

IRSN

INSTITUT
DE RADIOPROTECTION
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

Faire avancer la sûreté nucléaire

Lésions pulmonaires après irradiation stéréotaxique : modélisation préclinique et aspects radiopathologiques

Annaïg BERTHO

12^{ème} Congrès National de
Radioprotection
19 Juin 2019
La Rochelle



MEMBRE DE

ETSON

EUROPEAN
TECHNICAL SAFETY
ORGANISATIONS
NETWORK

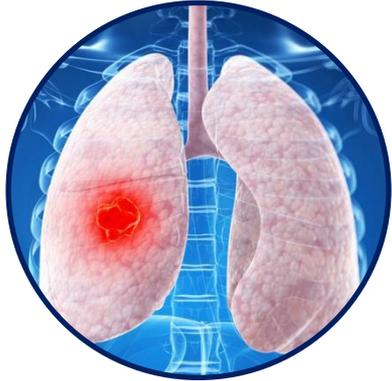
Ecole Doctorale 394 : Physiologie,
Physiopathologie et Thérapeutique
Sorbonne Université



Directrice de thèse :
Dr. Agnès FRANCOIS

Laboratoire de Radiobiologie des
Expositions Médicales (LRMed)
IRSN - Fontenay-aux-Roses





Cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules

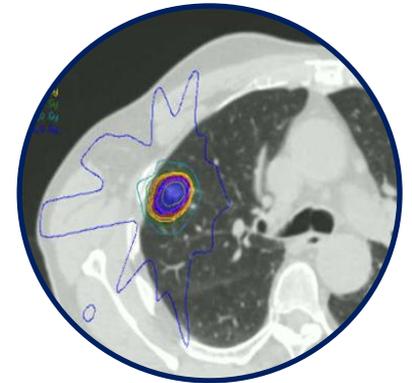
Stade T1 (sans invasion des ganglions, ni métastases), volume tumoral inférieur à 7cm

Patients inopérables ou refusant la chirurgie

Bonne alternative thérapeutique pour les patients inopérables

Bon contrôle tumoral (80 à 95%, à 2 ou 3 ans¹)

Réduction du volume de tissus sains irradiés



Pneumopathie radique aiguë (effets précoces, jusqu'à 28% des patients)

Fibrose pulmonaire radio-induite (effets tardifs, 3 à 12% des patients)¹

Quand la clinique précède la radiobiologie



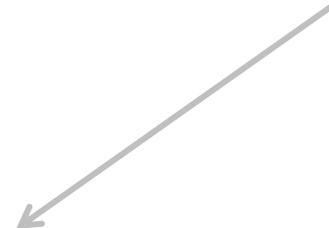
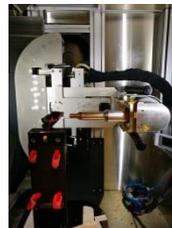
Image : cyberknife.com

Radiothérapie stéréotaxique
pratique clinique en routine
de plus en plus utilisée

Manque de données
radiobiologiques aux fortes doses par
fraction

&

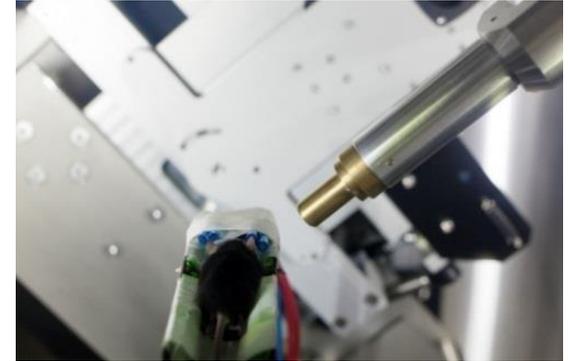
Extrêmement peu de données
précliniques portant sur l'irradiation
stéréotaxique
car verrou technologique



Développement d'un modèle préclinique d'irradiation stéréotaxique
unique au monde

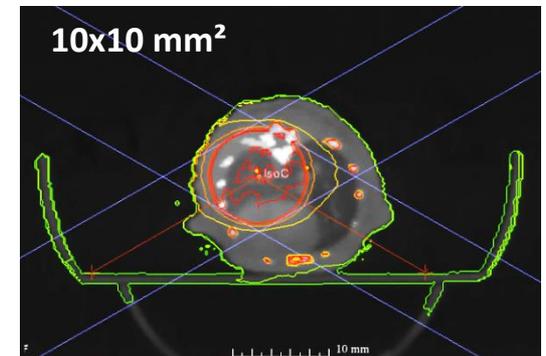
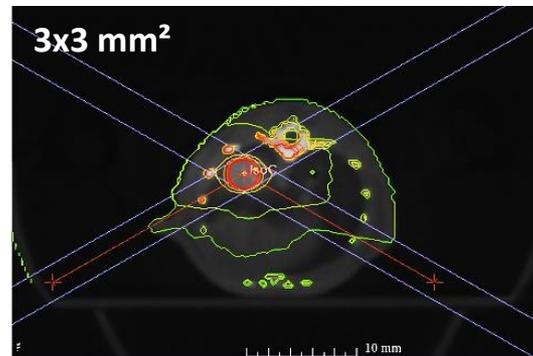
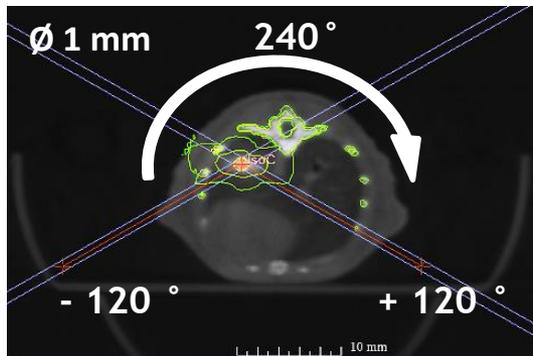


Small Animal Radiation Research Platform (SARRP)



Images: IRSN

- Système de micro-irradiation du petit animal délivrant des **mini-faisceaux**
- Irradiation faisceau unique, multifaisceaux, ou arc-thérapie
- Guidé par **l'image scanner**
- Associé à un logiciel de **plan de traitement (TPS : Treatment Planning System)**
- 4 tailles de collimateurs disponibles : 10x10 mm², 7x7 mm², 3x3 mm² et Ø 1 mm
- Le TPS associé aux scans et courbes isodose : doses moyennes aux organes



Images: Dos Santos M, IRSN

Etude des conséquences radiobiologiques et radiopathologiques de l'irradiation stéréotaxique pulmonaire

Modélisation préclinique de l'irradiation stéréotaxique *In vivo* (Irradiateur : SARRP)

Ø1 mm , 3x3 mm² , 7x7 mm², 10x10 mm²
90 Gy
1 mois, 3 mois, 6 mois, 12 mois

3x3 mm²
20 Gy, 40 Gy, 60 Gy, 80 Gy, 100 Gy, 120 Gy
1 mois, 6 mois

3x3 mm²
3x20 Gy, 3x28 Gy, 3x40 Gy, 3x50 Gy
6 mois

Effet du
volume

Effet de la
dose

Effet du
fractionnement

Analyse
anatomopathologique

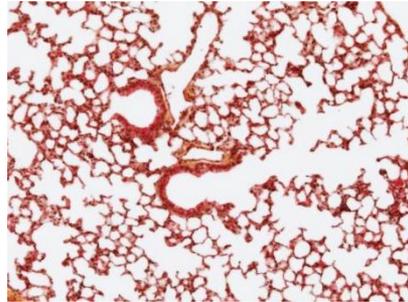
Expression génique

Dosages plasmatiques

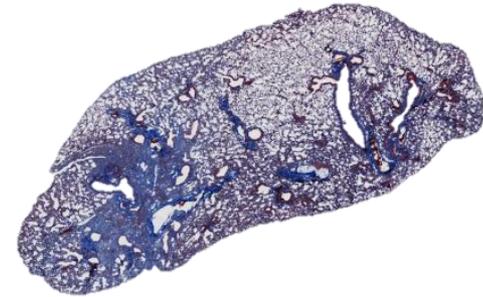
Caractéristiques de la réaction de cicatrisation post-irradiation :



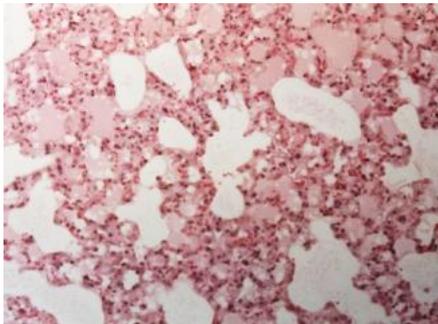
Épaississement
des
septa alvéolaires



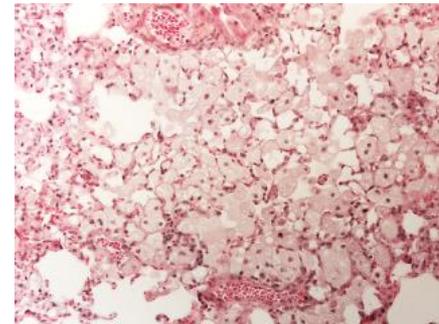
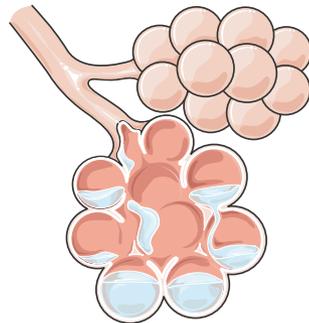
Contrôle



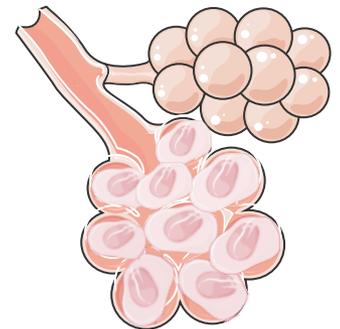
Fibrose pulmonaire
radio-induite



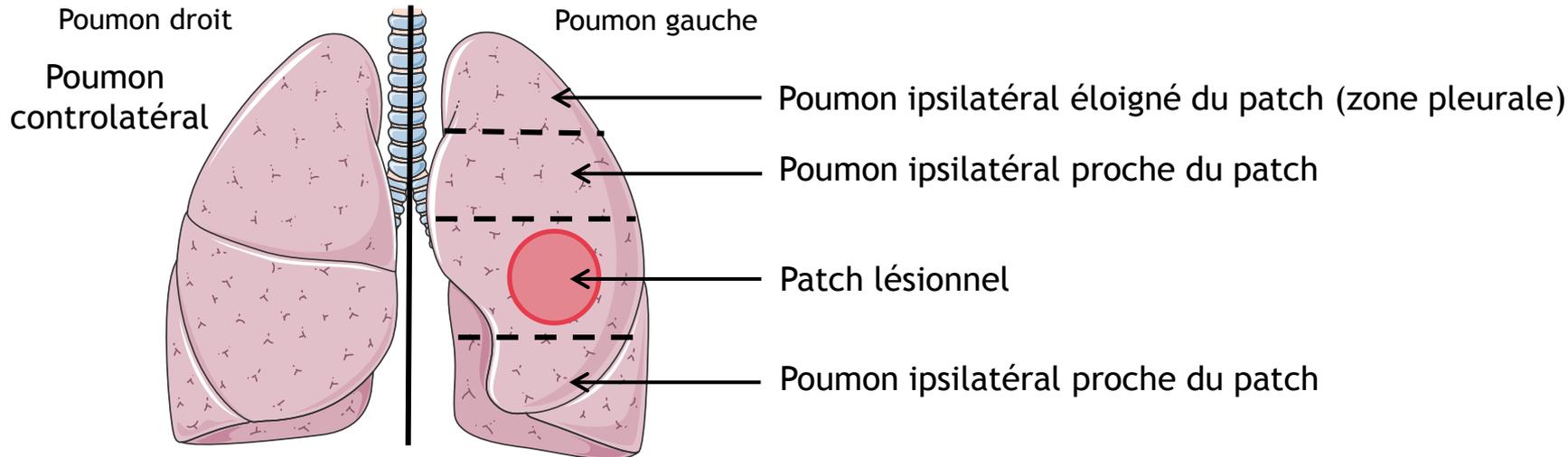
Œdème alvéolaire



Foyers macrophagiques



Zones de prélèvement et de mesures



Mesures effectuées

Analyses anatomopathologiques :

- Mesure des septa alvéolaires
- Mesure de la bronchiolite oblitérante
- Comptage des cellules Club dans le patch
- Comptage des Pneumocytes II
- Caractérisation des macrophages (Stage M2)

Analyse de l'expression génique :

- CCSP** : Utéroglobine, Cellules Club
- CXCL2** : chimiokines sécrétée par les macrophages, chimioattractant des neutrophiles
- Cyp2F2** : Cytochrome P450, Cellules Club
- EMR1** : Récepteur des macrophages
- ENG** : R α du TGF- β (fibrose), angiogénèse
- FOXJ1** : construction des cils, Cellules ciliées de l'épithélium respiratoire
- IL-1 et IL-6** : Cytokines proinflammatoires exprimées par les différents types cellulaires pulmonaires
- MPO** : enzyme exprimée par les neutrophiles
- SftPC** : Protéine C du surfactant, Pneumocyte II
- TNF**: Cytokine pro-inflammatoire

Etude de l'effet du volume d'irradiation

Bronchiolite oblitérante : marqueur de l'atteinte bronchiolaire, conditionne la survie des animaux

Survie des animaux :

