothelial and other stratified epithelial cells: Implications for wound healing. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2006**, *291*, F9–F21. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00035.2006.
78. Marilyn, P. Law. Radiation-Induced Vascular Injury and Its Relation to Late Effects in Normal Tissues. *Adv. Radiat. Biol.* **1991**, *9*, 37–73. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-035409-2.50007-2.
79. Milliat, F.; Francois, A.; Tamarat, R.; Benderitter, M. Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages. *Ann. Cardiol. Angeiol.* **2008**, *57*, 139–148. https://doi.org/10.1016/j.ancard.2008.02.015.
80. Milliat, F.; Francois, A.; Isoir, M.; Deutsch, E.; Tamarat, R.; Tarlet, G.; Atfi, A.; Validire, P.; Bourhis, J.; Sabourin, J.C.; et al. Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation: Implication in radiation-induced vascular damages. *Am. J. Pathol.* **2006**, *169*, 1484–1495. https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060116.
81. Richter, K.K.; Fink, L.M.; Hughes, B.M.; Shmaysani, H.M.; Sung, C.C.; Hauer-Jensen, M. Differential effect of radiation on endothelial cell function in rectal cancer and normal rectum. *Am. J. Surg.* **1998**, *176*, 642–647. https://doi.org/10.1016/s0002-9610(98)00280-3.
82. Wang, J.; Zheng, H.; Ou, X.; Fink, L.M.; Hauer-Jensen, M. Deficiency of microvascular thrombomodulin and up-regulation of protease-activated receptor-1 in irradiated rat intestine: Possible link between endothelial dysfunction and chronic radiation fibrosis. *Am. J. Pathol.* **2002**, *160*, 2063–2072. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61156-X.
83. Guipaud, O.; Jaillet, C.; Clement-Colmou, K.; Francois, A.; Supiot, S.; Milliat, F. The importance of the vascular endothelial barrier in the immune-inflammatory response induced by radiotherapy. *Br. J. Radiol.* **2018**, *91*, 20170762. https://doi.org/10.1259/bjr.20170762.
84. Verheij, M.; Dewit, L.G.; van Mourik, J.A. The effect of ionizing radiation on endothelial tissue factor activity and its cellular localization. *Thromb. Haemost.* **1995**, *73*, 894–895.
85. Verheij, M.; Dewit, L.; van Mourik, J.A. Radiation-induced von Willebrand factor release. *Blood* **1997**, *90*, 2109–2110.
86. Rubin, D.B.; Drab, E.A.; Ts'ao, C.H.; Gardner, D.; Ward, W.F. Prostacyclin synthesis in irradiated endothelial cells cultured from bovine aorta. *J. Appl. Physiol.* **1985**, *58*, 592–597. https://doi.org/10.1152/jappl.1985.58.2.592.
87. Zhou, Q.; Zhao, Y.; Li, P.; Bai, X.; Ruan, C. Thrombomodulin as a marker of radiation-induced endothelial cell injury. *Radiat. Res.* **1992**, *131*, 285–289.
88. Theoharides, T.C.; Kempuraj, D.; Sant, G.R. Mast cell involvement in interstitial cystitis: A review of human and experimental evidence. *Urology* **2001**, *57*, 47–55. https://doi.org/10.1016/s0090-4295(01)01129-3.
89. He, S.; Walls, A.F. Human mast cell tryptase: A stimulus of microvascular leakage and mast cell activation. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *328*, 89–97. https://doi.org/10.1016/s0014-2999(97)83033-6.
90. Mühlstädt, S.; Mohammed, N.; Weigand, K.; Schumann, A.; Kawan, F.; Göllert, C.; Fornara, P. Radiogen bedingte Zystitis. *Der Urol.* **2017**, *56*, 301–305. https://doi.org/10.1007/s00120-017-0319-2.
91. Kawamoto, K.; Noguchi, S.; Sakuramoto, T.; Shyuin, T.; Noguchi, K.; Kinoshita, Y.; Kubota, Y.; Hosaka, M. Clinical analysis of 46 cases of radiation cystitis. *Hinyokika Kiyo. Acta Urol. Jpn.* **1992**, *38*, 395–398.

92. Gh, D.; Kong, D.; Gautrot, J.; Vootla, S.K. Fabrication and Characterization of Conductive Conjugated Polymer-Coated Antheraea mylitta Silk Fibroin Fibers for Biomedical Applications. *Macromol. Biosci.* **2017**, *17*, 1600443. https://doi.org/10.1002/mabi.201600443.
93. Yahyapour, R.; Motevaseli, E.; Rezaeyan, A.; Abdollahi, H.; Farhood, B.; Cheki, M.; Najafi, M.; Villa, V. Mechanisms of Radiation Bystander and Non-Targeted Effects: Implications to Radiation Carcinogenesis and Radiotherapy. *Curr. Radiopharm.* **2018**, *11*, 34–45. https://doi.org/10.2174/1874471011666171229123130.
94. Najafi, M.; Shirazi, A.; Motevaseli, E.; Rezaeyan, A.H.; Salajegheh, A.; Rezapoor, S. Melatonin as an anti-inflammatory agent in radiotherapy. *Inflammopharmacology* **2017**, *25*, 403–413. https://doi.org/10.1007/s10787-017-0332-5.
95. Najafi, M.; Shirazi, A.; Motevaseli, E.; Geraily, G.; Norouzi, F.; Heidari, M.; Rezapoor, S. The melatonin immunomodulatory actions in radiotherapy. *Biophys. Rev.* **2017**, *9*, 139–148. https://doi.org/10.1007/s12551-017-0256-8.
96. Fardid, R.; Salajegheh, A.; Mosleh-Shirazi, M.A.; Sharifzadeh, S.; Okhovat, M.A.; Najafi, M.; Rezaeyan, A.; Abaszadeh, A. Melatonin Ameliorates the Production of COX-2, iNOS, and the Formation of 8-OHdG in Non-Targeted Lung Tissue after Pelvic Irradiation. *Cell J.* **2017**, *19*, 324–331. https://doi.org/10.22074/cellj.2016.3857.
97. Peeker, R.; Haghsheno, M.A.; Holmang, S.; Fall, M. Intravesical bacillus Calmette-Guerin and dimethyl sulfoxide for treatment of classic and nonulcer interstitial cystitis: A prospective, randomized double-blind study. *J. Urol.* **2000**, *164*, 1912–1916. https://doi.org/10.1016/s0022-5347(05)66916-9.
98. Parsons, C.L.; Zupkas, P.; Parsons, J.K. Intravesical potassium sensitivity in patients with interstitial cystitis and urethral syndrome. *Urology* **2001**, *57*, 428–432. https://doi.org/10.1016/s0090-4295(00)01110-9.
99. Sant, G.R.; Kempuraj, D.; Marchand, J.E.; Theoharides, T.C. The mast cell in interstitial cystitis: Role in pathophysiology and pathogenesis. *Urology* **2007**, *69*, 34–40. https://doi.org/10.1016/j.urology.2006.08.1109.
100. Chen, Y.T.; Chen, K.H.; Sung, P.H.; Yang, C.C.; Cheng, B.C.; Chen, C.H.; Chang, C.L.; Sheu, J.J.; Lee, F.Y.; Shao, P.L.; et al. Extracorporeal shock wave markedly alleviates radiation-induced chronic cystitis in rat. *Am. J. Transl. Res.* **2018**, *10*, 1036–1052.
101. Chen, Y.L.; Lin, Y.P.; Sun, C.K.; Huang, T.H.; Yip, H.K.; Chen, Y.T. Extracorporeal shockwave against inflammation mediated by GPR120 receptor in cyclophosphamide-induced rat cystitis model. *Mol. Med.* **2018**, *24*, 60. https://doi.org/10.1186/s10020-018-0062-1.
102. Chen, Y.T.; Yang, C.C.; Sung, P.H.; Lin, K.C.; Chiang, J.Y.; Huang, C.R.; Huang, K.H.; Chuang, F.C.; Chu, Y.C.; Huang, E.Y.; et al. Long-term effect of extracorporeal shock wave therapy on attenuating radiation-induced chronic cystitis in rat. *Am. J. Transl. Res.* **2020**, *12*, 999–1015.
103. Durand, C.; Pezet, S.; Eutamene, H.; Demarquay, C.; Mathieu, N.; Moussa, L.; Daudin, R.; Holler, V.; Sabourin, J.C.; Milliat, F.; et al. Persistent visceral allodynia in rats exposed to colorectal irradiation is reversed by mesenchymal stromal cell treatment. *Pain* **2015**, *156*, 1465–1476. https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000190.
104. Giglio, D.; Podmolikova, L.; Tobin, G. Changes in the Neuronal Control of the Urinary Bladder in a Model of Radiation Cystitis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2018**, *365*, 327–335. https://doi.org/10.1124/jpet.117.246371.
105. Koh, S.D.; Lee, H.; Ward, S.M.; Sanders, K.M. The Mystery of the Interstitial Cells in the Urinary Bladder. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2018**, *58*, 603–623. https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052615.
106. Steineck, G.; Bull, C.; Kalm, M.; Sjoberg, F.; Alevronta, E.; Malipatlolla, D.K.; Bergmark, K.; Jeppsson, B.; Wilderang, U.; Bjork-Eriksson, T. Radiation physiology—Evidence for a higher biological effect of 24 Gy in four fractions as compared to three. *Acta Oncol.* **2017**, *56*, 1240–1243. https://doi.org/10.1080/0284186X.2017.1309062.

Annexe 4: Molecular mechanisms and key processes of cystitis

biology

MDPI

Review

Molecular Mechanisms and Key Processes in Interstitial, Hemorrhagic and Radiation Cystitis

Clément Brossard [1], Anne-Charlotte Lefranc [1], Anne-Laure Pouliet [1], Jean-Marc Simon [2], Marc Benderitter [1], Fabien Milliat [1] and Alain Chapel [1,*]

[1] Laboratoire de Radiobiologie des Expositions Médicales (LRMED), Service de Recherche en Radiobiologie et en Médecine Régénérative (SERAMED), Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), 92260 Fontenay-aux-Roses, France; clement.brossard@irsn.fr (C.B.); charlotte1810.lefranc@gmail.com (A.-C.L.); anne-laure.pouliet@irsn.fr (A.-L.P.); marc.benderitter@irsn.fr (M.B.); fabien.milliat@irsn.fr (F.M.)

