

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biotechnologie, Instrumentation, Signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Paul GIMENEZ

Thèse dirigée par **Hélène ELLEAUME**
et codirigée par **Jean-Luc RAVANAT**

préparée au sein de l'**Institut des Neurosciences de Grenoble** et
de l'**INAC** au **CEA Grenoble**
dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement**

Radiothérapie par photoactivation de nanoparticules et effet Mössbauer.

Thèse soutenue publiquement le **27 Octobre 2015**,
devant le jury composé de :

Mme, Cécile SICARD-ROSELLI

Maître de Conférence Univ. Paris Sud, Rapporteur

Mme, Yolanda PREZADO

Chargée de Recherche CNRS Orsay, Rapporteur

Mr, David SARRUT

Directeur de Recherche CNRS Créatis Lyon, Examineur

Mr, Jacques BALOSSO

Professeur, Université de Grenoble Alpes, Examineur

Mr, François ESTEVE

Professeur, Praticien Hospitalier, INSERM U836, GIN Grenoble, Invité

Mme, Hélène ELLEAUME

Directeur de Recherche, INSERM U836, GIN Grenoble, Directeur de thèse

Mr, Jean-Luc RAVANAT

Directeur de Recherche, CEA Grenoble, LAN, Co-Directeur de thèse



« Music theory is not Nuclear Physics : $E = F^b$ »

Internet

Remerciements

Tout d'abord je remercie le Labex Primes de l'Université de Lyon pour avoir financé cette thèse.

Je remercie également Cécile Sicard Roselli, Yolanda Prezado, David Sarrut et Jacques Balosso pour avoir accepté de juger ce travail de thèse. Merci François d'avoir accepté mon invitation à participer à ce jury.

Ensuite je tiens à remercier Hélène pour sa patience et sa présence durant ces trois années. Malgré tes problèmes tu as toujours été là pour me regonfler le moral et rassurer mon perpétuel manque de confiance en moi. Tu m'as encouragé lorsque ça ne marchait pas, et tu as chassé de ton sourire les nuages de doute qui planaient sur moi. J'ai appris beaucoup de choses, dont la diplomatie, les cellules carrées et ~~le germano-russe~~ la traduction.

Merci à Jean-Luc de m'avoir co-supporté pendant ces trois ans. Ce n'est pas évident ! Merci pour ta patience, même pendant les « combats » contre le HPLC-MS/MS. Merci pour ton aide en chimie et dans les dédales administratifs du CEA.

Un grand merci aux thésards et stagiaires qui ont partagé mes bureaux des deux côtés du rond-point : Layal, Laurie, Solveig, Camille, Stéphanie et Mini-Marie.

Merci à Aurélie Charazac pour son aide au bâtiment K, pour le quizz musical à Rhodes et le soutien psychologique. Merci à sa voisine de bureau Morgane pour ses crises de fou-rire, son aide en chimie et tous les bons moments à la pause-café. Merci à Sylvain pour ses ressources infinies pour les pimenter de remarques interlopes.

Merci à Florence et Mélanie pour m'avoir tout appris du labo et de ses arcanes. Sans vous, j'aurais tué toutes mes petites cellules en trois jours. Merci de m'avoir poussé pour manipuler les rats à l'animalerie. Extraire un cerveau de rat est loin d'être facile ! Quant aux expériences *in vivo*, anesthésie,

Introduction générale

tonsure, couture, c'est en en salle de chirurgie que j'ai appris le multi-tasking. Merci à Tanguy et Mathylde de m'avoir appris à découper des cerveaux de rats, c'est une expérience inoubliable.

Merci à Alexander Chumakov et Rudolf Ruffer pour leur patience et leur collaboration. Pas toujours évident de se comprendre entre biologistes et physiciens.