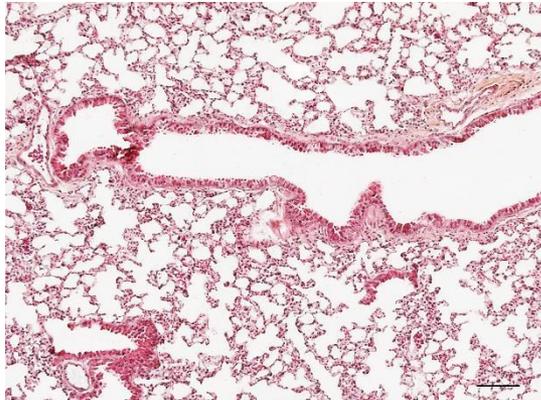
1 mm : survie à long terme

3 mm : survie à long terme

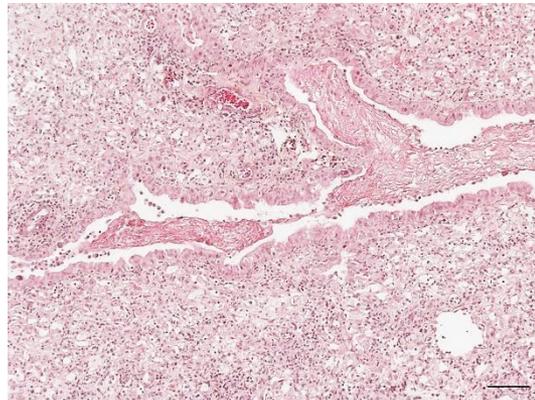
7 mm : euthanasie des animaux à 2 mois post-irradiation

10 mm : euthanasie des animaux à 21 jours post-irradiation

Contrôle

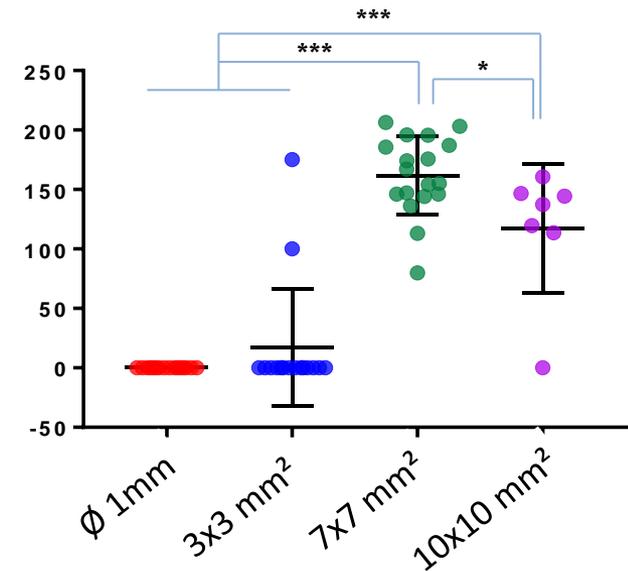


7x7 mm²

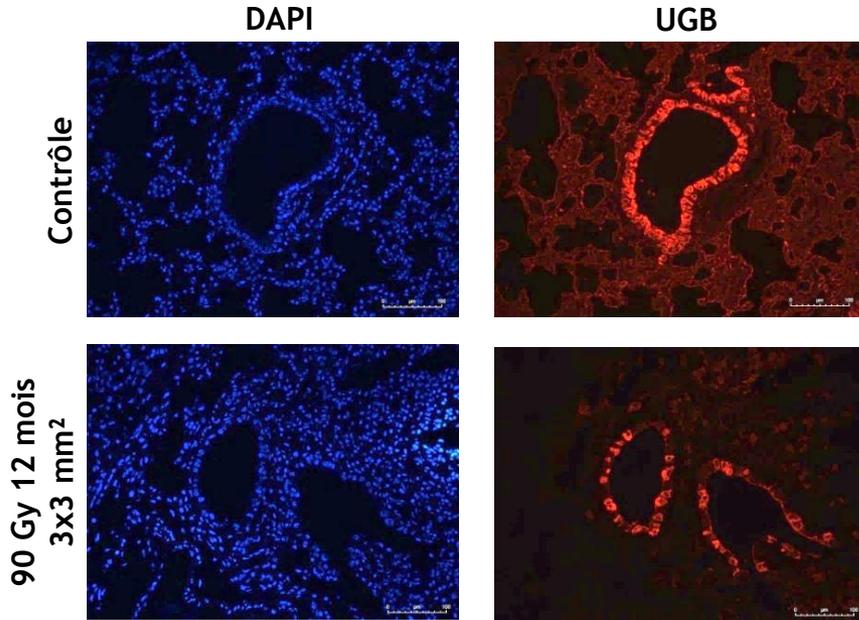


Coloration HES, 1 mois post-irradiation à 90 Gy, au collimateur 7x7 mm²:
Bronchiolite oblitérante

Diamètre des bronchioles concernées par la bronchiolite oblitérante
Tous les temps

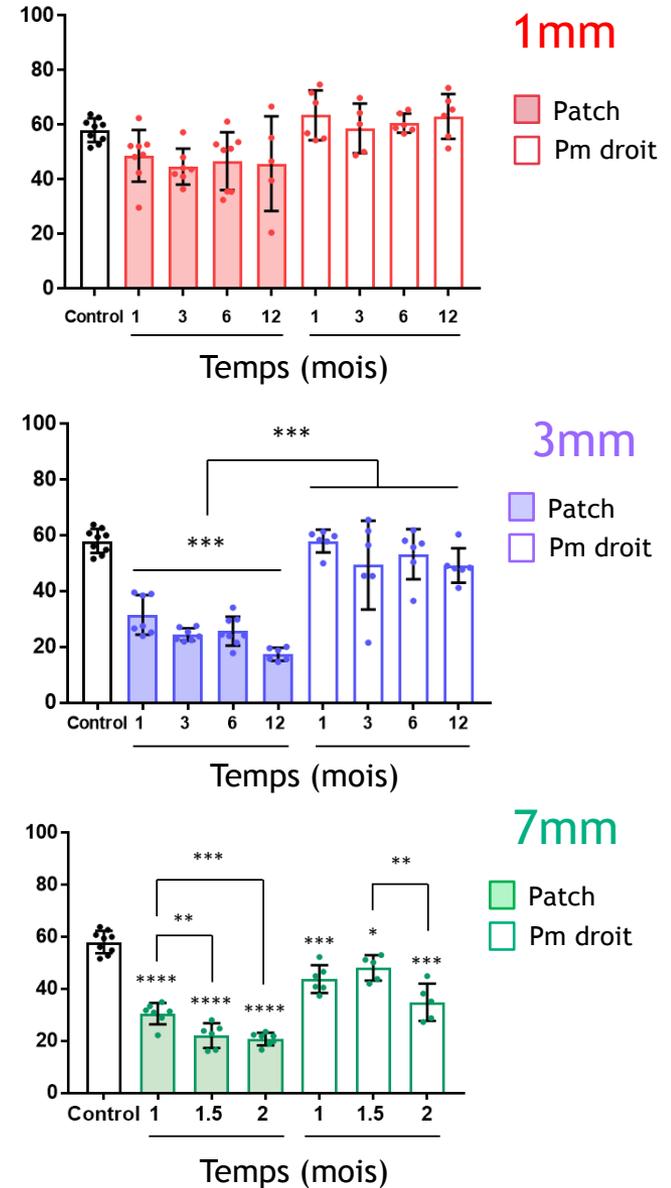


Cellules Club : marqueur de l'atteinte bronchiolaire



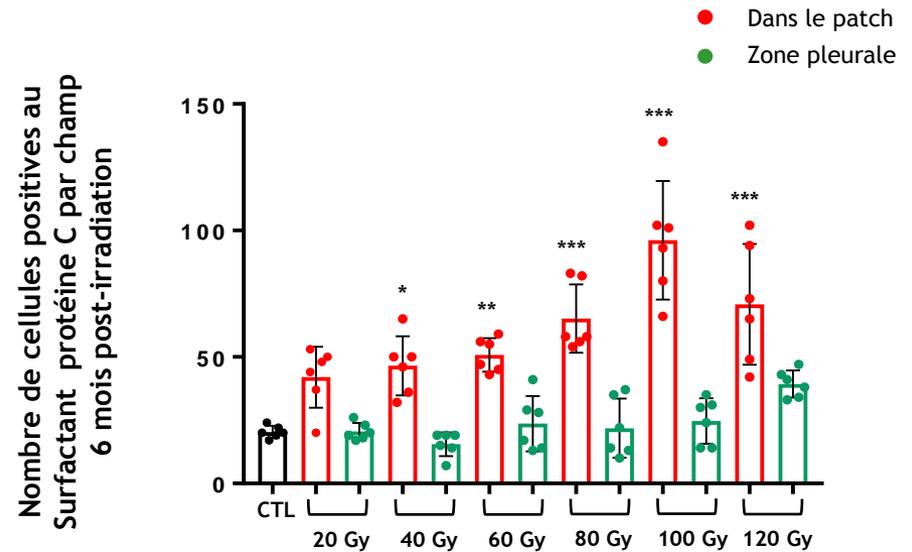
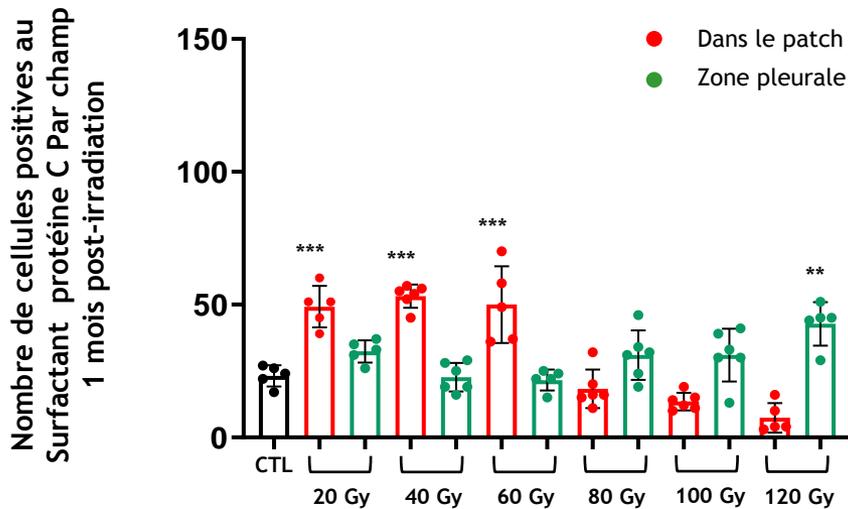
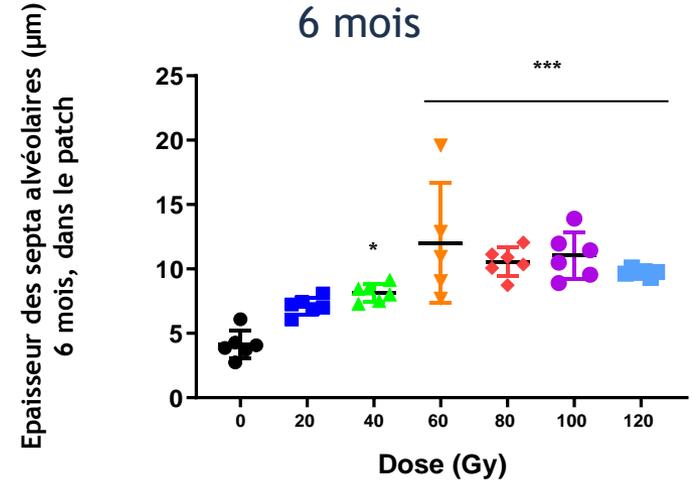
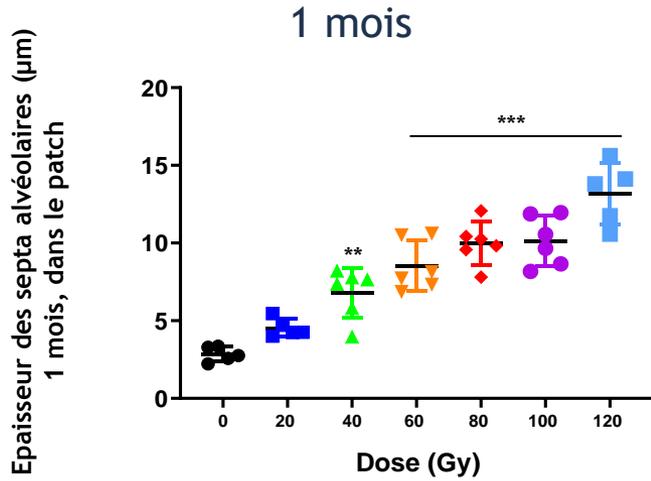
UGB : Utéroglobine, marqueur des cellules Club
DAPI : marqueur des noyaux des cellules

Pourcentage de cellules UGB+

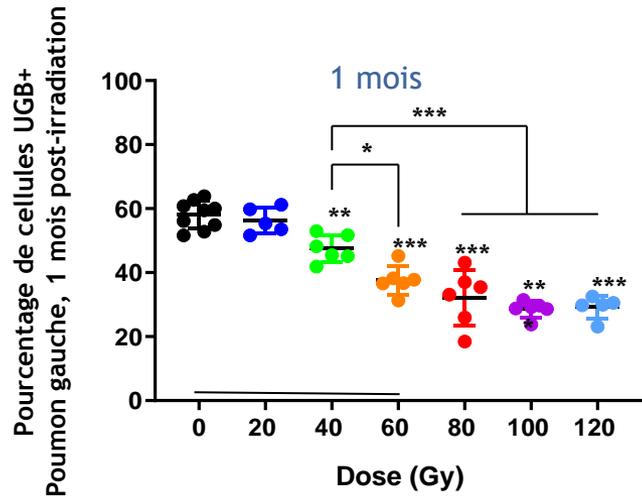


Etude de l'effet de la dose Collimateur 3x3mm²

Mesure de l'épaississement des septa alvéolaires et comptage des Pneumocytes II

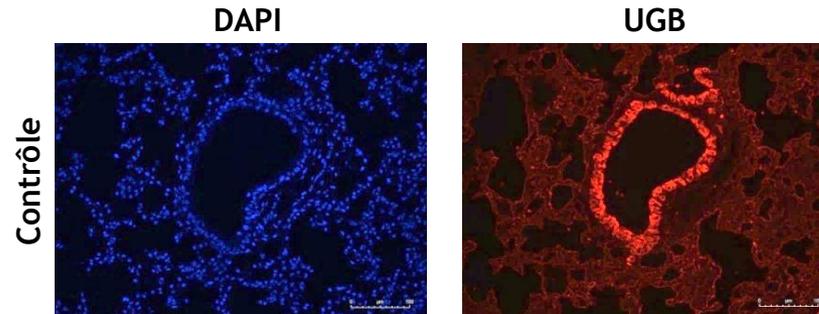
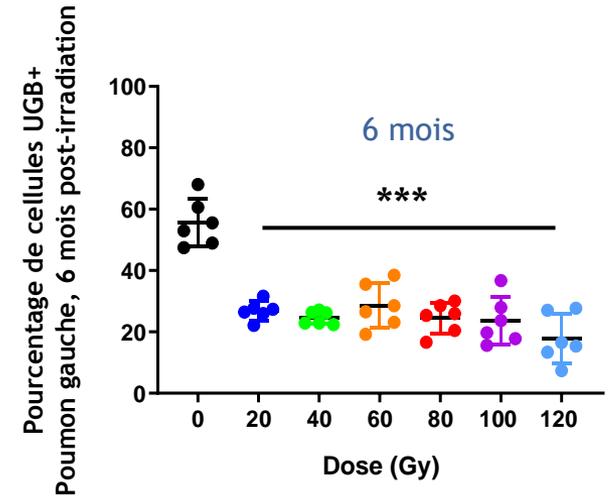