[2] Radiotherapy Oncology Department, Hôpital Universitaire Pitié-Salpêtrière, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, CEDEX 13, 75651 Paris, France; jean-marc.simon@aphp.fr

* Correspondence: alain.chapel@irsn.fr; Tel.: +33-1-583-595-46

Simple Summary: Pathologies of the bladder are called cystitis. They cause discomfort for the patient. Due to persistent pain, bleeding, urinary incontinence, and uncontrolled urination, the chronic forms cause considerable degradation to patient quality of life. Currently, there is no curative treatment for the most severe forms. This is both an economic and a societal problem. Although the different forms of cystitis have different causes, they share common mechanisms. We propose to describe in detail the key processes and the associated mechanisms involved in abacterial cystitis.

Abstract: Cystitis is a bladder disease with a high rate of prevalence in the world population. This report focuses on Interstitial Cystitis (IC), Hemorrhagic Cystitis (HC) and Chronic Radiation Cystitis. These pathologies have different etiologies, but they share common symptoms, for instance, pain, bleeding, and a contracted bladder. Overall, treatments are quite similar for abacterial cystitis, and include bladder epithelium protective or anti-inflammatory agents, alleviating pain and reducing bleeding. This review summarizes the mechanisms that the pathologies have in common, for instance, bladder dysfunction and inflammation. Conversely, some mechanisms have been described as present in only one pathology, such as neural regulation. Based on these specificities, we propose identifying a mechanism that could be common to all the above-mentioned pathologies.

Keywords: cystitis; cancer; radiation; inflammation; bleeding; pelvic radiation disease; mechanism

check for updates

Citation: Brossard, C.; Lefranc, A.-C.; Pouliet, A.-L.; Simon, J.-M.; Benderitter, M.; Milliat, F.; Chapel, A. Molecular Mechanisms and Key Processes in Interstitial, Hemorrhagic and Radiation Cystitis. *Biology* **2022**, *11*, 972. https://doi.org/10.3390/biology11070972

Academic Editor: Dario Siniscalco

Received: 28 April 2022
Accepted: 23 June 2022
Published: 28 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Cystitis is an acute or chronic inflammation of the bladder wall that may be related to infection, drugs, irradiation, or may be idiopathic. The most frequent cause of cystitis is infection, mainly by Escherichia coli [1]. In this article, we review the clinicopathologic features of Interstitial Cystitis, Hemorrhagic Cystitis and Radiation Cystitis, mainly comprising pelvic pain, incontinence, dysuria, and hematuria that may progress to hemorrhagic cystitis. Cystitis can be classified according to etiology and treatment approach into different subtypes such as traumatic, interstitial, eosinophilic, hemorrhagic, foreign body, emphysematous or radiation cystitis. In this review, we study the pathophysiological mechanisms of abacterial cystitis. We intend to define a common mechanism. Finally, we look ahead to a possible therapeutic approach to be investigated.

2. Structure and Function of the Bladder Wall

In order to fully appreciate the physiopathology of these diseases and the related mechanisms, an understanding of the structure of the urinary bladder wall is required.

The bladder wall is composed of the urothelium, the lamina propria, the detrusor, adventitia and serosa (Figure 1). The urothelium acts as a barrier against damaging solutes present in the urine and maintains osmotic pressure. The urothelium is made up of superficial cells, intermediate cells, basal cells, and basal stem cells. Superficial cells of the urothelium play a major role in the barrier function because these cells are in contact with the bladder lumen [1]. Basal cells contain stem cells able to regenerate the urothelium [2], which are basically quiescent until injury [3]. The lamina propria is located below the urothelium. The lamina propria may be subdivided into two parts, the upper lamina propria (ULP), just below the urothelium, and the deep lamina propria (DLP), between the ULP and the detrusor (Figure 1). The detrusor is composed of smooth muscles. This layer of muscles is divided into three, namely a longitudinal, a circular and another layer of longitudinal muscles allowing efficient bladder contraction. Adventitia and serosa form a very thin tissue layer, which covers the surface of the bladder.

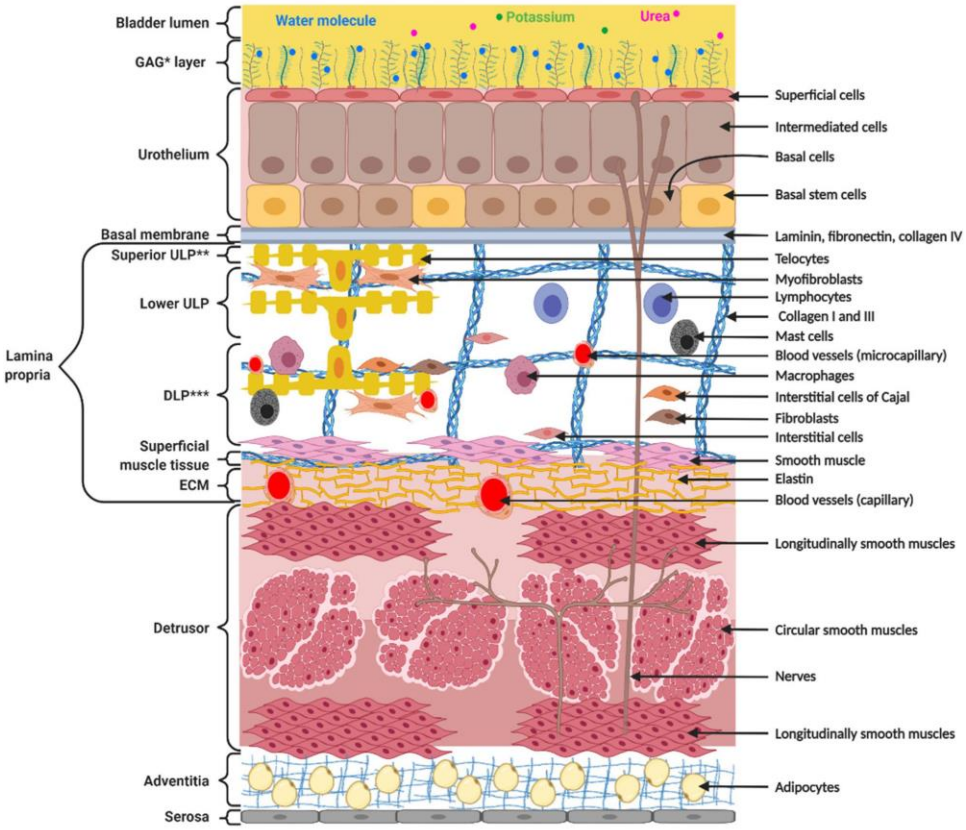


Figure 1. Structure and composition of the bladder wall. The bladder wall is composed of the urothelium, providing impermeability, the lamina propria, ensuring flexibility and compliance, the detrusor, allowing contractions, and the adventitia and serosa, protecting the bladder. * GAG = Glycoaminoglycan; ** ULP = upper lamina propria; *** DLP = deep lamina propria.

3. Discussion

3.1. Etiology, Prevalence and Clinical Features of Abacterial Cystitis

3.1.1. Interstitial Cystitis

Interstitial Cystitis (IC) is an idiopathic disease with chronic inflammation affecting the bladder (Table 1).

Table 1. Main features of each type of cystitis.

Pathology	Interstitial Cystitis	Hemorrhagic Cystitis *(Not a Distinct Form of Cystitis)*	Chronic Radiation Cystitis
Causes	Idiopathic disease	Radiation, Chemotherapy (cyclophosphamide and ifosfamide), Infections (bacterial, viral, fungal and parasitic), Drugs, Toxins, Idiopathic diseases, Organ transplant	Pelvic radiation
Signs	Pain, Day and night pollakiuria, Urinary urgency Dysuria, Incontinence, Hematuria (microscopic to severe macroscopic with clots)		
Symptoms	Dyspareunia Digestive and/or gynecological disorders Glomerulations	Severe form: urinary obstruction and acute renal failure	
Diagnosis	Cytobacteriological examination, Physical examination, Biopsy		
	Urodynamic examination Cystomanometry Voiding diary Questionnaires	Ultrasound	

The disease is most likely multifactorial in origin and includes genetic parameters and environmental aspects. The prevalence estimates in the past decade now exceed 10 million US citizens (3–7% in women and 2–4% in men) [4,5].

Clinical characteristics are urinary frequency, urgency, and pain. Latency from symptom onset to diagnosis of IC is variable and can range from 1 month to 30 years, with an average of about 5 years [6–11]. Two forms of Interstitial Cystitis are described, the ulcerative form (called Hunner's ulcer) and the non-ulcerative form. The ulcerative form accounts for 4 to 10% of IC cases. In the remainder of this review, we focus only on the non-ulcerative form of IC.

3.1.2. Hemorrhagic Cystitis

Hemorrhagic Cystitis (HC) is defined as a diffuse inflammatory disease of the bladder resulting in hemorrhage of the bladder mucosa.

Irradiation and chemotherapy using cyclophosphamide (CP) as treatment are the most common etiological agents [11–14].

The frequency of patients developing HC is 5–10% in the 6–20 years after radiation therapy [12] and 20–25% in the weeks or months after CP chemotherapy [13].

HC can progress to a severe hemorrhagic syndrome, resulting in loss of bladder function. To compare IC and CRC to HC, in the remainder of the review, we focus on cyclophosphamide-induced HC.

3.1.3. Chronic Radiation Cystitis

Chronic Radiation Cystitis (CRC) is a lesion of the bladder resulting from irradiation of a pelvic organ, particularly following radiation therapy (prostate, colon or cervix).

The chronic phase of Radiation Cystitis (CRC) may appear from 6 months to 20 years in 5–10% of patients after radiation therapy [13–20].

CRC is characterized by microscopic or macroscopic hematuria accompanied by pain and pollakiuria. Lesions range from a simple inflammatory reaction to almost complete loss of bladder function. The molecular mechanisms of CRC are insufficiently described in the literature, particularly regarding inflammatory processes and fibrosis.