Merci à Hélène et à Charlène, pour votre travail quotidien qui permet au satellite de tourner rond. Merci à Sara Lim pour son aide précieuse lors de temps de faisceau qui auraient été bien solitaires sinon, et pour tes encouragements et nos discussions sans fin sur les américains. Merci également à Solveig pour cette cohabitation pacifique lors des derniers mois de ma thèse, pour ton aide en culture cellulaire et pour ta prise de contact avec l'IBS. Bon courage pour ta thèse qui commence, c'est un voyage passionnant.

Un grand merci à Zohra, Margaret et Béatrice Rayet pour avoir tenu bon et m'avoir guidé dans ma situation administrative parfois labyrinthique.

Merci à Josiane Arnaud pour l'analyse des échantillons au CHU, à Martin Clémancey pour l'accès aux sources Mössbauer du CEA et ses conseils pour les expériences. Merci également à Jean-Philippe Kléman pour les images prises à l'IBS et ses explications. Merci à Geneviève Blondin et Jean-Marc Latour pour m'avoir ouvert les portes du labo Mössbauer en plein milieu de l'été.

Merci à Gaëtan Galisot pour l'aide lors des irradiations, lectures et analyses de films EBT3. Merci à Christine pour son sourire et son réseau pour commander la coumarine. Un grand merci à Camille Cuier pour les nombreuses analyses HPLC. Je remercie chaleureusement Thierry Brochard pour son aide pour maintenir fonctionnel le compteur de colonies, si utile, et pour son expertise indispensable lors des expériences sur ID17. Merci à Sylvain pour son aide à la préparation de l'expérience sur ID16.

Merci à Raph' pour la tonne de conseils de manip', l'apprentissage des techniques de réanimation de rats, l'ambiance musicale en chirurgie et ton étonnement permanent lors de nos croisements.

Merci à Elke, Christian, Ludo, Blaž, Giacomo de participer à la bonne humeur d'ID17, et pour avoir fait de ces 3 ans au synchrotron une expérience humaine enrichissante.

Radiothérapie par photoactivation de nanoparticules et effet Mössbauer

Merci aux membres d'Organic Groonje et d'Antydot', que ce soit pour jouer sur un coin de pavé ou partir en tournée en tourbus, on peut toujours compter sur vous. Vous me permettez d'être sur scène avec vous et de transmettre cette passion de la musique à des milliers de gens.

Merci à ma famille, à mes frères et sœurs, à toute cette tribu de Gimenez qu'on ne quitte jamais vraiment. Chapeau bas à mes parents, qui ont élevé 7 enfants et trouvent encore de la patience pour nous aimer malgré nos bêtises.

Un merci spécial à Valentin mon frère jumeau, batteur échevelé, qui m'a accompagné dans ma vie scolaire de 2 ans jusqu'au Bac+5, mais qui ne connaît pas les joies des congrès à Rhodes ou de la rédaction.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon épouse Sandra qui m'a dit oui en août 2014, faisant de moi le plus larmoyant des hommes pendant une journée, et qui m'a soutenu même dans mes périodes les plus ronchons.

Glossaire

3CC : 3-acide carboxylique coumarine

7OHC : 7-hydroxy coumarine ou ombelliférone

8-oxo dAdo : 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyadénosine

CDB : Cassures Double Brins

CSB : Cassures Simple Brin

CEMS : Spectroscopie Mössbauer par électrons de conversion

dAdO : 2'-désoxyadénosine

DCE : Double Couche Electrique

DdD : Débit de Dose

DLS : Diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering)

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DO : Densité Optique

DOS : Densité d'état des phonons (Density of States)

EPR : Phénomène naturel de capture préférentielle par la tumeur des nanoparticules circulant dans le sang (Enhanced Permeability and Retention)

fLM : Facteur de Lamb-Mössbauer

HPLC-MS/MS : Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse en mode tandem

ICPMS : Spectrométrie par torche à plasma (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

MB : Mössbauer

NIS : Diffusion nucléaire inélastique (Nuclear Inelastic Scattering)

NPFe : Nanoparticules de fer, par défaut désignera celles fournies par GH Choi (Corée du Sud)

MS : Spectrométrie de Masse

PFA : ParaFormAldéhyde

PLL : Poly-L-Lysine

PS : Pénicilline Streptomycine

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique, hotte de classe II

RN : Résorufine

RNO : Résazurine

SM : Spectroscopie Mössbauer

SVF : Sérum de Veau Foetal.