Cellules Club : marqueurs de l'atteinte bronchiolaire



Dans le patch

A 1 mois post-irradiation, Le nombre de cellules Club diminue à partir de 40 Gy, avec un effet dose jusqu'à 60 Gy, au-delà, « plateau »



UGB : Utéroglobine, marqueur des cellules Club

DAPI : marqueur des noyaux des cellules



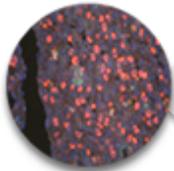
Le volume d'irradiation influe la survie des souris. La survie des souris est compromise par l'apparition de la bronchiolite oblitérante

- **3x3 mm² semble être une limite**



La survie est influencée par la façon de délivrer la dose. Cho et al : irradiation à 5x5mm² en faisceau unique, décès des animaux en 2 à 3 semaines

- **Notre modèle d'arc-thérapie permet une meilleure survie**



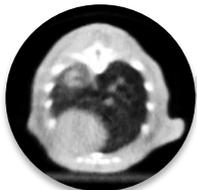
Peu de conséquences sont observées après irradiation au 1 mm. Avec les collimateurs 7x7 mm² et 10x10 mm², le volume irradié est trop important pour pouvoir étudier les effets tardifs

- **Les volumes restreints sont bien tolérés grâce à l'organisation en unités fonctionnelles distinctes du poumon**



Le collimateur 3x3 mm² permet l'étude des effets précoces et tardifs

- **Permet une forte escalade de dose**
- **Fibrose pulmonaire radio-induite à partir de 40 Gy**
- **Décalage dans le temps de la mise en place de la cicatrisation aux très fortes doses**
- **3,5% du volume pulmonaire d'une souris, ce qui correspond aux recommandations cliniques**



Globalement, les répercussions sur le poumon droit sont d'autant plus importantes que la dose est forte, ou le volume important

- **Lié probablement au dépôt de la dose en dehors du volume cible et à la présence du patch (diffusion de la réponse inflammatoire)**

Etude descriptive de l'influence des différents paramètres de l'irradiation

Impact du volume d'irradiation

Impact de la dose totale

Impact du fractionnement

Temps d'étude



Structurer les choix de collimateur, de dose, de fractionnement et de temps pour les études à venir sur l'irradiation stéréotaxique pulmonaire



Etude des macrophages

Dommages vasculaires

Modèles avec tumeurs

Immunité anti-tumorale

Nouvelles cibles thérapeutiques

Merci de votre attention

Remerciements

Irradiations

Morgane Dos Santos
(SARRP)
Yoann Ristic
(ALPHEE)

Images

Morgane Dos Santos

Expérimentation animale

Romain Granger,
Amandine Sache
Et toute l'équipe
du GSEA

LRMed

Agnès François
Fabien Milliat
Olivier Guipaud
Vincent Paget
Noëlle Mathieu
Christine Linard
Alain Chapel
Alexandra Semont
Georges Tarlet

Valérie Buard
Christelle Demarquay
Claire Squiban
Mariam Ben Kacem
Frédéric Soysouvanh
Alexia Lapière
Ségolène Ladaigue
Clément Brossard
Sarah Braga-Cohen



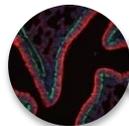
Survie des souris : $\emptyset 1\text{mm}$ et $3 \times 3 \text{ mm}^2$: long terme, $7 \times 7 \text{ mm}^2$: euthanasie à 2 mois, $10 \times 10 \text{ mm}^2$: euthanasie à 21 jours
 $5 \times 5 \text{ mm}^2$ (Cho *et al.*) décès en 2 à 3 semaines. Faisceau unique vs arc-thérapie : **meilleure survie avec l'arc-thérapie**
 $3 \times 3 \text{ mm}^2$ semble être une limite
 $3 \times 3 \text{ mm}^2$ = correspond à **3,5% du volume pulmonaire** de la souris (recommandations cliniques)



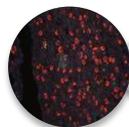
Lésions de même nature quel que soit le volume d'irradiation: œdème alvéolaire très important en dehors du volume cible & foyers macrophagiques très abondants



Augmentation de l'épaisseur de la paroi alvéolaire : mécanisme de cicatrisation
Répercussion importante en dehors du patch à cause de l'inflammation causée par le patch mais également par la dose déposée en dehors du volume cible



Les cellules Club : marqueur de l'atteinte bronchiolique et alvéolaire
Effet seuil ou effet dose ?



Surfactant Protéine C : Protéine membranaire des pneumocytes de type 2, permet de suivre la population des pneumocytes 2 (prolifération/perde des cellules). Essentiel à l'homéostasie pulmonaire.
En thorax entier : augmentation des cellules SPC+ jusqu'à 5 mois post-irradiation (irradiation fractionnée ou dose unique)

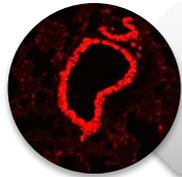
Conclusion



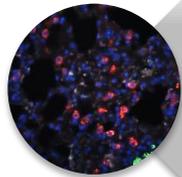
Apparition du patch à partir de 60 Gy et rétractation de celui-ci à 6 mois : tant qu'on reste à 3x3 mm², on peut augmenter la dose et avoir une réaction de cicatrisation.



L'épaississement des parois alvéolaires est un bon indicateur de la réaction de cicatrisation et permet de voir l'effet de la dose déposée en dehors du volume cible.



Dose-dépendance de la perte des cellules Club jusqu'à 60 Gy



Prolifération des pneumocytes 2 pour réparation des alvéoles dès 1 mois post-irradiation pour les doses de 20, 40 et 60 Gy. Au-delà de 60 Gy la cicatrisation se met en place plus tardivement.



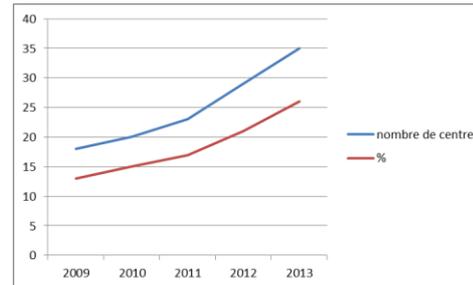
Infiltration des macrophages très importante à partir de 80 Gy; dans le patch.

Contexte : radiothérapie stéréotaxique

Aujourd'hui

Elargissement des indications
Tumeurs plus grosses

IR stéréotaxique
extracrânienne
(machines dédiées)



Nombre de patients en 2013

- Rachis: 570
- Bronchopulmonaire: 1336
- Hépatique: 390
- Autres: 1771

IR stéréotaxique
intracrânienne
(Acc linéaires)



Augmentation constante du nombre
de patients concernés
Bon contrôle tumoral

Radiochirurgie
(Gamma Knife)



Séquelles de ces traitements ?

Les techniques d'asservissement respiratoire

En respiration bloquée :

- Spiromètre et lunettes : le patient retient sa respiration au moment du tir



En respiration libre :

- Gating : Tir uniquement quand le volume cible est dans une position prédéterminée (capteurs)
- Tracking : Le tir suit les mouvements de la tumeur, ajustement de la fenêtre de tir en continu (CyberKnife, marqueurs internes radio-opaques, suivis par fluoroscopie et marqueurs externes suivis par infrarouges, bras articulé asservit aux mouvements des marqueurs)



Image : cyberknife.com

Contexte : les complications de la radiothérapie

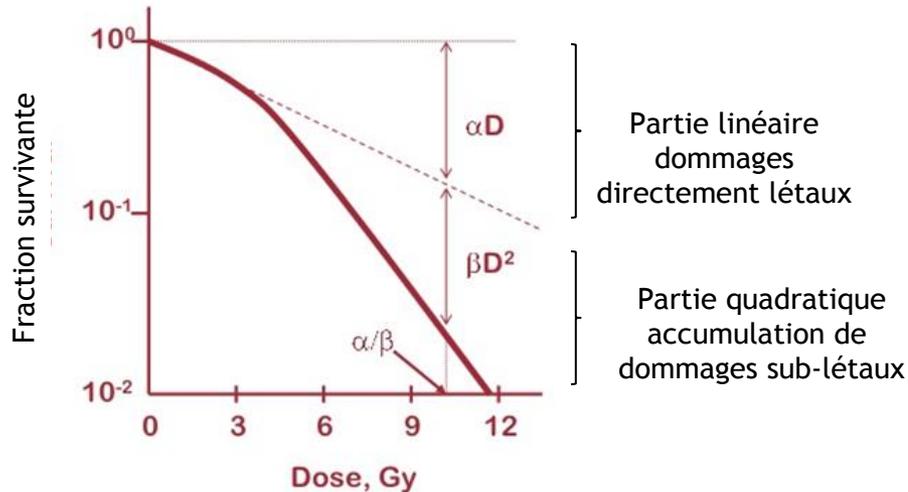
Radiothérapie de référence des cancers (radiothérapie normofractionnée)

2 Gy/jour; 5 jours/semaine; dose totale de 40 à 80 Gy

Besoin: prédire la réponse tumorale et celle des tissus sains lors d'un changement de fractionnement

→ α/β ratio et BED

Modélisation mathématique
de courbes de survie clonogénique *in vitro*



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

α/β ratio = facteur de sensibilité au fractionnement

- $\alpha/\beta > 10$ Gy: la partie linéaire prédomine, tumeurs et tissus à réponse précoce
- α/β faible (2 à 3 Gy): la partie quadratique prédomine, fort effet d'une augmentation de la dose par fraction, tissus à réponse tardive

Biological Effective Dose

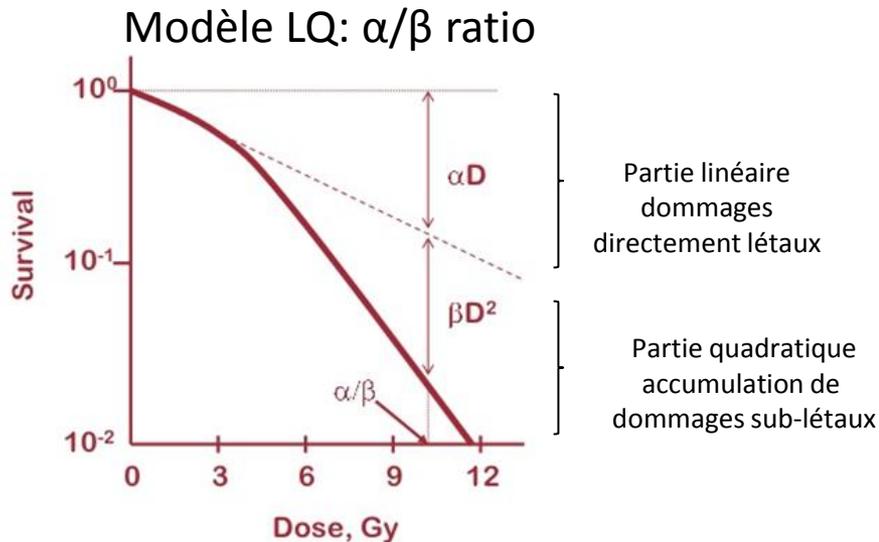
$$BED = nd \left(1 + \frac{d}{\alpha/\beta} \right)$$

n: nombre de fractions
d: dose par fraction

Ex1: 70 Gy en 35 fractions de 2 Gy
Rectum $\alpha/\beta = 3$
BED = $35 \times 2 \left(1 + \frac{2}{3} \right)$
BED = 116 Gy

Ex2: 70 Gy en 10 fractions de 7 Gy
Rectum $\alpha/\beta = 3$
BED = $10 \times 7 \left(1 + \frac{7}{3} \right)$
BED = 233 Gy

Projet in vitro: réponse cellulaire aux fortes doses par fraction



$$\text{Cell Kill} = E = n(\alpha d + \beta d^2)$$

n = nombre de fractions

d = dose par fraction

BED (Biological Effective Dose) = dose biologique conceptuelle

Combinaison d'une dose par fraction et d'une dose totale administrée à un tissu caractérisé par un ratio α/β particulier

simplification: Dose nécessaire pour obtenir un effet donné si la dose était délivrée avec de très faibles doses par fraction (on néglige le facteur beta).

$$\text{Cell Kill} = E = n(\alpha d + \beta d^2)$$

Si d tend vers 0



$$E = n\alpha d = D\alpha$$



$$\text{BED} = D = E/\alpha = \frac{n(\alpha d + \beta d^2)}{\alpha}$$

$$\text{BED} = nd \left(1 + \frac{d}{\alpha/\beta} \right)$$

Protocoles de référence: 2Gy par fraction

En clinique, on convertit la BED en **dose totale équivalente délivrée en fractions de 2Gy** (EQ2)