4. Molecular Mechanisms in Cystitis

The molecular mechanisms of the different forms of cystitis are quite similar except for the neural aspect. Chronologically, they include urothelium dysfunction, inflammation, and vascular dysfunction followed by fibrosis. These mechanisms occur in cascades, and they self-amplify. The consequence is an aggravation of these pathologies over time. In the section below, we have classified our review according to these events and examined, first, the common then the specific mechanisms.

4.1. Bladder Mucosa Dysfunction

4.1.1. Common Mechanism

The loss of permeability of the bladder mucosa is the initiating point of cystitis. Although the agents of aggression are different, the consequence is a degradation on the entire bladder wall, which generates the other processes, namely inflammation, vascular attack and finally fibrosis. Below, we describe for each pathology the specific mechanisms responsible for the loss of impermeability of the bladder mucosa (Table 2).

Table 2. Pathophysiological mechanisms: Urothelium dysfunction and inflammation.

Mechanism	Interstitial Cystitis	Hemorrhagic Cystitis * *(* Not a Distinct Form of Cystitis)*	Chronic Radiation Cystitis
Urothelium dysfunction	Degradation of the GAG layer Alteration of permeability causing urinary potassium infiltration leading to activation of mast cells and depolarization of nerve and muscle fibers Alteration of the ATP/NO ratio Abnormal expression of APF inhibiting cell proliferation and the formation of tight junctions and preventing urothelium repair Cellular apoptosis	Urothelium degradation, subepithelial edema and ulceration Alteration of permeability	Decrease in the expression of uroplakin III and E-cadherin leading to a decrease in impermeability Hyperplasia, atrophy and/or erosion of urothelium Cellular edema (mainly in basal cells)
Inflammation	Production of IL-1β, IL-6, TNF-α Production of SCF, IL-8 and CCL2 by urothelium SCF-stimulated proliferation and activation of mast cells Degranulation of mast cells releasing histamine, IL-6, IL-8, prostaglandins, VEGF, NGF and tryptases Microvascular leakage and tryptase activation of mast cells Vasodilatation and immature angiogenesis caused by VEGF Insufficient pericyte coverage resulting in hemorrhagic vessels and hypoxia Over-expression of HIF-1α Increased expression of IL-16, IL-18, SCGFβ, CTACK, TRAIL, ICAM-1, MCP-3 and VCAM-1 in the bladder wall	Increase in COX-2 at the urothelium level Oxidative stress, cell damage and apoptosis/necrosis due to overproduction of ROS and RNS Induction of NF-κB and AP-1 in resident bladder cells due to the production of ROS, IL-1β and TNF-α Induction of iNOS leading to overproduction of NO and production of ROS caused by NF-κB and AP-1 Neutrophil Recruitment	Increased number of mastocytes in tissue No study on molecular mechanisms

4.1.2. Specific Mechanisms

Interstitial Cystitis

During Interstitial Cystitis, the bladder mucosa undergoes modifications such as thinning, as well as partial degradation of the GAG layer (Figure 2). These changes alter permeability, allowing urinary solutes such as potassium to infiltrate the bladder wall [21].

An increase in adenosine triphosphate (ATP) concentration or a decrease in nitric oxide (NO) may impair the bladder contraction function [22]. These alterations lead to an increase in antiproliferative factor (APF) expression and cell apoptosis [23]. APF inhibits cell proliferation and prevents repair of damaged bladder mucosa [24], contributing to

increased permeability. APF may also decrease the formation of tight junctions in urothelial cells [25]. Patients have a reduced expression of the tight junction proteins like zona occludens 1 and E-cadherin [26–31].

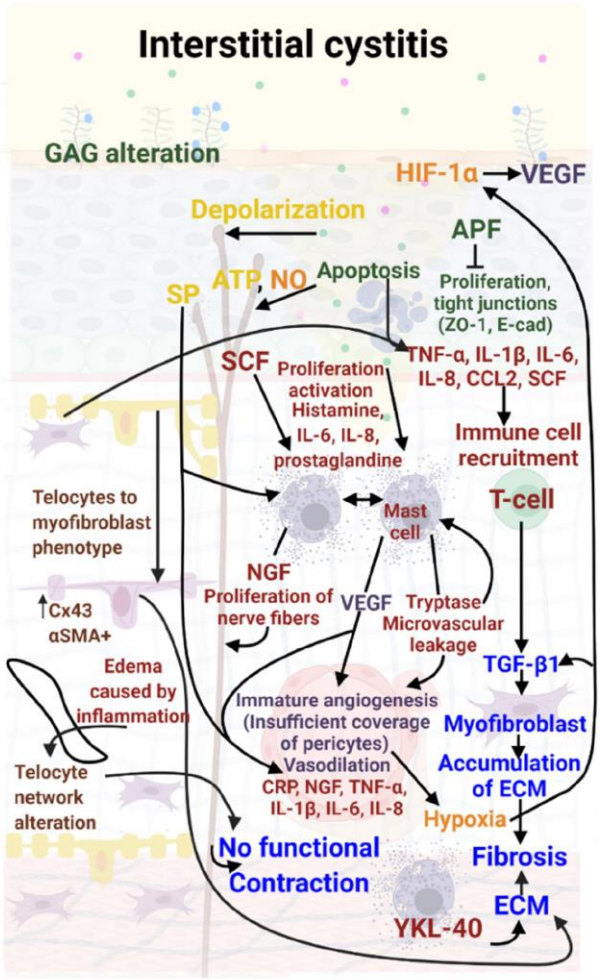


Figure 2. Molecular mechanisms involved in Interstitial Cystitis (IC). Bladder mucosa lesions induce inflammation mediated by IL-6, IL1 β, IL 8, CCL2 and TNF α to recruit T cells and mast cells. Mast cells produce tryptases and VEGF inducing vascular injury, creating hematuria and reinforcing inflammation. T lymphocytes produce TGF-β 1 inducing the transdifferentiation of fibroblasts into myofibroblasts. These myofibroblasts produce large amounts of ECM inducing fibrosis. Nerve damage due to potassium in urine and NGF produced by mast cells induces incomplete and intermittent contraction. Color code: red: inflammation; green: urothelial damage; blue: fibrosis, purple: vascular damage; orange: hypoxia, yellow: neuro-inflammation; brown: telocyte damage.

Hemorrhagic Cystitis

During Hemorrhagic Cystitis, dysfunction of the bladder mucosa is observed, however, the mechanism is different from that seen in IC (Figure 3). During chemotherapy, a portion

of CP or ifosfamide is metabolized in the liver to acrolein, which is then excreted by the kidneys and stored in the bladder until urination [32]. This metabolite is known to be the causative agent of CP-induced HC [33]. Acrolein causes damage manifested by subepithelial edema, neutrophil infiltration, cell death, neovascularization, hemorrhage and ulceration. These mechanisms are described in Figure 3.

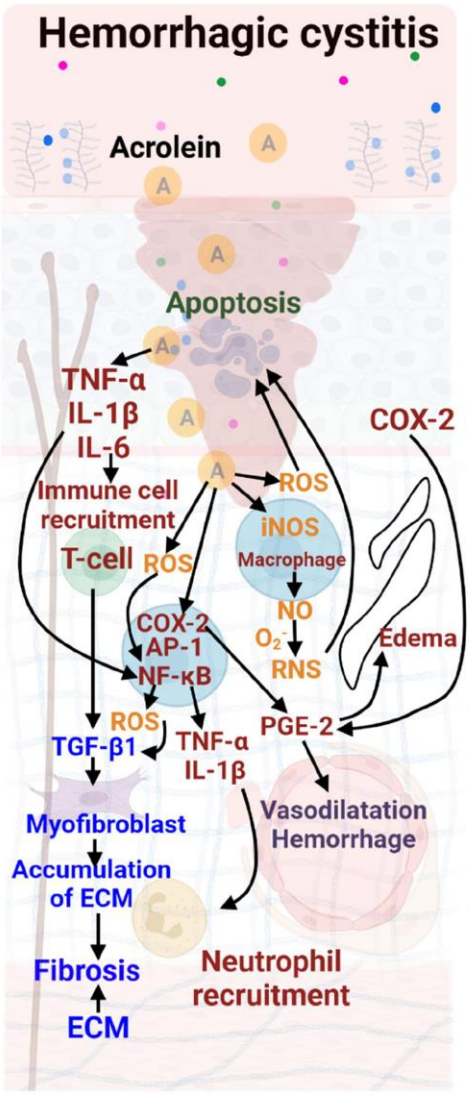


Figure 3. Molecular mechanisms involved in Hemorrhagic Cystitis (HC). Supplementary lesions are described as edema due to COX-2, which induces PGE-2. PGE-2 also induces vascular damage. A neutrophil recruitment is observed. Color code: red: inflammation; green: urothelial damage; blue: fibrosis; purple: vascular damage; orange: hypoxia.

Chronic Radiation Cystitis

In the first phase of Chronic Radiation Cystitis, a decrease in the number of superficial cells is observed [34,35]. In the late phase, the bladder mucosa shows structural lesions (Figure 4). In different animal models, hyperplasia, erosion of the urothelium, atrophy and cellular edema (especially in the basal cells) have been described. A decrease in the expression of both uroplakin III and E-cadherin in superficial cells induces a decrease in bladder tightness. Hyperplasia of intermediate cells remains the most frequently observed phenomenon [34–37]. Infiltration of urine into the tissues maintains inflammation and urothelium damage [34,35], as described in Figure 4.

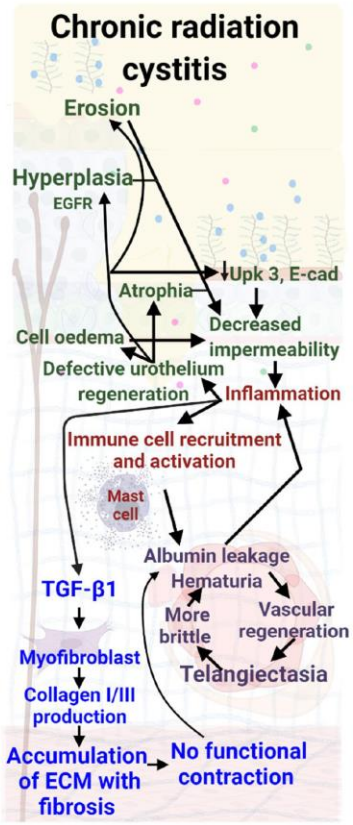


Figure 4. Molecular mechanisms involved in Chronic Radiation Cystitis (CRC). Several bladder mucosa lesions are described, such as hyperplasia, erosion, or atrophy. As far as inflammation is concerned, only the role of mast cells has been described. Fibrosis with collagen accumulation is defined but neither myofibroblast nor T-lymphocyte implication has been described; only an increase in TGF-β 1 production has been reported. Color code: red: inflammation; green: urothelial damage; blue: fibrosis; purple: vascular damage.