Table des matières

| | | |
|----------|---|----|
| I- | Introduction générale..... | 14 |
| I.1 | Sources de rayonnement | 20 |
| I.1.1 | Sources Mössbauer | 20 |
| I.1.2 | Rayonnement synchrotron..... | 21 |
| I.1.3 | Source de ^{60}Co au CEA..... | 26 |
| II- | Etat de l'art..... | 30 |
| II.1 | Radiothérapie renforcée par Effet photoélectrique | 30 |
| II.1.1 | Interactions photons-matière | 30 |
| II.1.2 | Applications à la radiothérapie proposée par Norman..... | 32 |
| II.1.3 | Hainfeld et les nanoparticules..... | 35 |
| II.2 | Radiothérapie renforcée par Effet Mössbauer | 37 |
| II.2.1 | Spectroscopie Mössbauer | 38 |
| II.2.1.1 | Spectroscopie Mössbauer en laboratoire | 38 |
| II.2.1.2 | Spectroscopie Mössbauer par électrons de conversion | 41 |
| II.2.1.3 | Spectroscopie Mössbauer par rayonnement synchrotron | 43 |
| II.2.1.4 | La diffusion nucléaire inélastique..... | 45 |
| II.2.2 | Radiothérapie Mössbauer | 50 |
| II.2.2.5 | Le travail pionnier de Mills..... | 50 |
| II.2.2.6 | À la recherche d'une confirmation expérimentale | 51 |
| II.3 | Nanoparticules de Fer | 60 |
| II.4 | Dosimétrie in situ et augmentation de dose..... | 63 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| II.4.1 | Etat de l'art de la dosimétrie | 63 |
| II.4.1.1 | Dosimètres relatifs de radioprotection | 64 |
| II.4.1.2 | Chambres d'ionisation..... | 65 |
| II.4.1.3 | Dosimètres solides | 66 |
| II.4.1.4 | Dosimètres liquides..... | 68 |
| II.4.1.5 | Dosimètres liquides fluorescents | 70 |
| II.4.1.6 | La 2'-désoxyadénosine (dAdO)..... | 73 |
| III- | Résultats physiques | 78 |
| III.1 | Nanoparticules | 78 |
| III.1.1 | Caractérisation des nanoparticules..... | 79 |
| III.1.1.1 | Procédé de fabrication..... | 79 |
| III.1.1.2 | Mesure de la taille par DLS | 79 |
| III.1.1.3 | Mesure du potentiel Zêta par DLS | 83 |
| III.2 | Mesures de dosimétrie..... | 84 |
| III.2.1 | Coumarine | 84 |
| III.2.1.4 | Mesure de la fluorescence sans nanoparticules..... | 84 |
| III.2.1.5 | Mesure de la fluorescence avec nanoparticules..... | 91 |
| III.2.2 | Résazurine | 94 |
| III.2.2.6 | Principe | 94 |
| III.2.2.7 | Mesure de l'augmentation de dose en présence de NP de Gd | 96 |
| III.3 | Gafchromic EBT3 | 99 |
| III.4 | Conclusion | 102 |