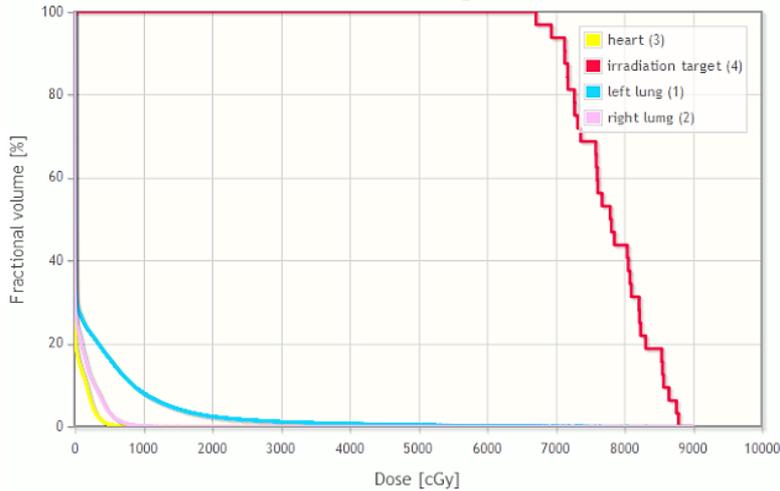
$$\text{BED} = nd \left(1 + \frac{d}{\alpha/\beta} \right) \longrightarrow \text{BED} = D \left(1 + \frac{2}{\alpha/\beta} \right)$$
$$D = \frac{\text{BED}}{\left(1 + \frac{2}{\alpha/\beta} \right)} = \text{EQ2}$$

- Importance du choix du ratio α/β
- Multiples BED possibles au sein d'un tissu

Projet *In vivo* : Effet volume - Contourage et Histogramme Dose/Volume

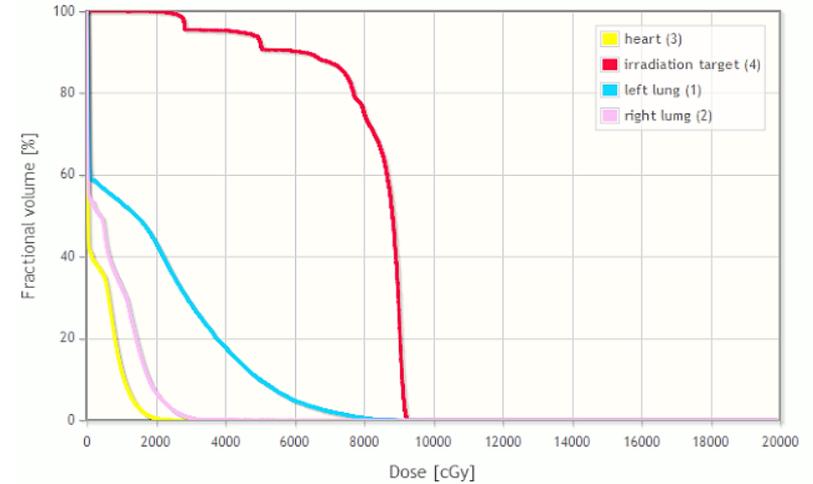
Ø 1 mm

Dose Volume Histogram



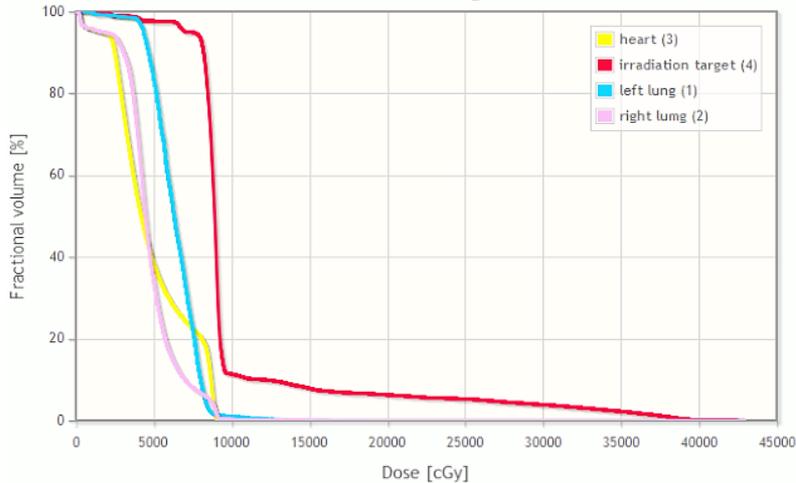
3x3 mm²

Dose Volume Histogram



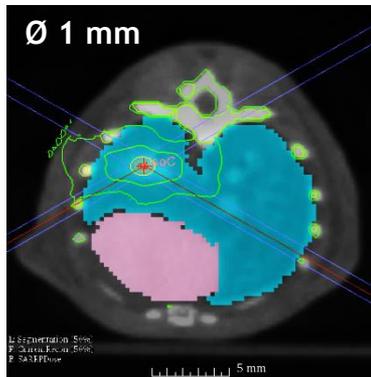
10x10 mm²

Dose Volume Histogram



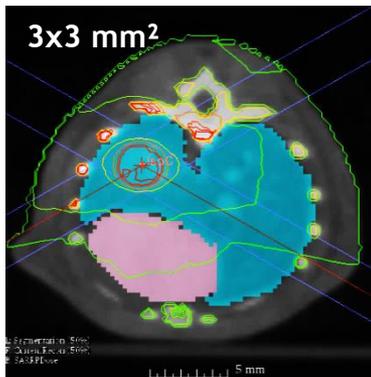
Doses moyennes aux organes

Collimateur	Ø 1 mm	3x3 mm ²	10x10 mm ²
Poumon gauche	2,5 Gy	19,2 Gy	63,5 Gy
Poumon droit	0,7 Gy	6,8 Gy	46,9 Gy
Coeur	0,4 Gy	3,7 Gy	48,7 Gy



Contourage des poumons :

$$V(\text{poumons}) = 0,6 \text{ cm}^3$$

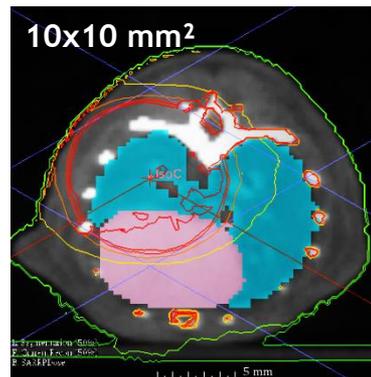


$$V(\text{patch } \text{Ø}1 \text{ mm}) = 7,85 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ soit } 0,13\% \text{ du volume pulmonaire}$$

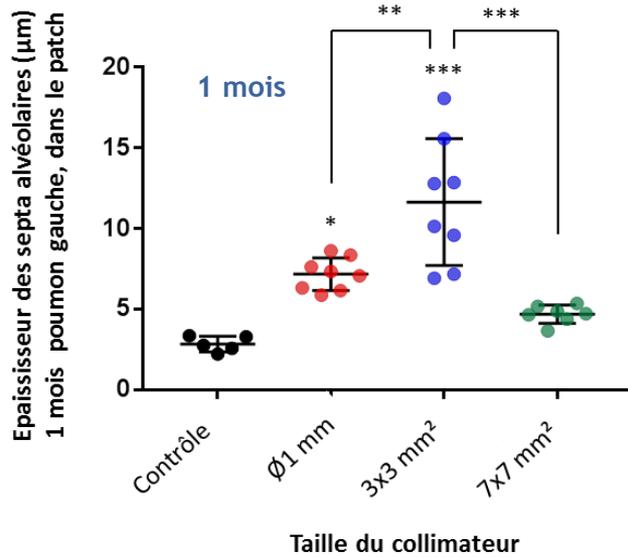
$$V(\text{patch } 3 \times 3 \text{ mm}^2) = 0,0212 \text{ cm}^3 \text{ soit } 3,5\% \text{ du volume pulmonaire}$$

$$V(\text{patch } 7 \times 7 \text{ mm}^2) = 0,2693 \text{ cm}^3 \text{ soit } 44\% \text{ du volume pulmonaire}$$

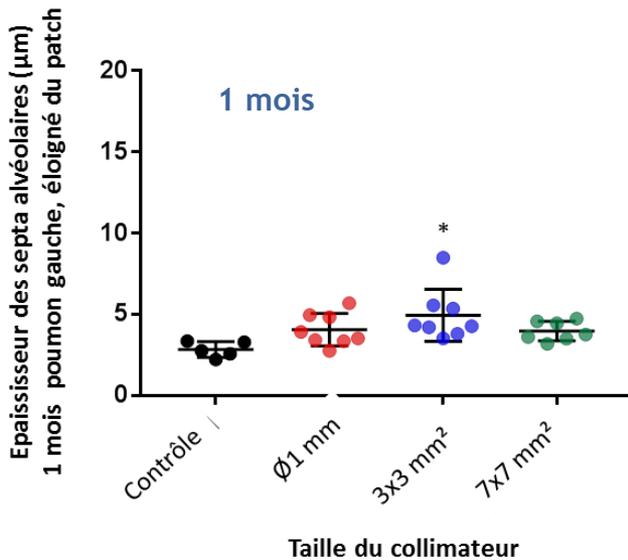
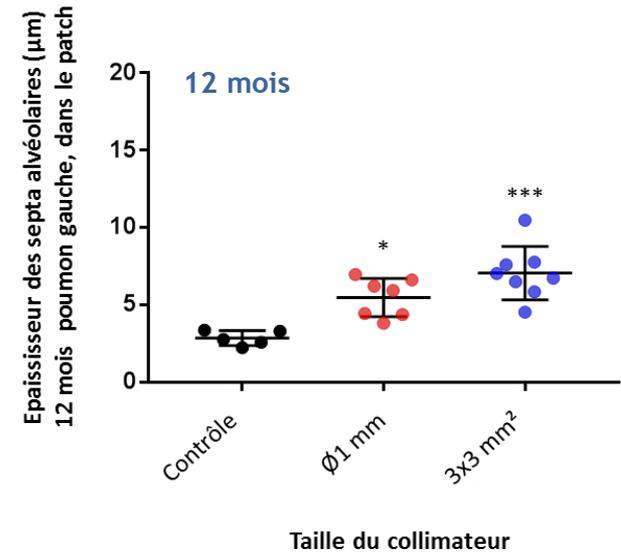
$$V(\text{patch } 10 \times 10 \text{ mm}^2) = 0,785 \text{ cm}^3 \text{ soit } 100\% \text{ du volume pulmonaire gauche}$$



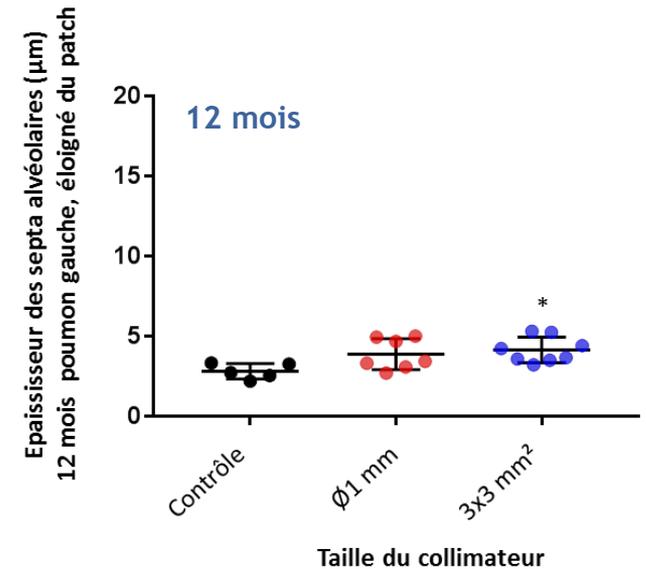
Épaississement des septa alvéolaires: indicateur de la réaction de cicatrisation



Poumon gauche
Dans le patch

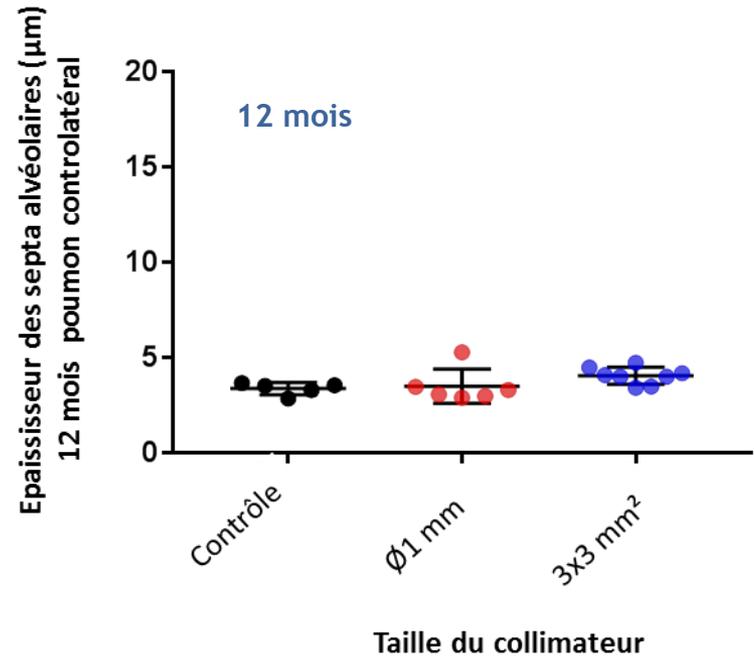
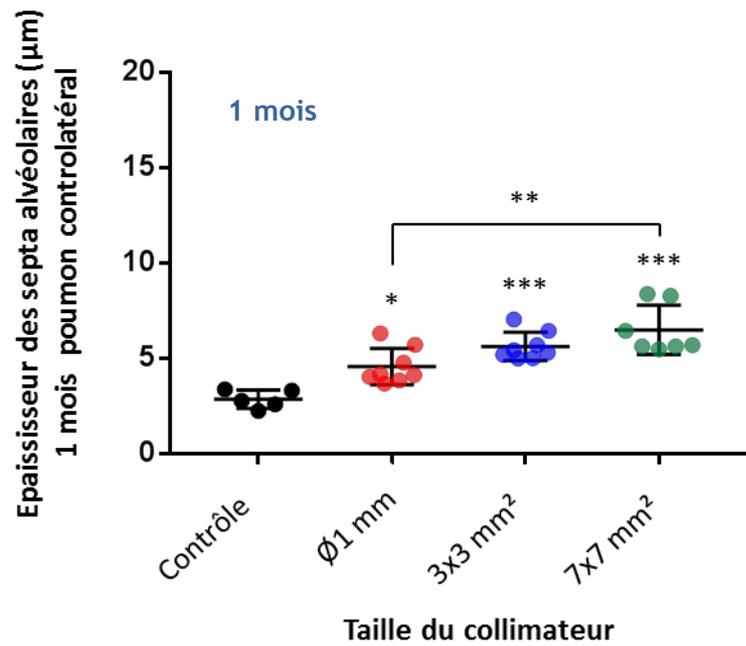