4.2. Inflammation

4.2.1. Common Mechanism

In these different forms of cystitis, mastocytes, telocytes and fibroblasts are the key effectors, with a common pathway initiated by cytokines produced by damaged urothelium.

However, the mechanisms seem to diverge, and their specificity is described for each form of cystitis below (see Table 2).

4.2.2. Specific Mechanisms

Interstitial Cystitis

In Interstitial Cystitis, damaged urothelium initiates production of the following inflammation cytokines and chemokines: stem cell factor (SCF), interleukin-8 (IL-8), interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF-α), nerve growth factor (NGF) and chemokine ligand 2 (CCL2) [23,38,39]. Telocytes are active players and intervene early in inflammation. Telocytes and myofibroblasts produce cytokines and other molecules that may recruit immune cells [40–42]. Infiltration of urine mediates depolarization of nerve and muscle cells and activation of mast cells [43]. During this process, the release of neurotransmitters by the urothelium, such as adenosine triphosphate (ATP), acetylcholine, and nitric oxide (NO), induces defective communication between the mucosa, the muscle layer and the afferent neuronal system. SCF stimulates mast cell proliferation and activation, particularly in ulcerous IC [44]. This release of mediators may explain the painful symptoms of IC [45,46]. Tryptase may induce microvascular leakage and reactivate mast cells [47], leading to further urothelial damage, chronic inflammation, and pain [48]. Inflammation induces edema, generating an increase in volume in the lamina propria, particularly in ULP [49,50]. The thickening of ULP is heterogeneous, principally in the lower ULP [50–52] and foci of hypersensitivity may alternate with foci of hyposensitivity, compromising the correct integration of related stimuli [53]. Chronic inflammation is associated with elevated serum CRP levels and decreased urinary tract symptoms [54].

Hemorrhagic Cystitis

In Hemorrhagic Cystitis, initially, acrolein causes an increase in pro-inflammatory mediators [55], and cyclooxygenase-2 (COX-2) and reactive nitrogen species (RNS) into the urothelium [56]. Acrolein chronologically causes ROS production in the bladder epithelium [57] and induces inducible nitric oxide synthases (iNOS), resulting in NO overproduction. NO toxicity is thought to result from the formation of RNS [58].

The consequences of overproduction of ROS and RNS during inflammation are oxidative stress, cell damage and cell death (apoptosis/necrosis) [59]. Nuclear transcription factor-kappa B (NF-κB) and activator protein 1 (AP-1) are then induced [57]. Their activation induces expression of pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β), induction of iNOS and increased production of ROS. These cytokines cause neutrophil infiltration at the inflammatory site, which may potentiate the inflammation [60].

Chronic Radiation Cystitis

In Chronic Radiation Cystitis, radiation-induced damage to epithelial cells releases pro-inflammatory factors that activate mast cells [61]. These cells actively participate in the production of pro-inflammatory cytokines and in vascular lesions. The presence of mast cells at the end of the early phase [37], and their persistence during the late phase [35], may favor chronic inflammation.

4.3. Vascular Response

4.3.1. Common Mechanism

In the forms of cystitis investigated, vascular response is a central factor common to all three. VEGF causes vasodilation and immature angiogenesis, resulting in microhemorrhagic vessels and hypoxia. Secondly, telangiectasia and albumin promote chemokine production. This production mediates the activation of mast cells which induces neovascularization and an increased permeability of blood vessels [62]. The consequence is the localization of albumin outside the vessels, promoting the recruitment and activation of new mast cells. It is therefore a mechanism that involves both inflammation and angio-

genesis to cause the leakage phenomenon. However, studies on the vascular response in specific pathologies have revealed complementary data, which are outlined below.

4.3.2. Specific Mechanisms

Interstitial Cystitis

In Interstitial Cystitis, a high concentration of VEGF in the bladder induces vasodilatation and immature angiogenesis, which may be responsible for the hypervascularization and glomerulations characteristic of IC [63,64]. Glomerulations are associated with overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1α) [65]. IL-16, IL-18, stem cell growth factor β (SCGFβ), cutaneous T-cell-attracting chemokine (CTACK), tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), monocyte-chemotactic protein 3 (MCP-3) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) expression significantly increase in the bladder wall of IC patients [66].

Hemorrhagic Cystitis

In Hemorrhagic Cystitis, a high concentration of VEGF has been found in the bladder of CP-treated rats along with a significant positive regulation of ICAM-1 gene expression [67]. Moreover, increased levels of MCP-1 and VCAM have been observed in a model of acute cystitis induced by CP in rats [68].

Chronic Radiation Cystitis

In Chronic Radiation Cystitis specifically, a significant decrease in vascular density in the cranial part of the bladder (the dome) has been reported [69]. In preclinical models, a decreased number of blood vessels without a decrease of surface has been observed [16,17]. This can be explained by the permanent increase in microvasculature diameter with thickening of the vessel wall (telangiectasia) present in the tissues [8,53]. This telangiectasia has been highlighted [35,61,70,71], with increased permeability of the blood vessels and immuno-histological observation of albumin around the small vessels [70]. Vascular lesions, telangiectasias and the presence of albumin can result in the activation of macrophages and mast cells, resulting in the release of large quantities of tryptase, which amplifies vascular lesions and fibrosis [45,47]. These alterations, as they worsen, may induce microscopic and then macroscopic hematuria as observable in CRC (Table 3).

Table 3. Pathophysiological mechanisms: Neural regulation, vascular lesions and fibrosis.

Mechanisms	Interstitial Cystitis	Hemorrhagic Cystitis * *(* Not a Distinct Form of Cystitis)*	Chronic Radiation Cystitis
Neural regulation	Release of substance P (SP) from C-fibers leading to vasodilation and degranulation of mast cells Increased nerve fiber proliferation caused by NGF Overexpression of SP receptor mRNA	Unknown	Unknown
Vascular lesions	High concentration of VEGF Overexpression of ICAM-1, VCAM-1 Vasodilatation and immature angiogenesis Hypervascularization Glomerulations Overexpression of HIF-1α, IL-16, IL-18, SCGFβ,CTACK, TRAIL, MCP-3	Overexpression of MCP-1	Telangiectasias Albumin leakage Micro- and macro-hematuria
Fibrosis	Increased TGF-β1expression Excessive deposition of ECM in the lamina propria (submucosa) and smooth muscle Positive regulation of collagen I and III, Myofibroblast formation Positive regulation of fibronectin Negative regulation of WNT11 Production of YKL-40 causing ECM accumulation Decreased contractile bladder capacity and bladder stiffening		

4.4. Fibrosis

4.4.1. Common Mechanism

Regarding Interstitial, Hemorrhagic and Radiation cystitis, a common feature is fibrosis, which may result in decreased contractile bladder capacity and bladder rigidification. Contractions are more difficult, resulting in urination dysfunction. Persistent inflammation is a prevalent denominator of fibrosis in these forms of cystitis. Fibrosis is caused by positive regulation of collagen I and III, fibronectin and TGFβ1 genes, negative regulation of WNT11 and production of YKL-40 by mast cells in IC. Based on these similarities, we can hypothesize that YKL40 may also play a key role, mainly due to mast cells present in large numbers in all forms of the pathology. Fibrosis invades the detrusor and lamina propria, particularly around the blood vessels, making them more rigid. The consequence is a decrease in bladder functionality and difficulty with contractions, producing spasms and emergencies, etc. Telocytes participate in the regulation of contractions, which may contribute to incontinence and spasms. Spasms favor rupture of the vessels, leading to microscopic hematuria and then to macroscopic hematuria, fostering inflammation, promoting fibrosis and then vascular lesions. Below, we describe in detail the specificity of each pathology with regard to fibrosis (Table 3).

4.4.2. Specific Mechanisms

Interstitial Cystitis

During Interstitial Cystitis, progressive pro-fibrotic changes in the bladder are mediated by the secretion of transforming growth factor β1 (TGF-β1) which induces the trans-differentiation of fibroblasts into myofibroblasts mediating an excessive deposition of extracellular matrix (ECM) (collagen I and III, fibronectin) in the lamina propria and smooth muscle [72]. These changes are associated with the positive regulation of collagen I and III genes [73], fibronectin [74], TGF-β1 [39,75], YKL-40 [76–78], and the negative regulation of sonic hedgehog (Shh), genes from the WNT family [74]. YKL-40 (also known as CHI3L1 for chitinase-3-like protein 1) is expressed in detrusor mast cell granules and submucosal macrophages. A higher expression of WNT2B and WNT5A has been quantified in patients with ulcerative IC. Conversely, negative regulation of WNT11 leads to pro-fibrotic changes in the bladder epithelial cells of patients with non-ulcerative IC [74]. Mast cells could amplify fibrosis [76–78]. Fibrosis and inflammation (with edema) contribute to this enlargement of the network's mesh, which favors spasm and incontinence because of disrupted communication between the telocytes and nerve fibers.

Hemorrhagic Cystitis

In chronic cases of Hemorrhagic Cystitis, fibrosis of the bladder wall may develop progressively [17].

Chronic Radiation Cystitis

Throughout Chronic Radiation Cystitis, TGF-β is strongly expressed in the urothelium and lamina propria (submucosa), and diffusely in the muscle layers [79]. An increase in the expression of collagen I and III is measured mainly in the submucosa and muscle [35,69,71,79,80]. Infiltration of the ECM between muscle fibers is observed, which is homogeneous in the three parts of the bladder (dome, body and trigone) [69,80]. The increase in collagen density and the invasion of the muscles by the ECM leads to a loss of muscle and contractile capacity of the bladder. The consequence is incomplete, abrupt and involuntary bladder contractions [80]. The loss of contractility results in increased urinary frequency but no change in urine volume. Urinary frequency is correlated with a decrease in total bladder volume [81–84].