Introduction générale

| | | |
|----------|---|-----|
| III.5 | Résumé de chapitre..... | 104 |
| IV- | Résultats biologiques..... | 107 |
| IV.1 | Interactions NPFe et cellules tumorales..... | 107 |
| IV.1.1 | Modèle cellulaire tumoral | 107 |
| IV.1.2 | Mesure de la cytotoxicité des nanoparticules..... | 109 |
| IV.1.2.8 | Test MTT..... | 109 |
| IV.1.2.9 | Test Lactate déhydrogenase (LDH) | 111 |
| IV.1.3 | Mesure de l'internalisation de nanoparticules | 112 |
| IV.1.3.1 | Mesure par ICPMS..... | 112 |
| IV.1.4 | Observation de l'internalisation de nanoparticules | 115 |
| IV.1.4.1 | Observation au microscope optique | 115 |
| IV.1.4.2 | Observation par microfluorescence X..... | 117 |
| IV.1.4.3 | Observation par tomographie X..... | 123 |
| IV.2 | Radiothérapie par Photo-activation de NPFe..... | 127 |
| IV.2.1 | Test de clonogénicité et compteur automatique..... | 129 |
| IV.2.1.4 | Test de clonogénicité et facteur d'augmentation de sensibilité..... | 129 |
| IV.2.2 | Compteur automatique de colonies..... | 130 |
| IV.2.3 | Test ATPLite | 132 |
| IV.2.4 | Augmentation de dose en fonction de l'énergie..... | 133 |
| IV.2.5 | Conclusion | 140 |
| IV.3 | Radiothérapie par Effet Mössbauer | 141 |
| IV.3.1 | Spectre Mössbauer de nanoparticules de fer | 141 |

Radiothérapie par photoactivation de nanoparticules et effet Mössbauer

| | | |
|----------|--|-----|
| IV.3.2 | Expérience sur ID18 : NIS et DOS..... | 144 |
| IV.3.3 | Thérapie Mössbauer expérimentale | 148 |
| IV.3.3.5 | Choix de l'expérience | 148 |
| IV.3.3.6 | Dosimétrie et irradiation..... | 149 |
| IV.3.3.7 | Résultats et discussion | 149 |
| IV.4 | Conclusion | 153 |
| IV.5 | Résumé de Chapitre | 154 |
| V- | Matériels et méthodes..... | 157 |
| V.1 | Préparation des nanoparticules | 157 |
| V.2 | Culture cellulaire | 157 |
| V.2.1 | Matériels..... | 157 |
| V.2.2 | Repiquage des cellules | 158 |
| V.2.3 | Congélation des cellules..... | 158 |
| V.2.4 | Décongélation des cellules..... | 159 |
| V.2.5 | Test de clonogénicité..... | 159 |
| V.2.6 | Test ATPLite | 160 |
| V.2.7 | Irradiation des cellules | 160 |
| V.2.7.8 | Sur ID18 | 160 |
| V.2.7.9 | Sur ID17 | 160 |
| V.3 | Préparation d'échantillon..... | 161 |
| V.3.1 | Spectres Mössbauer de nanoparticules de magnétite..... | 161 |
| V.3.2 | Specres Mössbauer de NPFe dans l'agarose | 161 |

Introduction générale

| | | |
|-------|--|-----|
| V.3.3 | ICP-MS | 161 |
| V.3.4 | Films in vivo par microscopie optique..... | 161 |
| V.3.5 | Membranes de Si_3N_4 | 162 |
| VI- | Conclusion générale | 164 |
| VII- | Table des illustrations..... | 166 |
| VIII- | Références Bibliographiques..... | 174 |

CHAPITRE 1

Introduction Générale

I- Introduction générale

La radiothérapie par rayons X fait partie de l'arsenal de traitements déployés contre les tumeurs cérébrales, avec la résection chirurgicale et la chimiothérapie. Bien souvent le traitement consiste à combiner si possible ces trois modes. À titre d'exemple, le traitement standard pour un glioblastome¹ non opérable consiste à combiner chimiothérapie et radiothérapie afin de maximiser les chances de succès, typiquement temozolomide et radiothérapie (Wen and Kesari 2008). Malgré ces traitements la survie à 5 ans est seulement de 10% et n'a que très peu évolué en 25 ans.