Poumon gauche
Zone pleurale

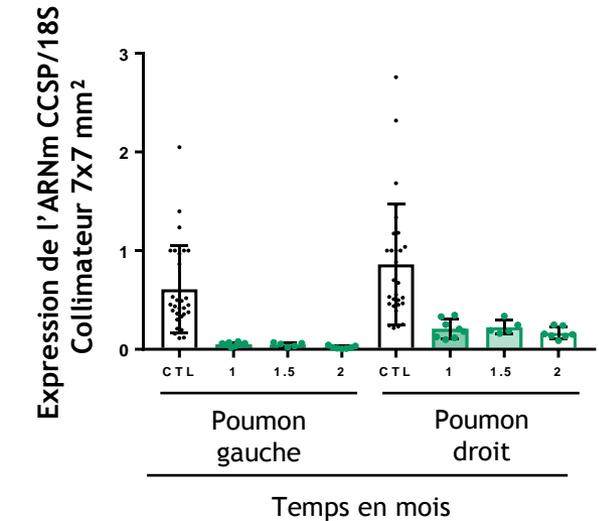
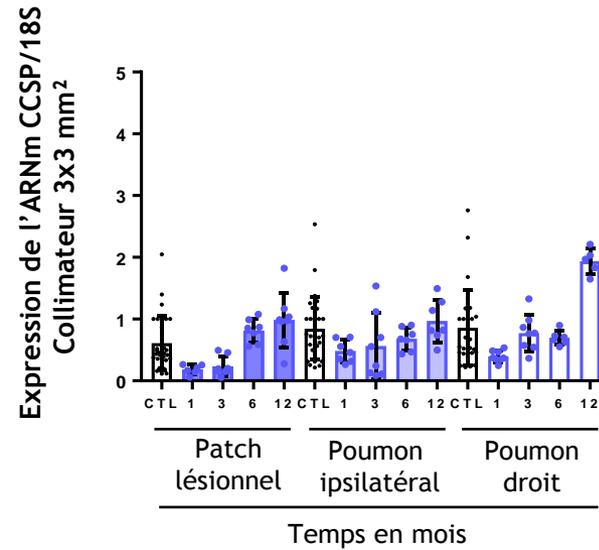
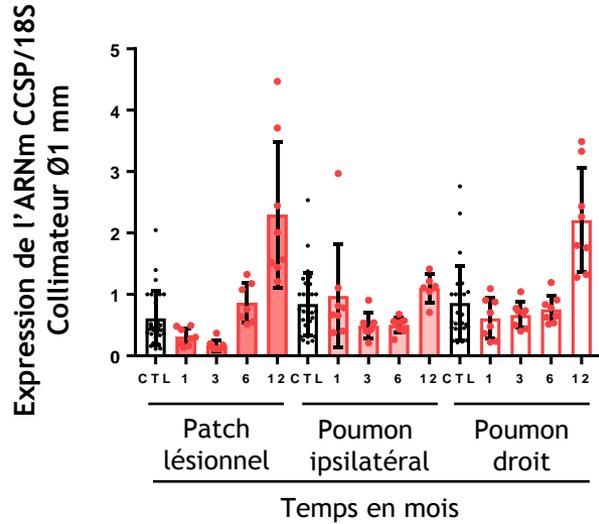
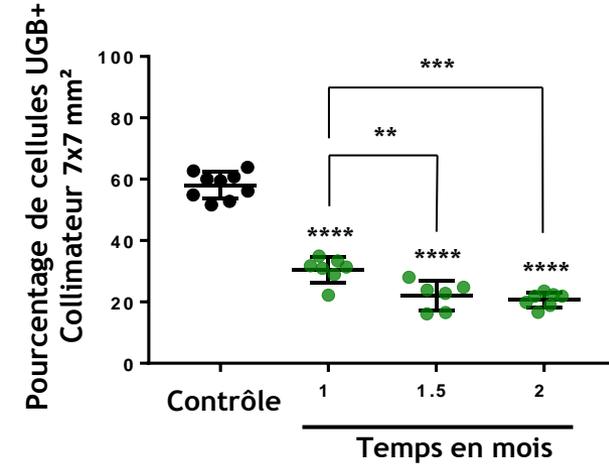
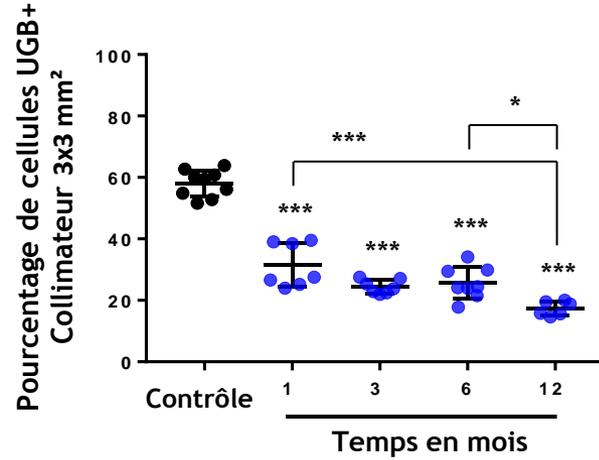
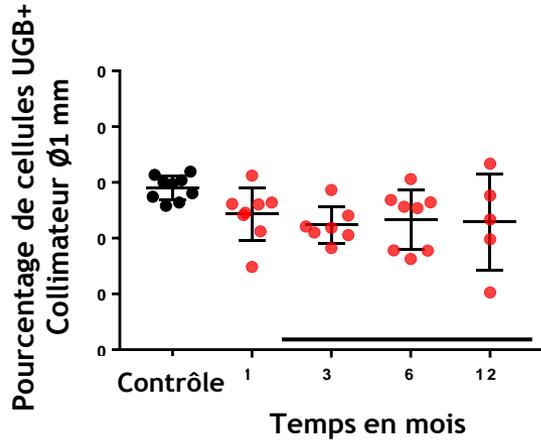


Epaissement des septa alvéolaires: indicateur de la réaction de cicatrisation

Poumon controlatéral
(droit)

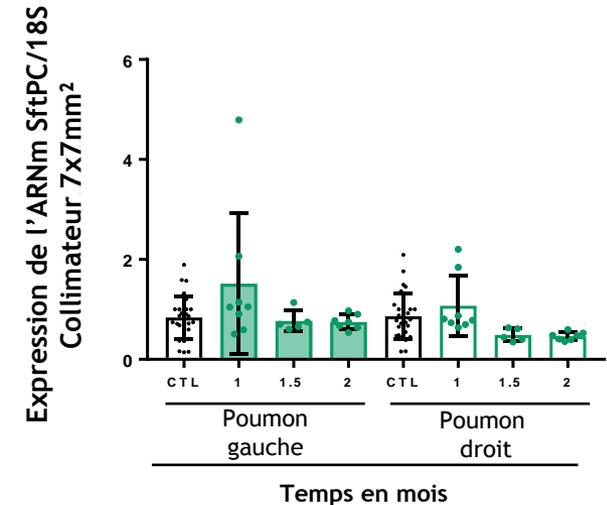
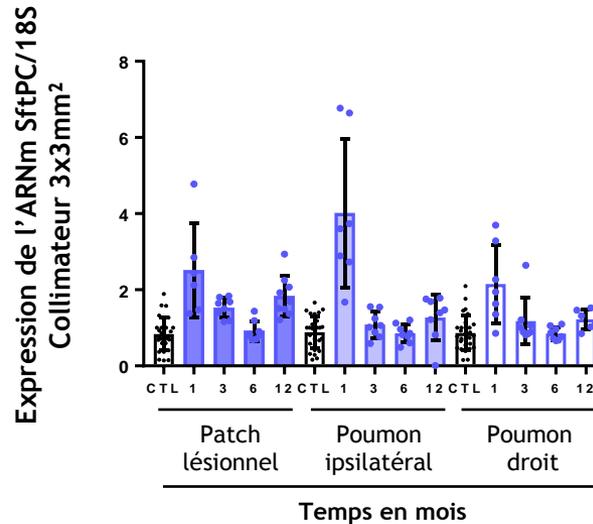
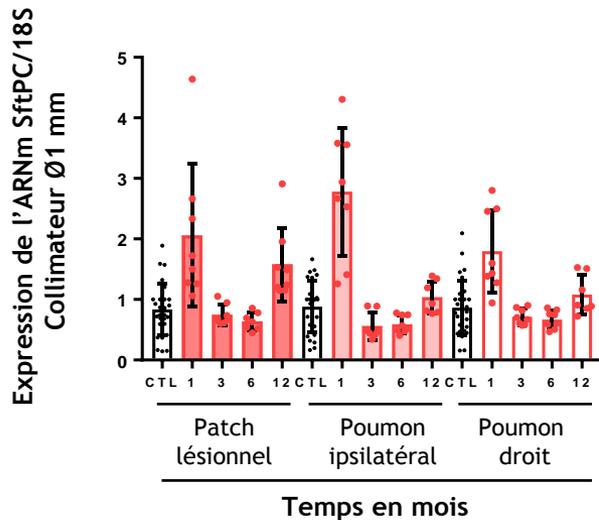
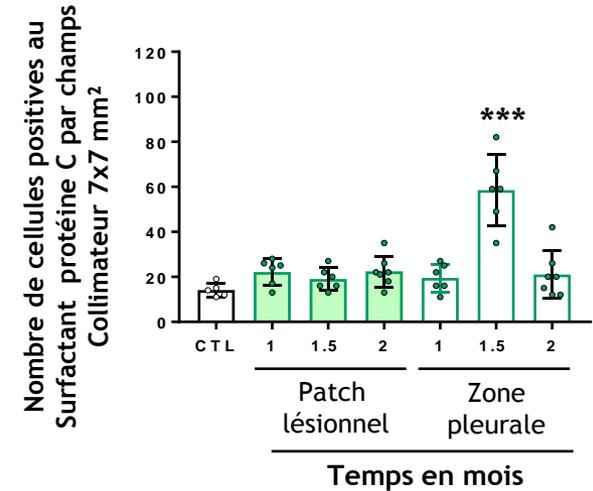
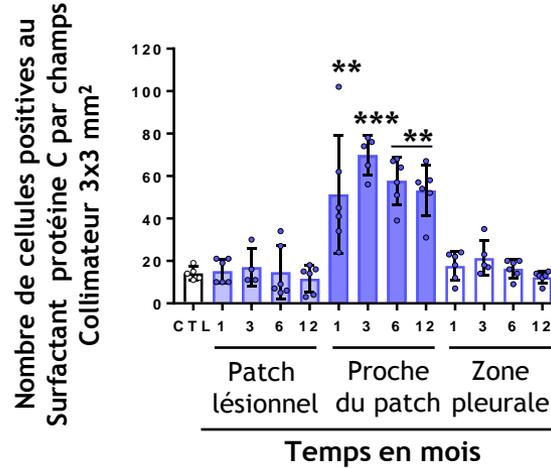
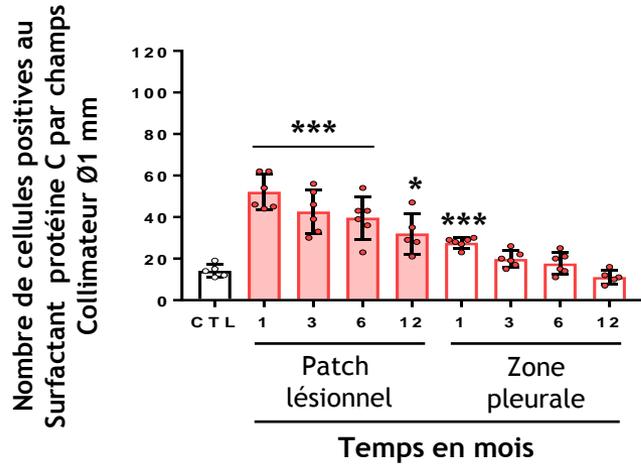