4.5. Assumptions Regarding Central Mechanisms in Interstitial, Hemorrhagic and Radiation Cystitis

The hypotheses used to describe the central mechanisms involved are divided into four phases (Figure 5). The first phase is a decrease in the impermeability of the urothelium

due to erosion, hyperplasia, decreased uroplakin III, cellular edema or atrophy. In a second phase, the secretion of inflammatory factors produced by urothelial lesions (TNF-α, IL1-β, IL-6, IL-8 and CCL2) induce recruitment and activation of immune cells. Mast cells secrete VEGF and tryptases, inducing vascular damage. The consequences are imperfect vascular regeneration, leading to telangiectasia, increased vascular permeability, and hematuria, causing the release of albumin. This release amplifies the secretion of pro-inflammatory factor which increases inflammation and may lead to the maintenance of urothelial lesions. Mast cells could also act on the hyperactivation of nerve fibers through the secretion of NGF. A third phase might be the proliferation of nerve fibers, particularly those containing the neuropeptide substance P (SP). An increased reactivity to SP released by the perivascular sensory terminals could lead to a local cascade of neurogenic inflammatory responses that triggers pain. Edema and fibrosis enlarge this network, inducing miscommunication with the afferent nerves which could explain the spasms. This neurogenic inflammation reinforces chronic inflammation. T cells could also induce fibrosis through the secretion of TGF-β. The fourth phase entails myofibroblast formation and excessive deposition of ECM (collagen I and III, fibronectin) in the submucosa and smooth muscle. In addition, mast cells may amplify fibrosis through the production of YKL-40. This production of YKL-40 may increase the accumulation of ECM. Telocytes participate early in inflammation and may induce fibrosis by adopting a myofibroblast phenotype producing extra cellular matrix. Fibrosis leads to non-functional contractions that promote blood vessel damage, leading to further inflammation.

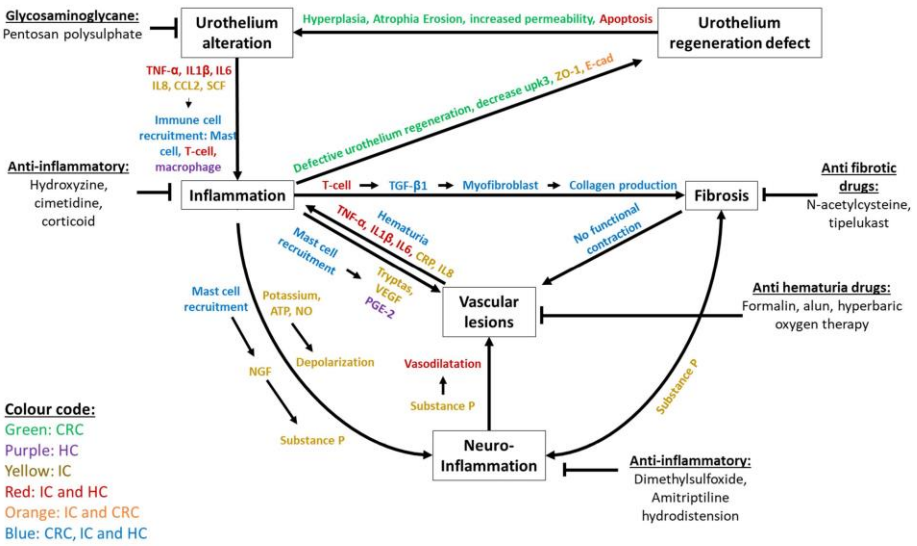


Figure 5. Synthetic description of the key processes and mechanisms shared by Interstitial, Hemorrhagic and Chronic Radiation Cystitis, including effectors and treatments. Color code: Green is used for effectors in CRC only, purple for those in HC only and yellow for those in IC only. Effectors found in IC and HC are shown in red and the effectors found in IC and CRC are shown in orange. The effectors common to CRC, IC and HC are shown in blue.

Treatments aim to reduce inflammation, vascular damage, fibrosis, urothelial damage and neuroinflammation (Figure 5). To reduce the loss of impermeability of the urothelium, glycosaminoglycan-based treatments have been used (mainly pentosan polysulphate). However, treatment times (over 6 months) and the high relapse rate (23% at 1 year) are significant limitations [85–90]. To reduce inflammation, drugs such as hydroxyzine, cimetidine and corticosteroids have been used. Hydroxyzine and cimetidine are used to reduce mast cell activation. These treatments have a low level of efficacy (<50%) and their effects stop when treatment is stopped [88,91,92]. As for corticoids, their action remains limited in time [93,94]. In order to reduce hemorrhages, intravesical instillation of formalin or alum can be used. The effect of this is the development of a vasoconstriction that reduces bleeding. These two techniques are less effective (<50% with recurrence rates of 10 to 25% over 6 months) and painful for the patient [85,88,95–97]. One last and more promising technique is hyperbaric oxygen therapy. This technique is designed to increase the supply of oxygen to stimulate angiogenesis. This has a success rate of 75% at 6 months, decreasing over time to 40% after a few years [91,98–100]. No anti-fibrotic drugs are recommended by the US Food and Drug Administration, but various preclinical treatments have been used, such as N-acetylcysteine and tipelukast [101,102].

To treat neuroinflammation, solutions such as dimethylsulfoxide (DMSO) or tricyclic antidepressant drugs have been used. DMSO has an analgesic effect on the afferent nerves. Despite a high level of efficacy (between 61 and 95%) [103], its limitations are an increase in urothelium lesions and increased fibrosis [85,87,88,91,103–105]. Tricyclic antidepressants (amitriptyline) have an efficacy rate of 50% to 66%, but decrease patients' quality of life (causing drowsiness and nausea) [106]. Lastly, hydrodistension can be used. This consists of distending the bladder to break the nerve pathways before reconstructing them. However, low efficacy (56% of cases) and the risk of aggravation (9%) limit the use of this technique [91,107,108]. The majority of the drugs mentioned in this review only act on one component of the system. It is therefore essential to provide patients with new therapeutic solutions that will act simultaneously and permanently on the multiple different mechanisms (e.g., inflammation and loss of impermeability) of cystitis described in this review. Cell therapy based on mesenchymal stem cells (MSCs) could be an effective and inexpensive alternative. MSCs induce increased tissue regeneration (epithelium, endothelium), induce immunomodulation, and limit fibrosis. MSCs have been used in a clinical setting to treat HC and CRC and have shown a complete reduction in bleeding and pain in patients following a single injection [109–111]. In the case of IC, many clinical trials are underway. MSCs are very promising and further studies on the mechanisms involved may provide insight into their mode of action.

Author Contributions: C.B., A.-C.L. and A.C.: conception and interpretation, manuscript writing. F.M. and M.B.: manuscript revision. Final approval of manuscript: all. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Janssen, D.A.; van Wijk, X.M.; Jansen, K.C.; van Kuppevelt, T.H.; Heesakkers, J.P.; Schalken, J.A. The distribution and function of chondroitin sulfate and other sulfated glycosaminoglycans in the human bladder and their contribution to the protective bladder barrier. *J. Urol.* **2013**, *189*, 336–342. [CrossRef] [PubMed]
2. Shin, K.; Lee, J.; Guo, N.; Kim, J.; Lim, A.; Qu, L.; Mysorekar, I.U.; Beachy, P.A. Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder. *Nature* **2011**, *472*, 110–114. [CrossRef] [PubMed]

