

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

**Sarah BRAGA-COHEN, Morgane DOS SANTOS,
Fabien MILLIAT et Agnès FRANCOIS**

Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire
31 avenue de la division Leclerc - 92262 Fontenay-aux-Roses Cedex
sarah.bragacohen@irsn.fr

Aujourd'hui, la radiothérapie en conditions stéréotaxiques ou SBRT (Stereotactic Body Radiation Therapy) est une alternative thérapeutique pour les 20 à 30% des patients à haut risque chirurgical, atteints de cancer bronchique primitif localisé. La SBRT est une technique de haute précision balistique, permettant l'irradiation de très petits volumes, grâce à la convergence de mini faisceaux au centre de la cible. Elle autorise la mise en place de protocoles en hypofractionnement sévère avec des doses par fraction, dites ablatives, de 6 à 20 Gy, changeant drastiquement la radiobiologie des tissus sains. Malgré la réduction du volume irradié, certains patients développent des pneumopathies radiques de type inflammatoire et/ou fibreux. Mieux comprendre la radiobiologie de ces très fortes doses par fraction sur de petits volumes de tissus sains pourrait aider à appréhender les risques associés à ces nouvelles pratiques de radiothérapie. Grâce à l'acquisition d'un irradiateur dédié au petit animal, notre laboratoire a pu mettre en place un modèle préclinique de SBRT pulmonaire chez la souris et acquérir du recul sur les effets anatomopathologiques de l'exposition de très petits volumes pulmonaires à de fortes doses de rayonnements. En particulier, un infiltrat macrophagique important a été observé au niveau du site lésionnel. Les macrophages sont des cellules du système immunitaire, issues de la différenciation des monocytes. Elles sont connues pour être impliquées dans les processus fibreux, y compris radio-induits. Ce sont des cellules polarisées qui évoluent dans un continuum fonctionnel allant des macrophages M1, pro-inflammatoires, aux macrophages M2, anti-inflammatoires. Comprendre le rôle de ces cellules dans les dommages aux tissus sains pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans la gestion des séquelles pulmonaires de la SBRT.

L'objectif de ce projet est de déterminer le rôle des sous-populations macrophagiques dans le développement des lésions pulmonaires induites par une irradiation en conditions stéréotaxiques chez la souris.

Nous utilisons un irradiateur dédié au petit animal, le SARRP (Small Animal Radiation Research Platform). Le modèle utilisé est une irradiation du poumon gauche de la souris, grâce à un faisceau collimaté à 3 x 3 mm². Les doses sont délivrées en arc-thérapie sur 220 degrés, afin d'éviter les lésions à la peau, et permettre des points d'études tardifs. Pour cette étude nous avons décidé de comparer deux doses d'irradiation délivrées en une fraction unique: 60 Gy, qui induit une fibrose progressive, et 80 Gy, qui induit une fibrose rapide. Les résultats sont observés à différents temps post-irradiation, de 3 jours à 12 mois. Ce projet s'articule autour des différents axes. Dans un premier temps, l'immunohistologie nous permet de localiser les macrophages de type M1 (CD68+CD80+) et les macrophages de type M2 (CD68+CD206+) au sein des lésions au fur et à mesure de leur développement. La cytométrie en flux, réalisée à partir de digestions de poumons et des lavages broncho-alvéolaires, nous apporte une réponse quantitative sur la distribution des sous-populations macrophagiques dans le parenchyme pulmonaire et dans l'espace broncho-alvéolaire. Enfin, afin de comprendre l'influence de ces macrophages dans le développement des lésions, nous comparons à des souris sauvages (souris WT), les lésions pulmonaires induites chez des souris invalidées pour le gène CCR2 (CCR2KO), chez lesquelles le recrutement des macrophages est abrogé.

Chez les souris WT irradiées à 80 Gy, nous observons l'apparition d'un patch lésionnel fibreux à partir de 3 mois post irradiation, alors qu'il n'apparaît qu'à partir de 6 mois post irradiation pour la dose de 60 Gy. Les études aux temps plus précoces post-irradiation sont en cours. Les marquages immunohistologiques permettent d'observer un infiltrat macrophagique après irradiation à 60 Gy et à 80 Gy. Nous observons notamment des clusters de macrophages autour des lésions qui semblent être majoritairement des macrophages de type M2 (CD68+CD206+). La cinétique d'apparition et l'aspect du patch sont similaires entre les souris WT et CCR2KO pour la dose de 80 Gy. En revanche pour la dose de 60 Gy, les souris CCR2KO semblent développer un patch inflammatoire plus diffus que les souris WT. En effet, nous n'observons pas chez ces souris de patch lésionnel fibreux. Les études immunohistologiques sur les souris CCR2KO sont en cours.

En parallèle, les mises au point pour les expériences de cytométrie en flux ont été réalisées avec la création et la validation d'un panel de 12 marqueurs permettant de caractériser de manière précise les sous-populations macrophagiques présentes au niveau de la lésion. La multiplicité des marqueurs offre la possibilité de suivre l'évolution phénotypique des populations de macrophages au cours du développement des lésions entre 3 jours et 12 mois post-irradiation. De plus, ces analyses pourraient révéler différentes populations macrophagiques chez les deux souches de souris qui pourraient être déterminantes pour expliquer la sévérité des lésions observées.

En conclusion, de nombreuses analyses restent à faire mais les premiers résultats semblent en faveur d'un rôle de certaines populations macrophagiques dans le développement des lésions focales pulmonaires. La suite du projet vise à étudier l'origine circulante ou résidente des macrophages présents au sein des tissus par la technique de parabiose. Enfin, une étude Single Cell RNAseq permettra de déterminer si d'éventuelles populations macrophagiques minoritaires pourraient jouer un rôle important dans le développement des lésions pulmonaires.