Cellules Club: marqueur de l'atteinte bronchiolaire



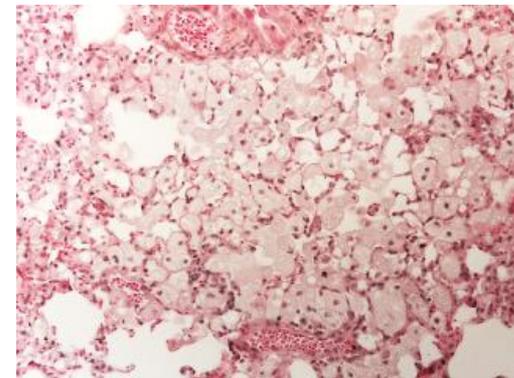
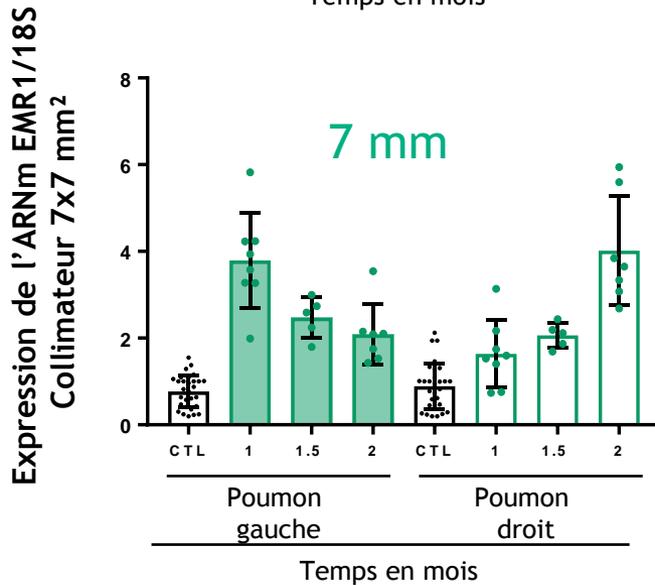
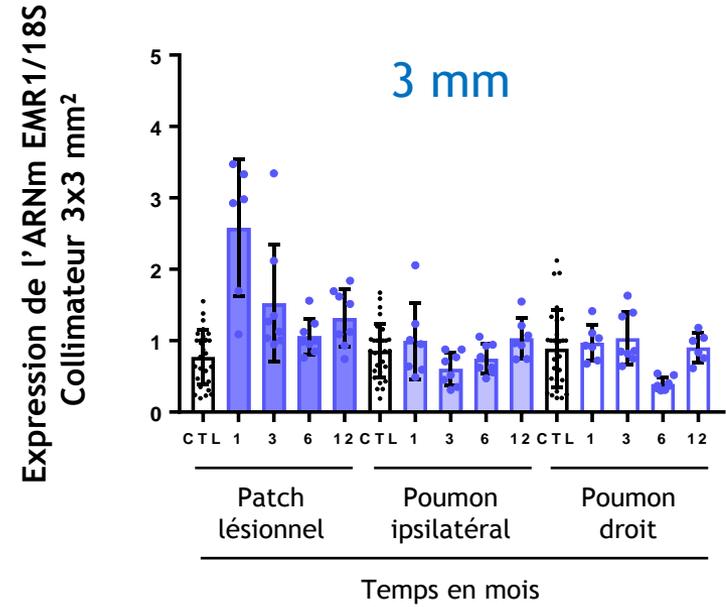
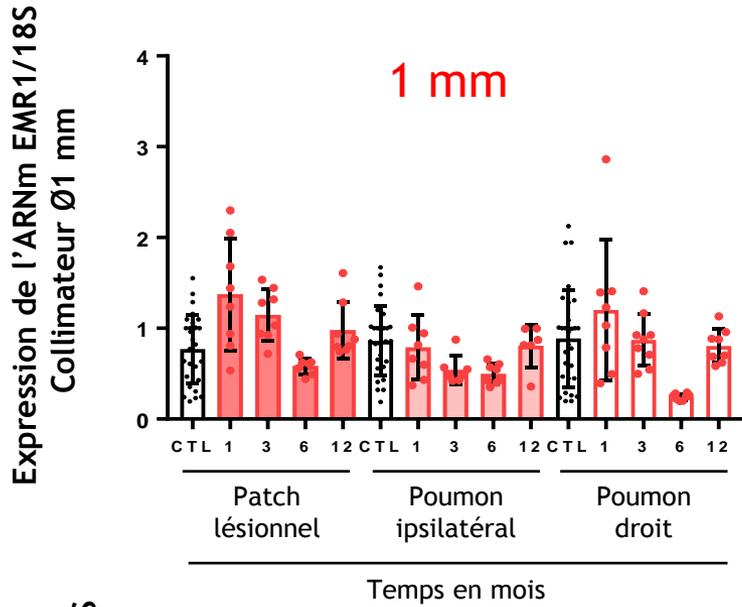
Surfactant Protéine C :

Protéine membranaire des pneumocytes de type 2, permettant la propagation du surfactant à la surface des alvéoles.



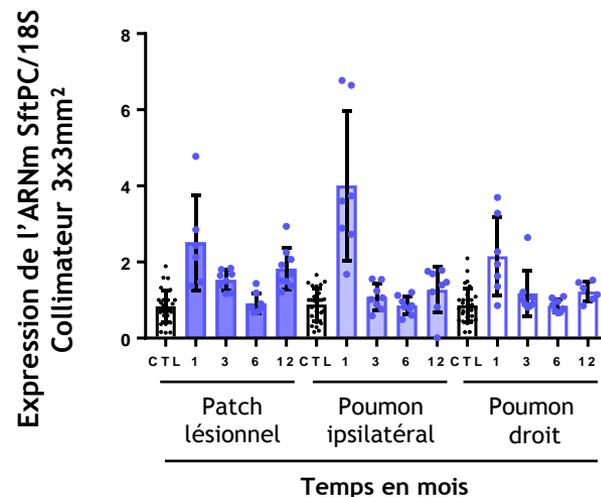
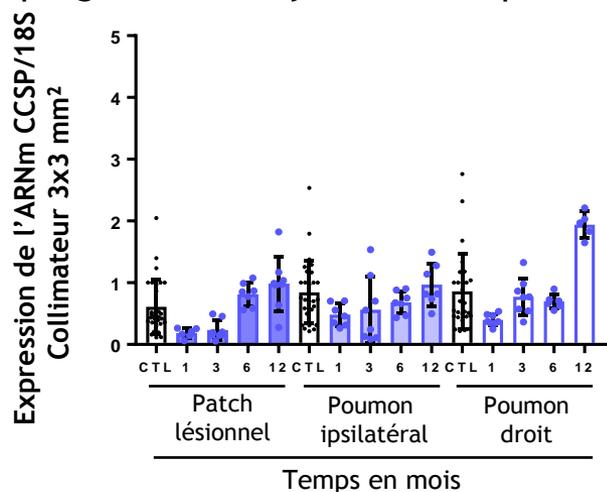
Temps en mois

Macrophages : Suivi de l'infiltration des macrophage (effet volume)

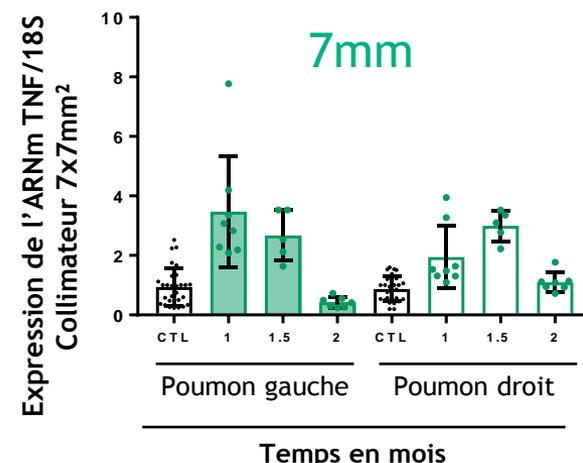
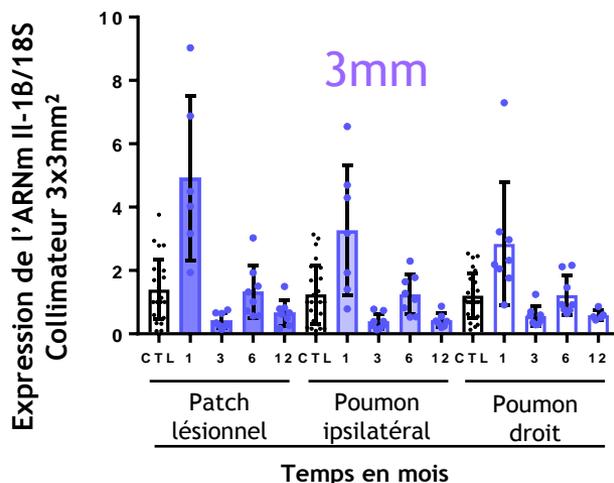
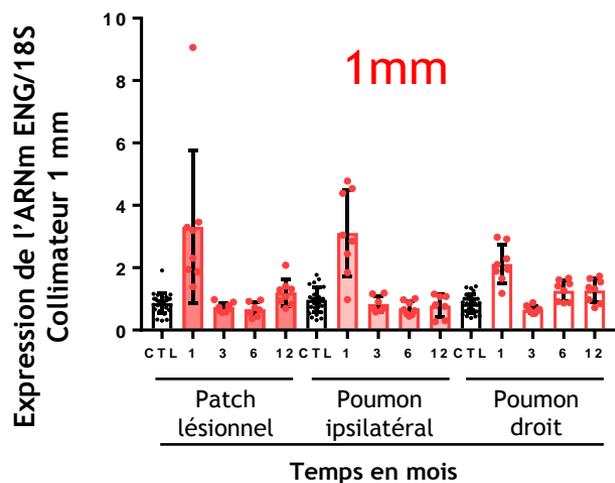


Etude de l'expression génique : les grandes tendances

Les gènes spécifiques des cellules Club, des Pneumocytes II et des cellules ciliées suivent les comptages de l'analyse anatomopathologique :



Inflammation : pic inflammatoire précoce impactant le poumon controlatéral, qui se résorbe
Profil globalement identique pour tous les collimateurs.



Trichrome de Masson - Cartographie
Rétractation du patch : comparaison

1 mois

20 Gy

40 Gy

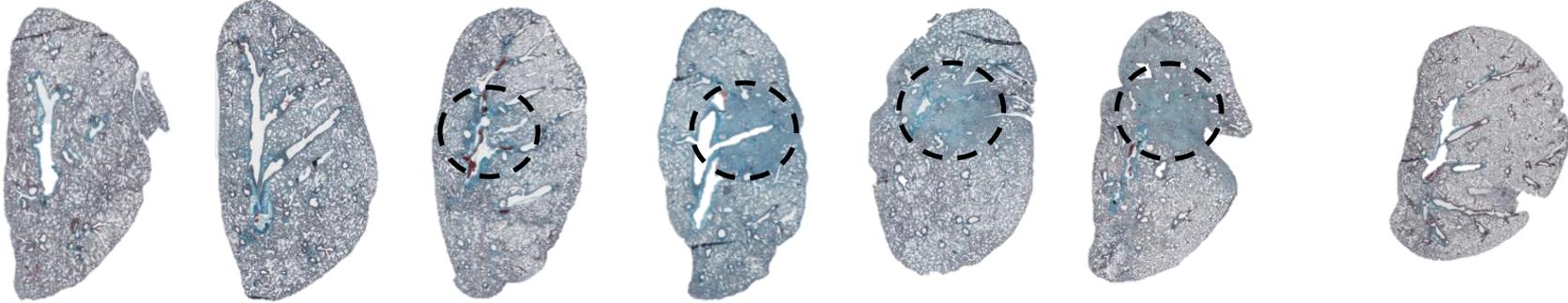
60 Gy

80 Gy

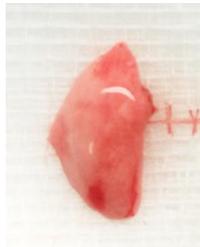
100 Gy

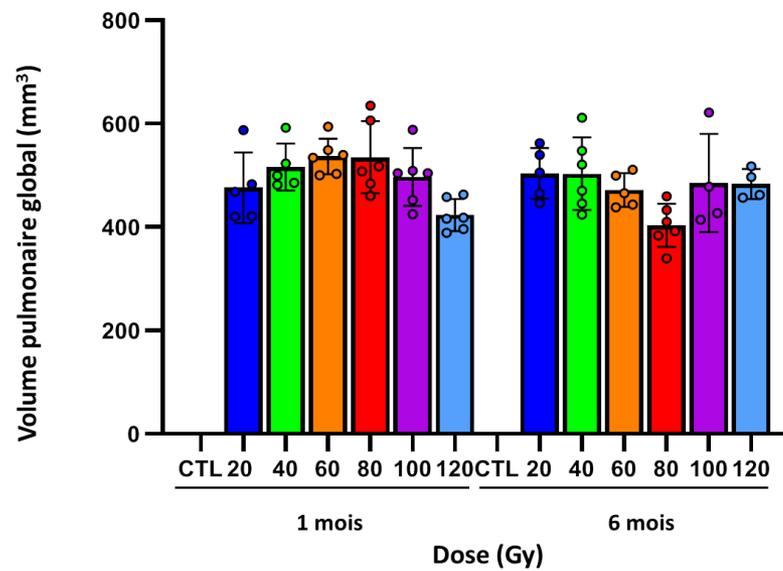
120 Gy

Contrôle



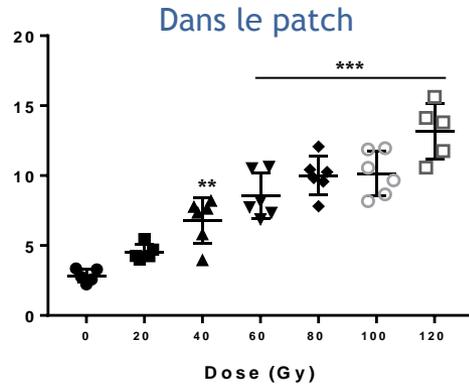
6 mois



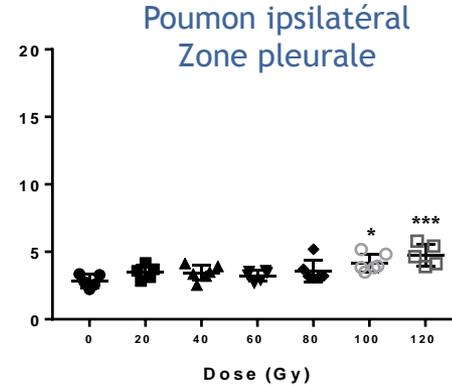


Epaissement des septa alvéolaires : indicateur de la réaction de cicatrisation

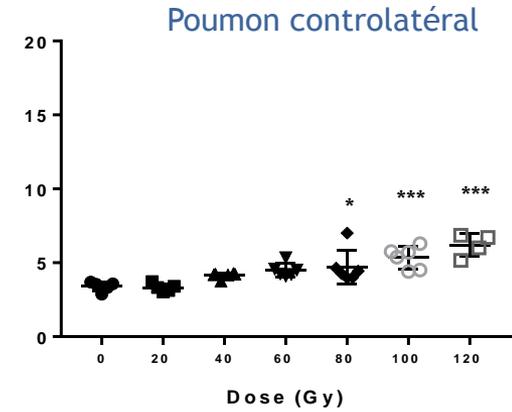
Epaisseur des septa alvéolaires (µm)
1 mois, dans le patch



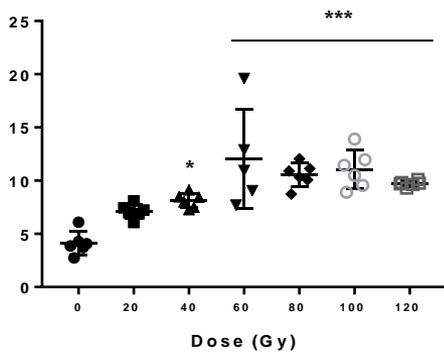
Epaisseur des septa alvéolaires (µm)
1 mois, éloigné du patch