3. Lang, R.; Liu, G.; Shi, Y.; Bharadwaj, S.; Leng, X.; Zhou, X.; Liu, H.; Atala, A.; Zhang, Y. Self-renewal and differentiation capacity of urine-derived stem cells after urine preservation for 24 hours. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e53980. [CrossRef] [PubMed]
4. Hanno, P.M. Interstitial cystitis-epidemiology, diagnostic criteria, clinical markers. *Rev. Urol.* **2002**, *4* (Suppl. S1), S3–S8.
5. Jones, C.A.; Nyberg, L. Epidemiology of interstitial cystitis. *Urology* **1997**, *49* (Suppl. S1), 2–9. [CrossRef]
6. Koziol, J.A.; Clark, D.C.; Gittes, R.F.; Tan, E.M. The natural history of interstitial cystitis: A survey of 374 patients. *J. Urol.* **1993**, *149*, 465–469. [CrossRef]
7. Alagiri, M.; Chottiner, S.; Ratner, V.; Slade, D.; Hanno, P.M. Interstitial cystitis: Unexplained associations with other chronic disease and pain syndromes. *Urology* **1997**, *49* (Suppl. S1), 52–57. [CrossRef]
8. Driscoll, A.; Teichman, J.M. How do patients with interstitial cystitis present? *J. Urol.* **2001**, *166*, 2118–2120. [CrossRef]
9. Ito, T.; Ueda, T.; Honma, Y.; Takei, M. Recent trends in patient characteristics and therapeutic choices for interstitial cystitis: Analysis of 282 Japanese patients. *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.* **2007**, *14*, 1068–1070. [CrossRef]
10. Peters, K.M.; Killinger, K.A.; Mounayer, M.H.; Boura, J.A. Are ulcerative and nonulcerative interstitial cystitis/painful bladder syndrome 2 distinct diseases? A study of coexisting conditions. *Urology* **2011**, *78*, 301–308. [CrossRef]
11. Marcu, I.; Campian, E.C.; Tu, F.F. Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome. *Semin. Reprod. Med.* **2018**, *36*, 123–135. [CrossRef] [PubMed]
12. Payne, H.; Adamson, A.; Bahl, A.; Borwell, J.; Dodds, D.; Heath, C.; Huddart, R.; McMenemin, R.; Patel, P.; Peters, J.L.; et al. Chemical- and radiation-induced haemorrhagic cystitis: Current treatments and challenges. *BJU Int.* **2013**, *112*, 885–897. [CrossRef] [PubMed]
13. Rigaud, J.; Hetet, J.F.; Bouchot, O. Management of radiation cystitis. *Prog. Urol. J. L'Assoc. Fr. D'Urol. Soc. Fr. D'Urol.* **2004**, *14*, 568–572.
14. Traxer, O.; Desgrandchamps, F.; Sebe, P.; Haab, F.; Le Duc, A.; Gattegno, B.; Thibault, P. Hemorrhagic cystitis: Etiology and treatment. *Prog. Urol. J. L'Assoc. Fr. D'Urol. Soc. Fr. D'Urol.* **2001**, *11*, 591–601.
15. Erard, V.; Kim, H.W.; Corey, L.; Limaye, A.; Huang, M.L.; Myerson, D.; Davis, C.; Boeckh, M. BK DNA viral load in plasma: Evidence for an association with hemorrhagic cystitis in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* **2005**, *106*, 1130–1132. [CrossRef]
16. Manikandan, R.; Kumar, S.; Dorairajan, L.N. Hemorrhagic cystitis: A challenge to the urologist. *Indian J. Urol. IJU J. Urol. Soc. India* **2010**, *26*, 159–166. [CrossRef]
17. de Vries, C.R.; Freiha, F.S. Hemorrhagic cystitis: A review. *J. Urol.* **1990**, *143*, 1–9. [CrossRef]
18. Brugieres, L.; Hartmann, O.; Travagli, J.P.; Benhamou, E.; Pico, J.L.; Valteau, D.; Kalifa, C.; Patte, C.; Flamant, F.; Lemerle, J. Hemorrhagic cystitis following high-dose chemotherapy and bone marrow transplantation in children with malignancies: Incidence, clinical course, and outcome. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **1989**, *7*, 194–199. [CrossRef]
19. Atkinson, K.; Biggs, J.; Noble, G.; Ashby, M.; Concannon, A.; Dodds, A. Preparative regimens for marrow transplantation containing busulphan are associated with haemorrhagic cystitis and hepatic veno-occlusive disease but a short duration of leucopenia and little oro-pharyngeal mucositis. *Bone Marrow Transpl.* **1987**, *2*, 385–394.
20. Crew, J.P.; Jephcott, C.R.; Reynard, J.M. Radiation-induced haemorrhagic cystitis. *Eur. Urol.* **2001**, *40*, 111–123. [CrossRef]
21. Parsons, C.L.; Greene, R.A.; Chung, M.; Stanford, E.J.; Singh, G. Abnormal urinary potassium metabolism in patients with interstitial cystitis. *J. Urol.* **2005**, *173*, 1182–1185. [CrossRef] [PubMed]
22. Patnaik, S.S.; Lagana, A.S.; Vitale, S.G.; Buttice, S.; Noventa, M.; Gizzo, S.; Valenti, G.; Rapisarda, A.M.C.; La Rosa, V.L.; Magno, C.; et al. Etiology, pathophysiology and biomarkers of interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Arch. Gynecol. Obstet.* **2017**, *295*, 1341–1359. [CrossRef] [PubMed]
23. Homma, Y.; Ueda, T.; Tomoe, H.; Lin, A.T.; Kuo, H.C.; Lee, M.H.; Oh, S.J.; Kim, J.C.; Lee, K.S. Clinical guidelines for interstitial cystitis and hypersensitive bladder updated in 2015. *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.* **2016**, *23*, 542–549. [CrossRef] [PubMed]
24. Keay, S.; Warren, J.W.; Zhang, C.O.; Tu, L.M.; Gordon, D.A.; Whitmore, K.E. Antiproliferative activity is present in bladder but not renal pelvic urine from interstitial cystitis patients. *J. Urol.* **1999**, *162*, 1487–1489. [CrossRef]
25. Zhang, C.O.; Wang, J.Y.; Koch, K.R.; Keay, S. Regulation of tight junction proteins and bladder epithelial paracellular permeability by an antiproliferative factor from patients with interstitial cystitis. *J. Urol.* **2005**, *174*, 2382–2387. [CrossRef]
26. Elbadawi, A.E.; Light, J.K. Distinctive ultrastructural pathology of nonulcerative interstitial cystitis: New observations and their potential significance in pathogenesis. *Urol. Int.* **1996**, *56*, 137–162. [CrossRef]
27. Tomaszewski, J.E.; Landis, J.R.; Russack, V.; Williams, T.M.; Wang, L.P.; Hardy, C.; Brensinger, C.; Matthews, Y.L.; Abele, S.T.; Kusek, J.W.; et al. Biopsy features are associated with primary symptoms in interstitial cystitis: Results from the interstitial cystitis database study. *Urology* **2001**, *57* (Suppl. S1), 67–81. [CrossRef]
28. Lai, M.C.; Kuo, Y.C.; Kuo, H.C. Intravesical hyaluronic acid for interstitial cystitis/painful bladder syndrome: A comparative randomized assessment of different regimens. *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.* **2013**, *20*, 203–207. [CrossRef]
29. Keay, S.K.; Birder, L.A.; Chai, T.C. Evidence for bladder urothelial pathophysiology in functional bladder disorders. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 865463. [CrossRef]
30. Hurst, R.E.; Greenwood-Van Meerveld, B.; Wisniewski, A.B.; VanGordon, S.; Lin, H.; Kropp, B.P.; Towner, R.A. Increased bladder permeability in interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Transl. Androl. Urol.* **2015**, *4*, 563–571.

31. Liu, H.T.; Shie, J.H.; Chen, S.H.; Wang, Y.S.; Kuo, H.C. Differences in mast cell infiltration, E-cadherin, and zonula occludens-1 expression between patients with overactive bladder and interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Urology* **2012**, *80*, 225.e13–225.e18. [CrossRef] [PubMed]
32. Lee, G.; Romih, R.; Zupancic, D. Cystitis: From urothelial cell biology to clinical applications. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 473536. [CrossRef] [PubMed]
33. Cox, P.J. Cyclophosphamide cystitis–identification of acrolein as the causative agent. *Biochem. Pharmacol.* **1979**, *28*, 2045–2049. [CrossRef]
34. Jaal, J.; Dorr, W. Radiation-induced damage to mouse urothelial barrier. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2006**, *80*, 250–256. [CrossRef]
35. Zwaans, B.; Krueger, S.; Bartolone, S.N.; Chancellor, M.B.; Marples, B.; Lamb, L.E. Modeling of chronic radiation-induced cystitis in mice. *Adv. Radiat. Oncol.* **2016**, *1*, 333–343. [CrossRef]
36. Kohler, M.; Eppenberger, H.M.; Cordt-Riehle, I.; Michel, C. Urination frequency and cystic pressure resistance after fractionated whole or partial irradiation of the rabbit urinary bladder. *Acta Oncol.* **1992**, *31*, 673–677. [CrossRef]
37. Rajaganapathy, B.R.; Janicki, J.J.; Levanovich, P.; Tyagi, P.; Hafron, J.; Chancellor, M.B.; Krueger, S.; Marples, B. Intravesical Liposomal Tacrolimus Protects against Radiation Cystitis Induced by 3-Beam Targeted Bladder Radiation. *J. Urol.* **2015**, *194*, 578–584. [CrossRef]
38. Jiang, Y.H.; Peng, C.H.; Liu, H.T.; Kuo, H.C. Increased pro-inflammatory cytokines, C-reactive protein and nerve growth factor expressions in serum of patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e76779. [CrossRef]
39. Wang, Q.; Wu, Q.; Wang, J.; Chen, Y.; Zhang, G.; Chen, J.; Zhao, J.; Wu, P. Ketamine Analog Methoxetamine Induced Inflammation and Dysfunction of Bladder in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 117. [CrossRef]
40. Albulescu, R.; Tanase, C.; Codrici, E.; Popescu, D.I.; Cretoiu, S.M.; Popescu, L.M. The secretome of myocardial telocytes modulates the activity of cardiac stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* **2015**, *19*, 1783–1794. [CrossRef]
41. Manole, C.G.; Cismasiu, V.; Gherghiceanu, M.; Popescu, L.M. Experimental acute myocardial infarction: Telocytes involvement in neo-angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* **2011**, *15*, 2284–2296. [CrossRef]
42. Cretoiu, D.; Cretoiu, S.M.; Simionescu, A.A.; Popescu, L.M. Telocytes, a distinct type of cell among the stromal cells present in the lamina propria of jejunum. *Histol. Histopathol.* **2012**, *27*, 1067–1078. [CrossRef] [PubMed]
43. Parsons, C.L.; Zupkas, P.; Parsons, J.K. Intravesical potassium sensitivity in patients with interstitial cystitis and urethral syndrome. *Urology* **2001**, *57*, 428–432. [CrossRef]
44. Sant, G.R.; Kempuraj, D.; Marchand, J.E.; Theoharides, T.C. The mast cell in interstitial cystitis: Role in pathophysiology and pathogenesis. *Urology* **2007**, *69*, 34–40. [CrossRef] [PubMed]
45. Theoharides, T.C.; Kempuraj, D.; Sant, G.R. Mast cell involvement in interstitial cystitis: A review of human and experimental evidence. *Urology* **2001**, *57*, 47–55. [CrossRef]
46. Peeker, R.; Enerback, L.; Fall, M.; Aldenborg, F. Recruitment, distribution and phenotypes of mast cells in interstitial cystitis. *J. Urol.* **2000**, *163*, 1009–1015. [CrossRef]
47. He, S.; Walls, A.F. Human mast cell tryptase: A stimulus of microvascular leakage and mast cell activation. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *328*, 89–97. [CrossRef]
48. Vanderwinden, J.M.; Rumessen, J.J.; de Kerchove d'Exaerde, A., Jr.; Gillard, K.; Panthier, J.J.; de Laet, M.H.; Schiffmann, S.N. Kit-negative fibroblast-like cells expressing SK3, a Ca^{2+}-activated K^+ channel, in the gut musculature in health and disease. *Cell Tissue Res.* **2002**, *310*, 349–358. [CrossRef]
49. Gevaert, T.; De Vos, R.; Everaerts, W.; Libbrecht, L.; Van Der Aa, F.; van den Oord, J.; Roskams, T.; De Ridder, D. Characterization of upper lamina propria interstitial cells in bladders from patients with neurogenic detrusor overactivity and bladder pain syndrome. *J. Cell. Mol. Med.* **2011**, *15*, 2586–2593. [CrossRef]
50. Gevaert, T.; Moles Lopez, X.; Sagaert, X.; Libbrecht, L.; Roskams, T.; Rorive, S.; Decaestecker, C.; Salmon, I.; De Ridder, D. Morphometric and quantitative immunohistochemical analysis of disease-related changes in the upper (suburothelial) lamina propria of the human bladder dome. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0127020. [CrossRef]
51. Vannucchi, M.G.; Traini, C. The telocytes/myofibroblasts 3-D network forms a stretch receptor in the human bladder mucosa. Is this structure involved in the detrusor overactive diseases? *Ann. Anat. = Anat. Anz. Off. Organ Anat. Ges.* **2018**, *218*, 118–123. [CrossRef] [PubMed]
52. Traini, C.; Fausssone-Pellegrini, M.S.; Guasti, D.; Del Popolo, G.; Frizzi, J.; Serni, S.; Vannucchi, M.G. Adaptive changes of telocytes in the urinary bladder of patients affected by neurogenic detrusor overactivity. *J. Cell. Mol. Med.* **2018**, *22*, 195–206. [CrossRef] [PubMed]
53. Fry, C.H.; Vahabi, B. The Role of the Mucosa in Normal and Abnormal Bladder Function. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2016**, *119* (Suppl. S3), 57–62. [CrossRef] [PubMed]
54. Chung, S.D.; Liu, H.T.; Lin, H.; Kuo, H.C. Elevation of serum c-reactive protein in patients with OAB and IC/BPS implies chronic inflammation in the urinary bladder. *Neurourol. Urodyn.* **2011**, *30*, 417–420. [CrossRef]
55. Dantas, A.C.; Batista-Junior, F.F.; Macedo, L.F.; Mendes, M.N.; Azevedo, I.M.; Medeiros, A.C. Protective effect of simvastatin in the cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. *Acta Cir. Bras.* **2010**, *25*, 43–46. [CrossRef]
56. Hu, V.Y.; Malley, S.; Dattilio, A.; Folsom, J.B.; Zvara, P.; Vizzard, M.A. COX-2 and prostanoid expression in micturition pathways after cyclophosphamide-induced cystitis in the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2003**, *284*, R574–R585. [CrossRef]