Lors d'une radiothérapie, les rayons X traversent les tissus en déposant de l'énergie le long de leur parcours, ionisant le milieu par différents mécanismes et créant des radicaux, causant ainsi des dommages aux cellules, directs et indirects. Le dépôt d'énergie non spécifique, ciblant autant les tissus sains que la tumeur, est un des problèmes majeurs que rencontre cette technique. La compréhension des mécanismes physiques impliqués dans l'interaction rayonnement X – matière a permis de développer de nouvelles stratégies pour diminuer la dose délivrée aux tissus sains.

Augmenter le contraste d'absorption entre la tumeur et les tissus sains serait un bon moyen de rendre la radiothérapie plus efficace, puisque cela permet d'augmenter l'efficacité du traitement et de diminuer les effets secondaires.

L'introduction d'éléments lourds au sein de la tumeur combinée à une irradiation de basse énergie (inférieure à 100 keV, ce qui est bien plus faible que les quelques MeV d'une radiothérapie classique) permet d'augmenter l'absorption des rayons X, principalement par effet photoélectrique, et donc le dépôt de dose locale. L'idée de cette thérapie appelée parfois PAT (Photo-Activation Therapy) a été initialement mise en évidence fortuitement par Adams et Norman en 1978 en observant les

¹ Tumeur gliale, issue du tissu de soutien du cerveau.

aberrations chromosomiques lors d'angiocardiographies (Forrest H. Adams et al. 1978), puis rapidement mise à profit par Santos Mello et Norman (Santos Mello et al. 1983). La possibilité d'utiliser les agents de contraste comme agents radiosensibilisants a été étudiée dans notre équipe sur la ligne médicale du synchrotron de Grenoble depuis de nombreuses années (J. F. Adam et al. 2003),(Edouard et al. 2010) donnant même lieu depuis 2012 à des essais cliniques combinant injection d'un agent de contraste iodé par voie systémique et irradiation monochromatique avec le faisceau synchrotron : la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron (SSRT). Les Photoélectrons et les électrons Auger produits lors de la désexcitation du cortège électronique des atomes ionisés par les rayons X ont une faible énergie. Ils déposent cette énergie sur un trajet très court, ce qui cause des dépôts de dose importants à très faible distance des atomes irradiés. Hainfeld a démontré l'efficacité des nanoparticules comme radiosensibilisants (Hainfeld, Slatkin, and Smilowitz 2004), soulevant l'intérêt de la communauté scientifique.

Les nanoparticules induisent une modification importante de la microdosimétrie, c'est-à-dire la distribution de dose à l'échelle du micromètre, et peuvent augmenter significativement l'efficacité d'une irradiation. Des études théoriques ont montré l'intérêt des nanoparticules pour l'augmentation du dépôt de dose en radiothérapie (Leung et al. 2011). D'autres effets physiques peuvent donner lieu à l'émission d'électrons localisés autour d'atomes, c'est le cas en particulier de l'effet Mössbauer.

L'absorption nucléaire résonante et sans recul de rayons gamma a été découverte en 1958 par Rudolf Mössbauer lors de son doctorat à Munich, à la Technische Hochschule München (THM). La science lui a donné son nom, l'effet Mössbauer, plus ou moins contre sa volonté (Mössbauer 1958). Cette découverte lui a permis d'obtenir le prix Nobel de Physique en 1961 ("*Rudolf Mössbauer - Nobel Lecture: Recoilless Nuclear Resonance Absorption of Gamma Radiation*" 2015) « *pour ses recherches concernant l'absorption résonante de rayons gamma et sa découverte de l'effet qui porte son nom* ». Il a ensuite effectué un post-doctorat à Caltech, avant d'y devenir Professeur de Physique, puis de rentrer à Munich en 1964. En 1972, il est devenu pour 5 ans le Directeur de l'Institut Laue-Langevin à Grenoble, qui abrite une source de neutrons dédiée à la recherche. Partant de l'idée que l'absorption

résonante déjà observée dans le cadre de la fluorescence, où la lumière émise a la même énergie que la lumière absorbée, pourrait se retrouver en physique nucléaire avec l'émission de rayons gamma, il a tenté de démontrer l'existence de cet effet nucléaire. Les atomes possédant une énergie de désexcitation extrêmement proche de leur énergie d'excitation sont nommés « isotopes Mössbauer ». Avec ces isotopes il est possible d'obtenir un chevauchement de l'excitation et de l'absorption lorsqu'on minimise la perte d'énergie par recul de l'atome, et donc une résonance qui amplifie le phénomène d'absorption.