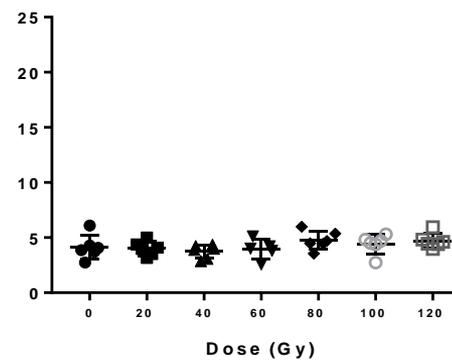
Epaisseur des septa alvéolaires (µm)
1 mois, poumon controlatéral



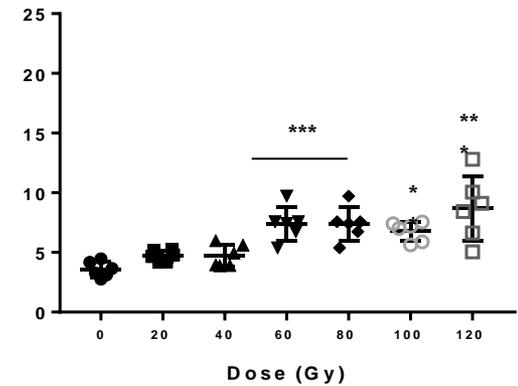
Epaisseur des septa alvéolaires (µm)
6 mois, dans le patch



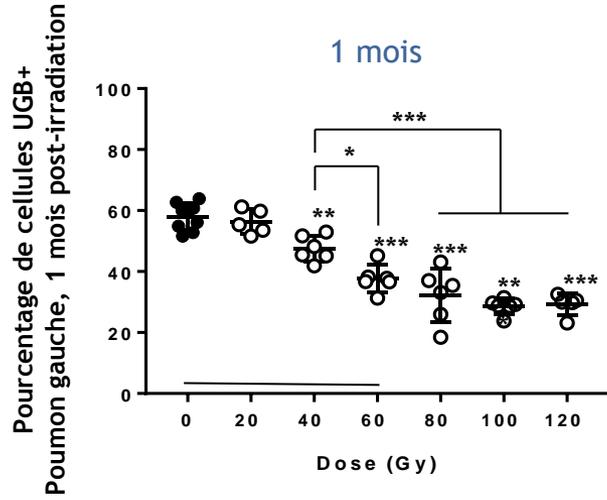
Epaisseur des septa alvéolaires (µm)
6 mois, éloigné du patch



Epaisseur des septa alvéolaires (µm)
6 mois, poumon controlatéral

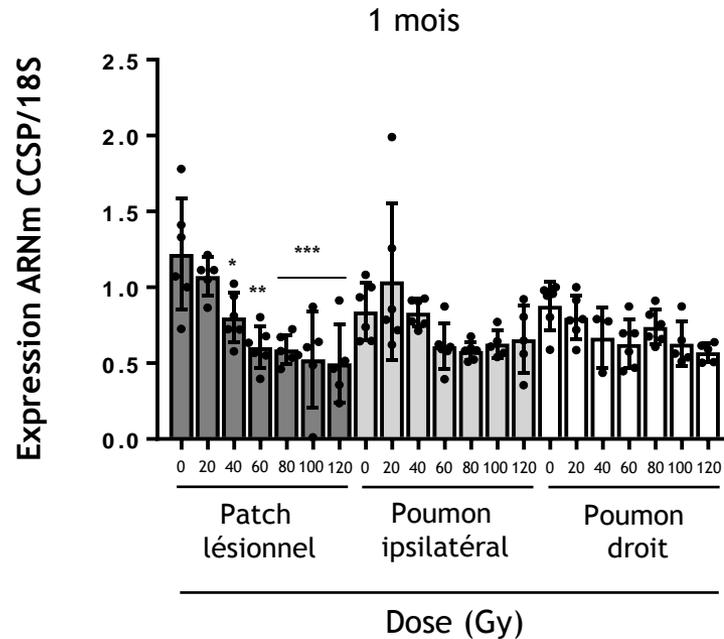
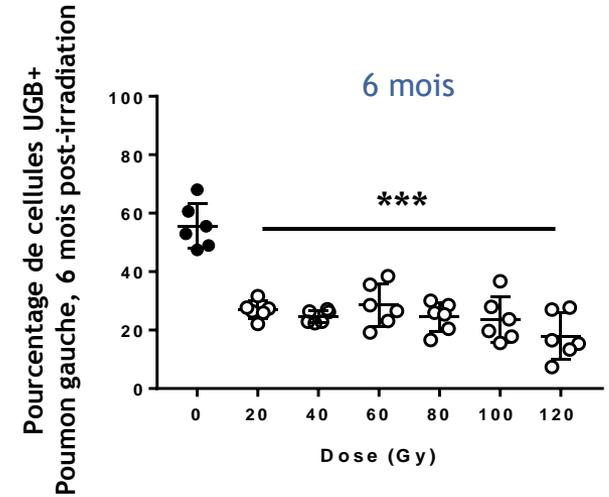


Cellules Club : marqueurs de l'attente bronchiolaire



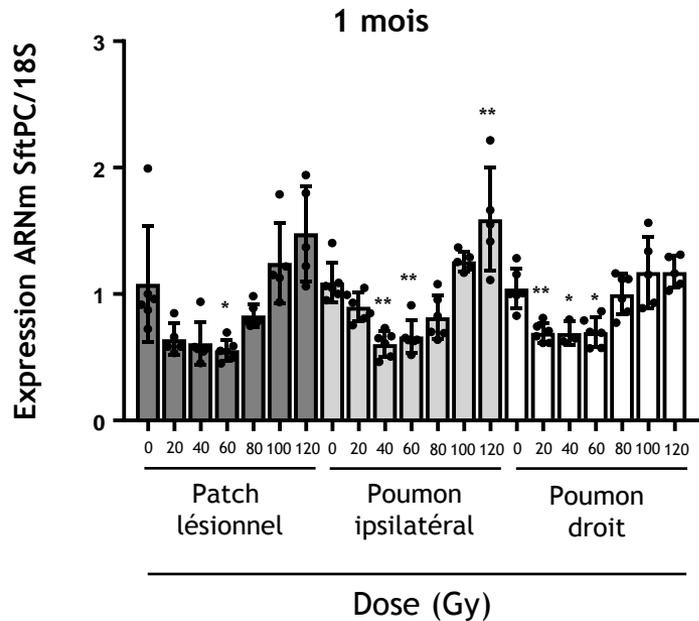
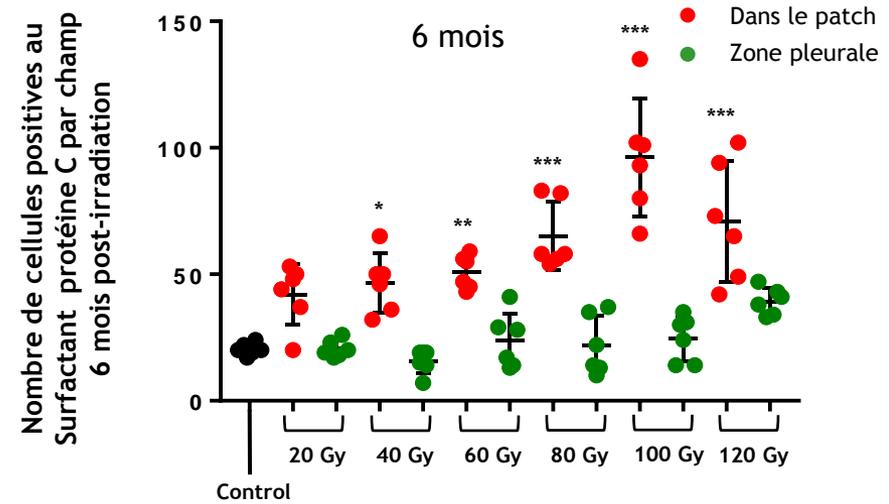
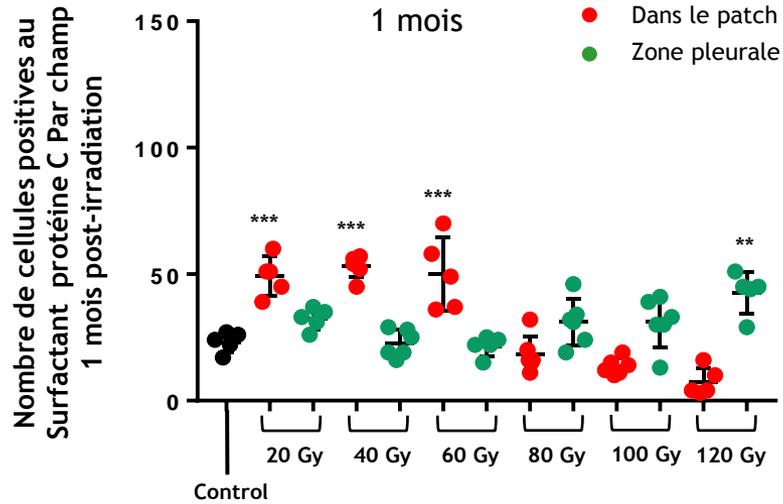
Dans le patch

A 1 mois post-irradiation, Le nombre de cellules de Clara diminue à partir de 40 Gy, avec un effet dose jusqu'à 60 Gy, au-delà, « plateau »

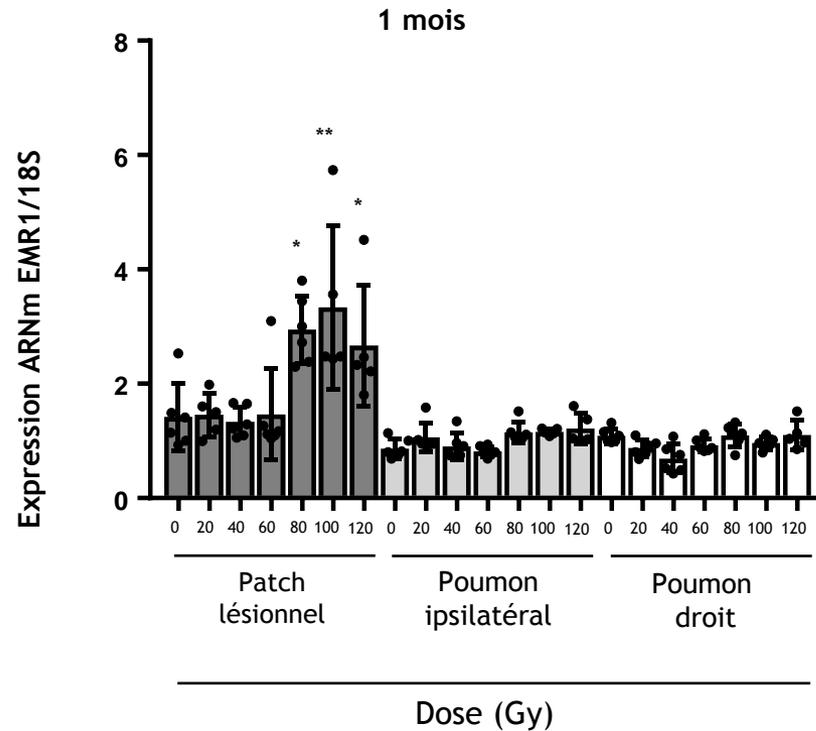
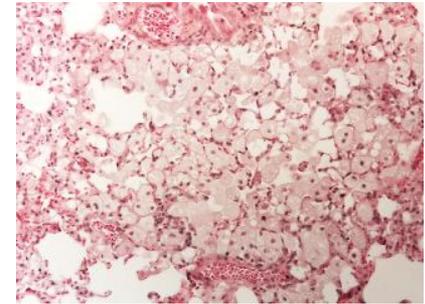


Surfactant C

1 et 6 mois post-irradiation



Macrophages : Suivi de l'infiltration des macrophage (effet dose)

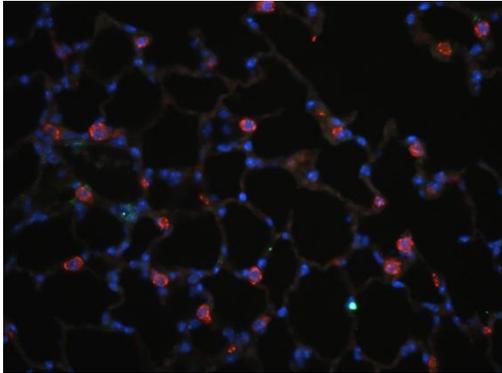


Infiltration importante des macrophage dans le patch à partir de 80 Gy

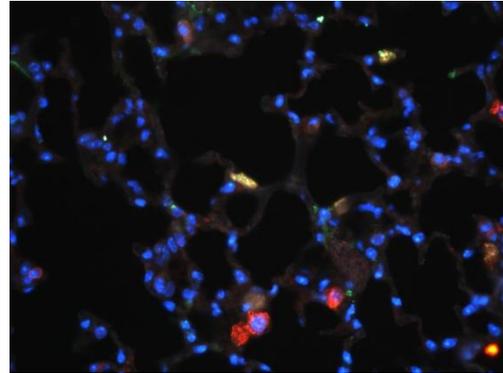
Transition épithélium-mésenchyme (EMT)