57. Korkmaz, A.; Topal, T.; Oter, S. Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. *Cell Biol. Toxicol.* **2007**, *23*, 303–312. [CrossRef]
58. Virag, L.; Szabo, E.; Gergely, P.; Szabo, C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: Mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol. Lett.* **2003**, *140–141*, 113–124. [CrossRef]
59. Abo-Salem, O.M. Uroprotective effect of pentoxifylline in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2013**, *27*, 343–350. [CrossRef]
60. Dornelas-Filho, A.F.; Pereira, V.B.M.; Wong, D.V.T.; Nobre, L.M.S.; Melo, A.T.; Silva, C.M.S.; Wanderley, C.W.S.; Nour, M.L.; Araujo, L.; Silva, R.O.; et al. Neutrophils contribute to the pathogenesis of hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide. *Int. Immunopharmacol.* **2018**, *62*, 96–108. [CrossRef]
61. Kohler, M.; Michel, C.; Zimmermann, A. Histological changes after fractionated whole or partial irradiation of the rabbit urinary bladder. *Acta Oncol.* **1995**, *34*, 199–204. [CrossRef] [PubMed]
62. Jaal, J.; Dorr, W. Radiation induced inflammatory changes in the mouse bladder: The role of cyclooxygenase-2. *J. Urol.* **2006**, *175*, 1529–1533. [CrossRef]
63. Tamaki, M.; Saito, R.; Ogawa, O.; Yoshimura, N.; Ueda, T. Possible mechanisms inducing glomerulations in interstitial cystitis: Relationship between endoscopic findings and expression of angiogenic growth factors. *J. Urol.* **2004**, *172*, 945–948. [CrossRef] [PubMed]
64. Kiuchi, H.; Tsujimura, A.; Takao, T.; Yamamoto, K.; Nakayama, J.; Miyagawa, Y.; Nonomura, N.; Takeyama, M.; Okuyama, A. Increased vascular endothelial growth factor expression in patients with bladder pain syndrome/interstitial cystitis: Its association with pain severity and glomerulations. *BJU Int.* **2009**, *104*, 826–831. [CrossRef] [PubMed]
65. Lee, J.D.; Lee, M.H. Increased expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor associated with glomerulation formation in patients with interstitial cystitis. *Urology* **2011**, *78*, 971.e11–971.e15. [CrossRef]
66. Corcoran, A.T.; Yoshimura, N.; Tyagi, V.; Jacobs, B.; Leng, W.; Tyagi, P. Mapping the cytokine profile of painful bladder syndrome/interstitial cystitis in human bladder and urine specimens. *World J. Urol.* **2013**, *31*, 241–246. [CrossRef]
67. Sherif, I.O.; Nakshabandi, Z.M.; Mohamed, M.A.; Sarhan, O.M. Uroprotective effect of oleuropein in a rat model of hemorrhagic cystitis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2016**, *74*, 12–17. [CrossRef]
68. Auge, C.; Chene, G.; Dubourdeau, M.; Desoubzdanne, D.; Corman, B.; Palea, S.; Lluel, P.; Vergnolle, N.; Coelho, A.M. Relevance of the cyclophosphamide-induced cystitis model for pharmacological studies targeting inflammation and pain of the bladder. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *707*, 32–40. [CrossRef]
69. Soler, R.; Vianello, A.; Fullhase, C.; Wang, Z.; Atala, A.; Soker, S.; Yoo, J.J.; Koudywilliam, J. Vascular therapy for radiation cystitis. *Neurourol. Urodyn.* **2011**, *30*, 428–434. [CrossRef]
70. Jaal, J.; Dorr, W. Radiation induced late damage to the barrier function of small blood vessels in mouse bladder. *J. Urol.* **2006**, *176*, 2696–2700. [CrossRef]
71. Zwaans, B.M.M.; Wegner, K.A.; Bartolone, S.N.; Vezina, C.M.; Chancellor, M.B.; Lamb, L.E. Radiation cystitis modeling: A comparative study of bladder fibrosis radio-sensitivity in C57BL/6, C3H, and BALB/c mice. *Physiol. Rep.* **2020**, *8*, e14377. [CrossRef] [PubMed]
72. Tyagi, P.; Moon, C.H.; Janicki, J.; Kaufman, J.; Chancellor, M.; Yoshimura, N.; Chermansky, C. Recent advances in imaging and understanding interstitial cystitis. *F1000Research* **2018**, *7*, 1771. [CrossRef] [PubMed]
73. Shen, C.H.; Wang, S.C.; Wang, S.T.; Lin, S.M.; Wu, J.D.; Lin, C.T.; Liu, Y.W. Evaluation of urinary bladder fibrogenesis in a mouse model of long-term ketamine injection. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *14*, 1880–1890. [CrossRef] [PubMed]
74. Choi, D.; Han, J.Y.; Shin, J.H.; Ryu, C.M.; Yu, H.Y.; Kim, A.; Lee, S.; Lim, J.; Shin, D.M.; Choo, M.S. Downregulation of WNT11 is associated with bladder tissue fibrosis in patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome without Hunner lesion. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9782. [CrossRef]
75. Tyagi, P.; Tyagi, V.; Yoshimura, N.; Witteemer, E.; Barclay, D.; Loughran, P.A.; Zamora, R.; Vodovotz, Y. Gender-based reciprocal expression of transforming growth factor-beta1 and the inducible nitric oxide synthase in a rat model of cyclophosphamide-induced cystitis. *J. Inflamm.* **2009**, *6*, 23. [CrossRef]
76. Bouchelouche, K.; Nordling, J. Recent developments in the management of interstitial cystitis. *Curr. Opin. Urol.* **2003**, *13*, 309–313. [CrossRef]
77. Hanno, P.M.; Sant, G.R. Clinical highlights of the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases/Interstitial Cystitis Association scientific conference on interstitial cystitis. *Urology* **2001**, *57*, 2–6. [CrossRef]
78. Persu, C.; Cauni, V.; Gutue, S.; Blaj, I.; Jinga, V.; Geavlete, P. From interstitial cystitis to chronic pelvic pain. *J. Med. Life* **2010**, *3*, 167–174. [PubMed]
79. Kraft, M.; Oussoren, Y.; Stewart, F.A.; Dorr, W.; Schultz-Hector, S. Radiation-induced changes in transforming growth factor beta and collagen expression in the murine bladder wall and its correlation with bladder function. *Radiat. Res.* **1996**, *146*, 619–627. [CrossRef]
80. Ikeda, Y.; Zabbarova, I.V.; Birder, L.A.; Wipf, P.; Getchell, S.E.; Tyagi, P.; Fry, C.H.; Drake, M.J.; Kanai, A.J. Relaxin-2 therapy reverses radiation-induced fibrosis and restores bladder function in mice. *Neurourol. Urodyn.* **2018**, *37*, 2441–2451. [CrossRef]
81. Stewart, F.A.; Michael, B.D.; Denekamp, J. Late radiation damage in the mouse bladder as measured by increased urination frequency. *Radiat. Res.* **1978**, *75*, 649–659. [CrossRef] [PubMed]