100 Gy 6 mois

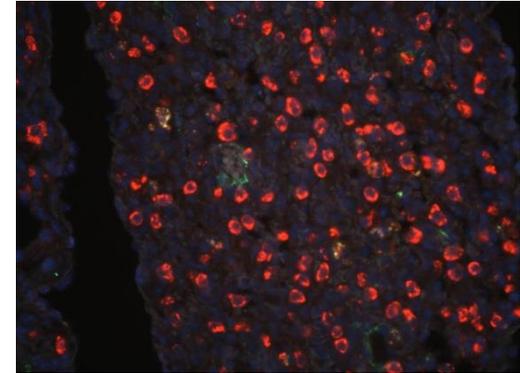
SFTPC / α -SMA / DAPI



Loin du patch



Près du patch

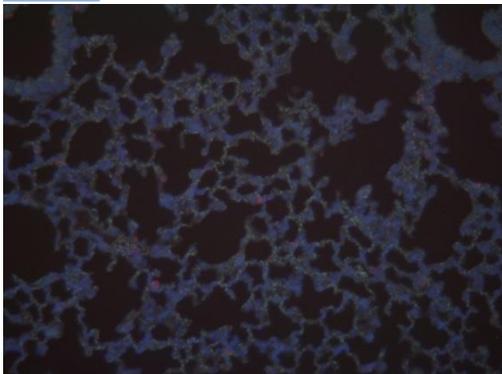


Dans le patch

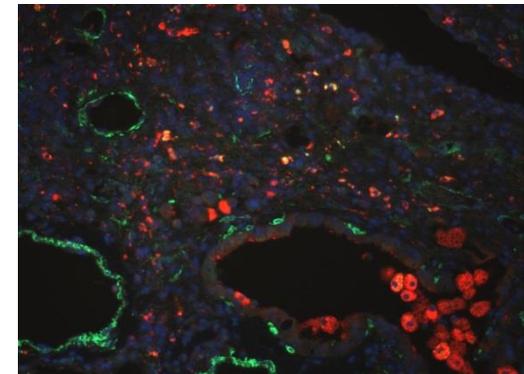
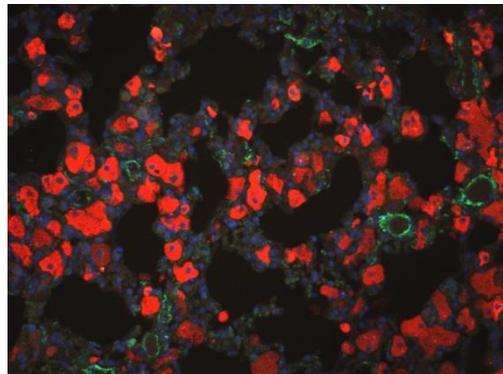
Transition macrophage-mésenchyme (MMT)

80 Gy 6 mois

CTL CD68 / DAPI

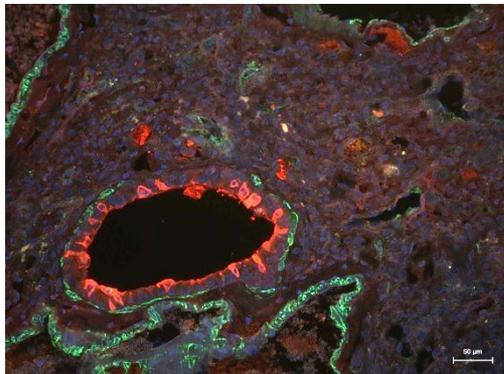
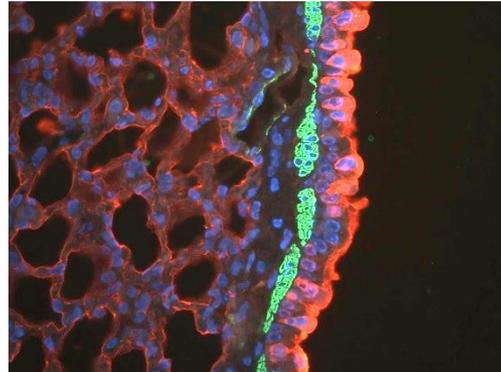


CD68 / α -SMA / DAPI

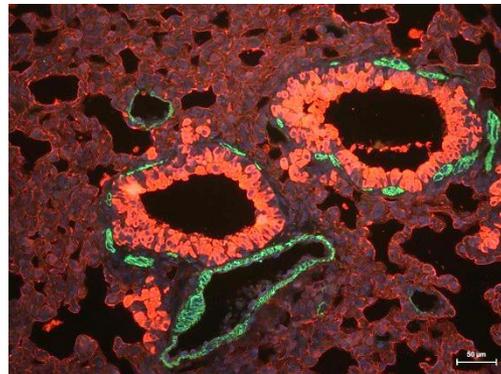


80 Gy 6 mois

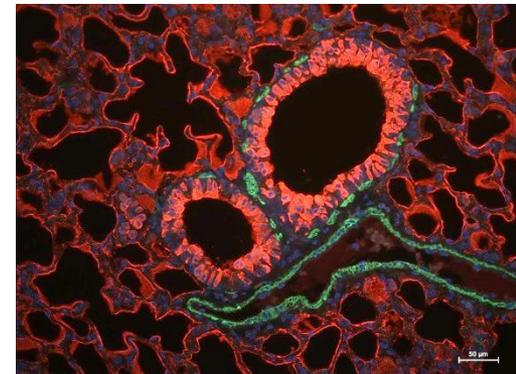
UGB/ α -SMA/DAPI



Dans le patch



Près du patch



Poumon droit

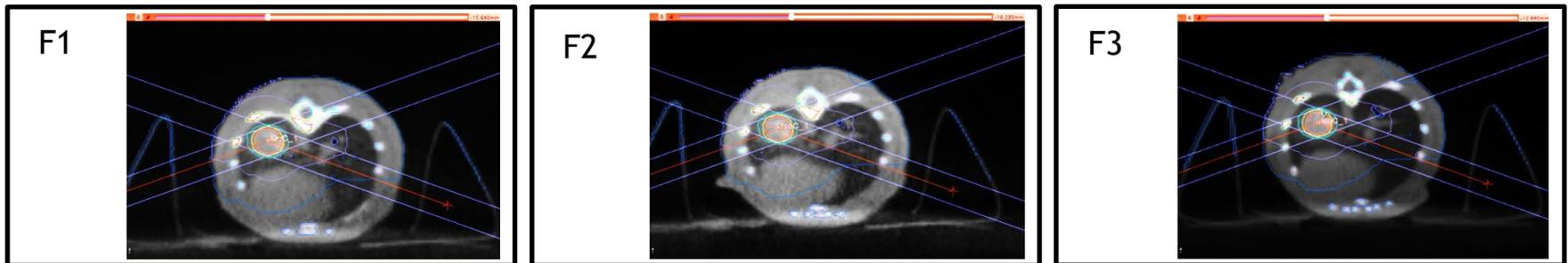
Etude de l'effet du fractionnement de la dose
Collimateur 3x3mm²
Etude en cours

Irradiations le lundi,
mercredi et vendredi

Nombre de fraction	Dose par fraction	BED _{3 Gy} à la cible	BED _{3 Gy} Isodose 30%
3	20	460	60
3	28	868	108
3	40	1720	208
3	50	2650	300

Isodose 30% : 30% de la dose déposée

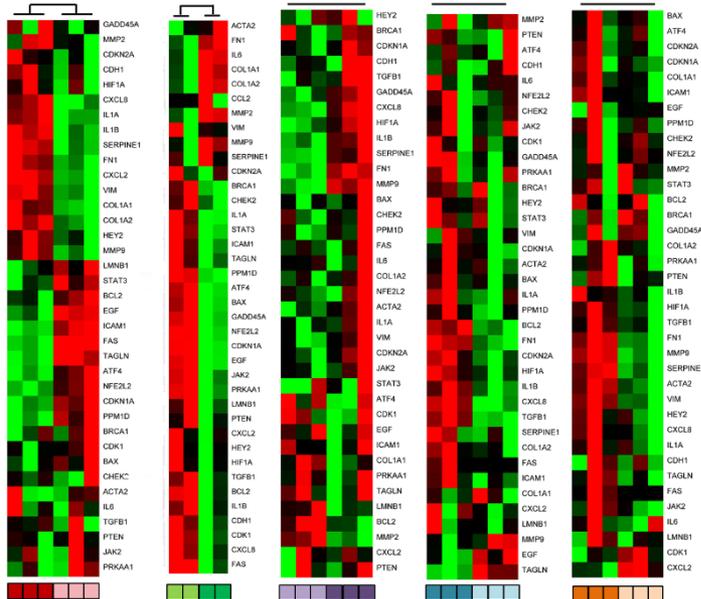
Repositionnement des souris : souris n° 12, 3x40 Gy



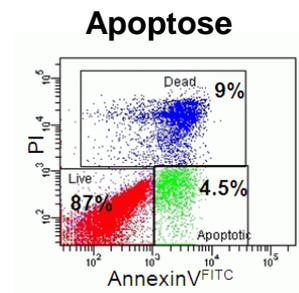
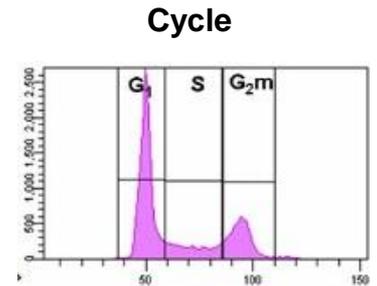
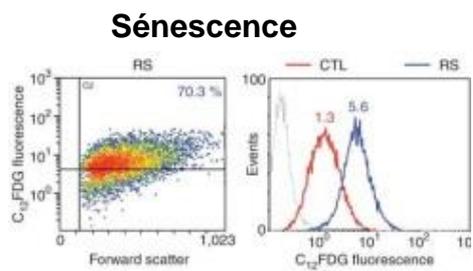
Suivi par image scanner, 3x40 Gy, 2 mois post-irradiation :



Réponse cellulaire aux fortes doses par fraction



- Cellules musculaires lisses
- Cellules épithéliales alvéolaires
- Fibroblastes pulmonaires
- Cellules microvasculaires pulmonaires



→ Les 5 types cellulaires

Mesures multiples en Cytométrie en Flux

Projet *in vitro*: réponse cellulaire aux fortes doses par fraction

HMVEC (cellules endothéliales)

NHBE (Cellules épithéliales bronchiques)

BSMC (Cellules musculaires lisses bronchiques)

SAEC (Pneumocytes 1)

NHLF (Fibroblastes)

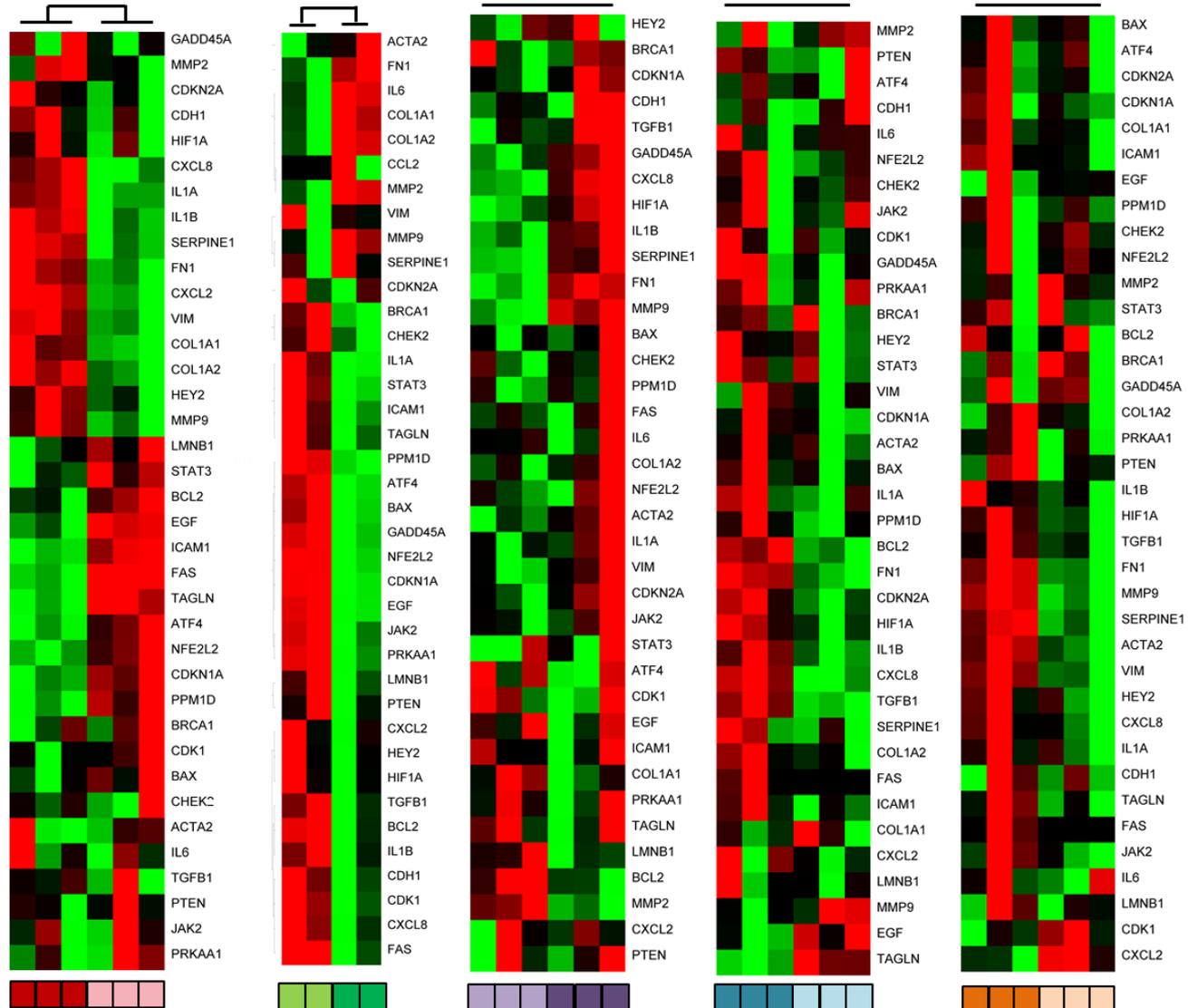
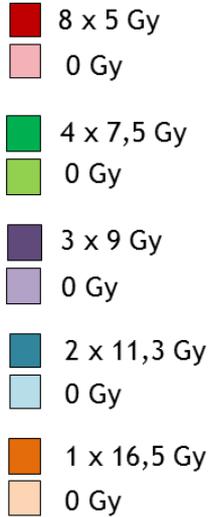
Choix $\alpha/\beta = 3$

n	d	α/β	BED	EQ2	DT
8	5	3	106,6	64	40
4	7,5	3	105	63	30
3	9	3	108	64,8	27
2	11,3	3	107,7	64,6	22,6
1	16,5	3	107,2	64,3	16,5

Choix $\alpha/\beta = 10$

n	d	α/β	BED	EQ2	DT
14	5	10	105	87,5	70
8	7,5	10	105	87,5	60
6	9	10	102,6	85,5	54
4	11,3	10	96,2	80,2	45,2
2	16,5	10	87,4	72,8	33

HeatMap
NHBE



Analyse globale : dégager des profils d'expression génique en fonction de la dose par fraction

Epaissement des septa alvéolaire après irradiation thorax entier