82. Stewart, F.A.; Randhawa, V.S.; Michael, B.D. Multifraction irradiation of mouse bladders. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **1984**, *2*, 131–140. [CrossRef]
83. Stewart, F.A. The proliferative and functional response of mouse bladder to treatment with radiation and cyclophosphamide. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **1985**, *4*, 353–362. [CrossRef]
84. Stewart, F.A.; Randhawa, V.S.; Michael, B.D.; Denekamp, J. Repair during fractionated irradiation of the mouse bladder. *Br. J. Radiol.* **1981**, *54*, 799–804. [CrossRef] [PubMed]
85. Smit, S.G.; Heyns, C.F. Management of radiation cystitis. *Nat. Rev. Urol.* **2010**, *7*, 206–214. [CrossRef]
86. Chiang, G.; Patra, P.; Letourneau, R.; Jeudy, S.; Boucher, W.; Green, M.; Sant, G.R.; Theoharides, T.C. Pentosanpolysulfate inhibits mast cell histamine secretion and intracellular calcium ion levels: An alternative explanation of its beneficial effect in interstitial cystitis. *J. Urol.* **2000**, *164*, 2119–2125. [CrossRef]
87. Almeida, F.G.; Batezini, N.; Simoes, R.S.; Bernardo, W.M. Interstitial cystitis-intravesical treatment. *Rev. Assoc. Med. Bras. (1992)* **2019**, *65*, 535–540. [CrossRef]
88. Pascoe, C.; Duncan, C.; Lamb, B.W.; Davis, N.F.; Lynch, T.H.; Murphy, D.G.; Lawrentschuk, N. Current management of radiation cystitis: A review and practical guide to clinical management. *BJU Int.* **2019**, *123*, 585–594. [CrossRef]
89. Teichman, J.M. The role of pentosan polysulfate in treatment approaches for interstitial cystitis. *Rev. Urol.* **2002**, *4* (Suppl. S1), S21–S27.
90. Parsons, C.L.; Lilly, J.D.; Stein, P. Epithelial dysfunction in nonbacterial cystitis (interstitial cystitis). *J. Urol.* **1991**, *145*, 732–735. [CrossRef]
91. Colemeadow, J.; Sahai, A.; Malde, S. Clinical Management of Bladder Pain Syndrome/Interstitial Cystitis: A Review on Current Recommendations and Emerging Treatment Options. *Res. Rep. Urol.* **2020**, *12*, 331–343. [CrossRef] [PubMed]
92. Colaco, M.; Evans, R. Current guidelines in the management of interstitial cystitis. *Transl. Androl. Urol.* **2015**, *4*, 677–683. [CrossRef] [PubMed]
93. Ribeiro, R.A.; Freitas, H.C.; Campos, M.C.; Santos, C.C.; Figueiredo, F.C.; Brito, G.A.; Cunha, F.Q. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. *J. Urol.* **2002**, *167*, 2229–2234. [CrossRef]
94. Nascimento, J.C.R.; Campelo, M.W.S.; Aragao, I.A.; de Moura, J.F.B.; Silva, L.F.G.; Oria, R.B. Treatment of Severe Refractory Hematuria due to Radiation-Induced Hemorrhagic Cystitis with Dexamethasone. *Case Rep. Med.* **2017**, *2017*, 1560363. [CrossRef] [PubMed]
95. Shoskes, D.A.; Radzinski, C.A.; Struthers, N.W.; Honey, R.J. Aluminum toxicity and death following intravesical alum irrigation in a patient with renal impairment. *J. Urol.* **1992**, *147*, 697–699. [CrossRef]
96. Kavoussi, L.R.; Gelstein, L.D.; Andriole, G.L. Encephalopathy and an elevated serum aluminum level in a patient receiving intravesical alum irrigation for severe urinary hemorrhage. *J. Urol.* **1986**, *136*, 665–667. [CrossRef]
97. Dautruche, A.; Delouya, G. A contemporary review about the management of radiation-induced hemorrhagic cystitis. *Curr. Opin. Supportive Palliat. Care* **2018**, *12*, 344–350. [CrossRef]
98. Cardinal, J.; Slade, A.; McFarland, M.; Keihani, S.; Hotaling, J.N.; Myers, J.B. Scoping Review and Meta-analysis of Hyperbaric Oxygen Therapy for Radiation-Induced Hemorrhagic Cystitis. *Curr. Urol. Rep.* **2018**, *19*, 38. [CrossRef]
99. Villeirs, L.; Tailly, T.; Ost, P.; Waterloos, M.; Decaestecker, K.; Fonteyne, V.; Van Praet, C.; Lumen, N. Hyperbaric oxygen therapy for radiation cystitis after pelvic radiotherapy: Systematic review of the recent literature. *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.* **2020**, *27*, 98–107. [CrossRef]
100. Oscarsson, N.; Muller, B.; Rosen, A.; Lodding, P.; Molne, J.; Giglio, D.; Hjelle, K.M.; Vaagbo, G.; Hyldegaard, O.; Vangedal, M.; et al. Radiation-induced cystitis treated with hyperbaric oxygen therapy (RICH-ART): A randomised, controlled, phase 2–3 trial. *Lancet Oncol.* **2019**, *20*, 1602–1614. [CrossRef]
101. Ryu, C.M.; Shin, J.H.; Yu, H.Y.; Ju, H.; Kim, S.; Lim, J.; Heo, J.; Lee, S.; Shin, D.M.; Choo, M.S. N-acetylcysteine prevents bladder tissue fibrosis in a lipopolysaccharide-induced cystitis rat model. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8134. [CrossRef] [PubMed]
102. Rajasekaran, M.; Locke, K.W.; Parsons, C.L. MN-001, a novel oral anti-inflammatory agent, suppresses bladder hyperactivity in a rat model. *BJU Int.* **2006**, *98*, 430–434. [CrossRef] [PubMed]
103. Rawls, W.F.; Cox, L.; Rovner, E.S. Dimethyl sulfoxide (DMSO) as intravesical therapy for interstitial cystitis/bladder pain syndrome: A review. *Neurourol. Urodyn.* **2017**, *36*, 1677–1684. [CrossRef] [PubMed]
104. Nazif, O.; Teichman, J.M.; Gebhart, G.F. Neural upregulation in interstitial cystitis. *Urology* **2007**, *69*, 24–33. [CrossRef]
105. Sun, Y.; Chai, T.C. Effects of dimethyl sulphoxide and heparin on stretch-activated ATP release by bladder urothelial cells from patients with interstitial cystitis. *BJU Int.* **2002**, *90*, 381–385. [CrossRef]
106. Generali, J.A.; Cada, D.J. Amitriptyline: Interstitial cystitis (painful bladder syndrome). *Hosp. Pharm.* **2014**, *49*, 809–810. [CrossRef]
107. Ottem, D.P.; Teichman, J.M. What is the value of cystoscopy with hydrodistension for interstitial cystitis? *Urology* **2005**, *66*, 494–499. [CrossRef]
108. Olson, L.E.; Dyer, J.E.; Haq, A.; Ockrim, J.; Greenwell, T.J. A systematic review of the literature on cystodistension in bladder pain syndrome. *Int. Urogynecol. J.* **2018**, *29*, 251–257. [CrossRef]
109. Aronsson-Kurttila, W.; Baygan, A.; Moretti, G.; Remberger, M.; Khoein, B.; Moll, G.; Sadeghi, B.; Ringden, O. Placenta-Derived Decidua Stromal Cells for Hemorrhagic Cystitis after Stem Cell Transplantation. *Acta Haematol.* **2018**, *139*, 106–114. [CrossRef]

110. Ringden, O.; Uzunel, M.; Sundberg, B.; Lonnies, L.; Nava, S.; Gustafsson, J.; Henningsohn, L.; Le Blanc, K. Tissue repair using allogeneic mesenchymal stem cells for hemorrhagic cystitis, pneumomediastinum and perforated colon. *Leukemia* **2007**, *21*, 2271–2276. [CrossRef]
111. Voswinkel, J.; Francois, S.; Simon, J.M.; Benderitter, M.; Gorin, N.C.; Mohty, M.; Fouillard, L.; Chapel, A. Use of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic inflammatory fistulizing and fibrotic diseases: A comprehensive review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2013**, *45*, 180–192. [CrossRef] [PubMed]

Traitement par thérapie cellulaire de la cystite radique chez le rat

Résumé :

La cystite radique chronique (CRC) est une pathologie consécutive à l'irradiation pelvienne caractérisée par une inflammation chronique pouvant évoluer vers une fibrose avec des symptômes de douleur et de saignements. Nos études antérieures sur la cystite radique ont montré que les cellules souches mésenchymateuses (CSM) limitent les effets chroniques de l'irradiation. L'objectif de cette thèse a été de mettre en place un modèle de CRC chez le rat puis d'évaluer l'efficacité des CSM et leurs mécanismes d'action. La CRC a été induite par une irradiation localisée en dose unique de la vessie entière avec deux faisceaux, guidée par la tomographie. Une gamme de doses de 20 à 80 Gy avec un suivi de 3 à 12 mois après l'irradiation a permis de caractériser l'effet dose et la cinétique de la CRC. Nous avons observé que l'intensité et la fréquence des hématuries sont proportionnelles à la dose d'irradiation avec un seuil à 40 Gy. Pour le traitement, la dose de 40 Gy a été retenue. Afin de potentialiser l'effet des CSM ont été injectées par voie intraveineuse avant la phase chronique. Trois injections de 5 millions de CSM ont été administrées toutes les deux semaines. Un suivi physiologique, histologique et moléculaire a été réalisé pendant 12 mois après l'irradiation. Les CSM ont permis de diminuer les lésions vasculaires ainsi que les atteintes de l'urothélium. Ces résultats sont une preuve de concept de l'efficacité des CSM. Cette première étude demandera à être approfondie au niveau des mécanismes, cependant il s'agit ici d'un réel espoir pour l'ensemble des patients souffrants de la cystite radique chronique résistant aux traitements conventionnels.

Mots clés : [Irradiation, Cystite radique chronique, Cellules souches mésenchymateuses, Thérapie cellulaire]

Cell therapy treatment of radiation cystitis in rats

Abstract

Chronic radiation cystitis (CRC) is a pathology following pelvic irradiation characterized by chronic inflammation that can progress to fibrosis with symptoms of pain and bleeding. Our previous studies on radiation cystitis have shown that mesenchymal stem cells (MSC) limit the chronic effects of radiation. The objective of this thesis was to set up a rat model of CRC and to evaluate the efficacy of MSCs and their mechanisms of action. CRC was induced by a single dose localized irradiation of the whole bladder with two beams, guided by tomography. A dose range of 20 to 80 Gy with a follow-up of 3 to 12 months after irradiation allowed us to characterize the dose effect and kinetics of radiation cystitis. We observed that the intensity and frequency of hematuria are proportional to the irradiation dose with a threshold at 40 Gy. For the treatment, the dose of 40 Gy was retained. To potentiate the effect of treatment, the MSC were injected intravenously during the phase prior to the establishment of the chronic phase. Three injections of 5 million of MSC were administered every two weeks. Physiological, histological, and molecular follow-up was performed for 12 months after irradiation. MSCs delayed the onset of hematuria, decreased vascular damage, and reduced damage to the bladder epithelium. This result is a proof of concept of the effectiveness of MSCs. This first study will require further study of the mechanisms, but it is a real hope for all the patients suffering from chronic radiation cystitis resistant to conventional treatments.

Keywords: [Irradiation, Chronic radiation cystitis, Mesenchymal stem cells, Cell therapy]