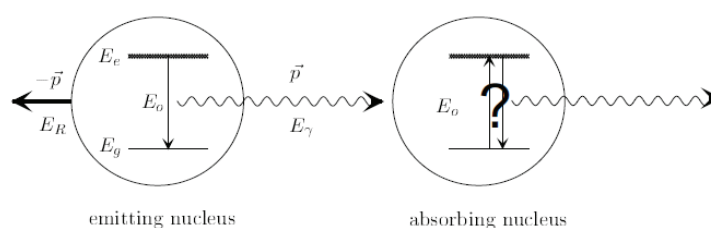


Figure I-1 : Principe de l'absorption résonante. L'énergie E_o émise par un atome peut exciter l'atome voisin si l'énergie de recul E_R est suffisamment faible et si l'énergie d'excitation est très proche de l'énergie d'émission.

L'atome émetteur recule avec l'énergie E_R telle que :

$$E_R = \frac{p^2}{2m} = \frac{E_\gamma^2}{2mc^2} \quad (1)$$

Avec m la masse du noyau, c la vitesse de la lumière et E_γ l'énergie de l'état excité.

Afin de minimiser cette énergie de recul E_R on peut travailler avec des températures cryogéniques ou bien lier l'atome à une matrice cristalline, m devenant la masse du cristal complet, ce qui rend E_R négligeable.

Grâce à l'effet Doppler, un mouvement de l'ordre du mm/s provoque un déplacement de l'énergie émise par la désexcitation d'un atome de l'ordre du nanoélectronVolt (neV), ce qui a pu très rapidement être mis à profit dans le cadre de la spectroscopie Mössbauer (cf. § II.2.1, p. 38).

L'effet Mössbauer a permis d'étudier spécifiquement l'environnement électronique des isotopes Mössbauer. 86 isotopes Mössbauer manifestent 106 transitions Mössbauer, représentant 45 éléments différents. Le Gadolinium détient le record puisqu'il possède 6 isotopes manifestant 8 transitions. Cependant de nombreux isotopes nécessitent des températures cryogéniques avant de manifester l'effet Mössbauer, et tous ne possèdent pas une intensité suffisante pour être observable. Un isotope « Mössbauer » possède une certaine probabilité d'absorber un rayon gamma sans transmettre d'énergie de recul à l'atome cible (le facteur de Lamb-Mössbauer (f_{LM}), qui s'exprime ainsi :

$$f_{LM} = e^{-\left(\frac{E_\gamma}{\hbar c}\right)^2 \langle x^2 \rangle} \quad (2)$$

Avec x le déplacement moyen de l'atome cible et \hbar la constante de Planck réduite.

Il transmet son énergie de recul au réseau cristallin environnant. L'atome se désexcite alors de deux manières : soit en émettant un rayon gamma qui pourra exciter un atome voisin (dans 20% des cas pour le ^{57}Fe), soit en émettant un électron de conversion qui créera une vacance électronique des couches inférieures (dans 80% des cas, car le coefficient de conversion interne α_T du Fer 57 = $\frac{\text{Nombre électrons de conversion}}{\text{Nombre photons } \gamma} = 8,17$).

Cette vacance sera comblée par des désexcitations en chaîne créant une cascade d'électrons Auger (Figure I-2). Ce sont ces électrons de conversion et ces électrons Auger qui sont d'un intérêt particulier dans le cadre de cette thèse.

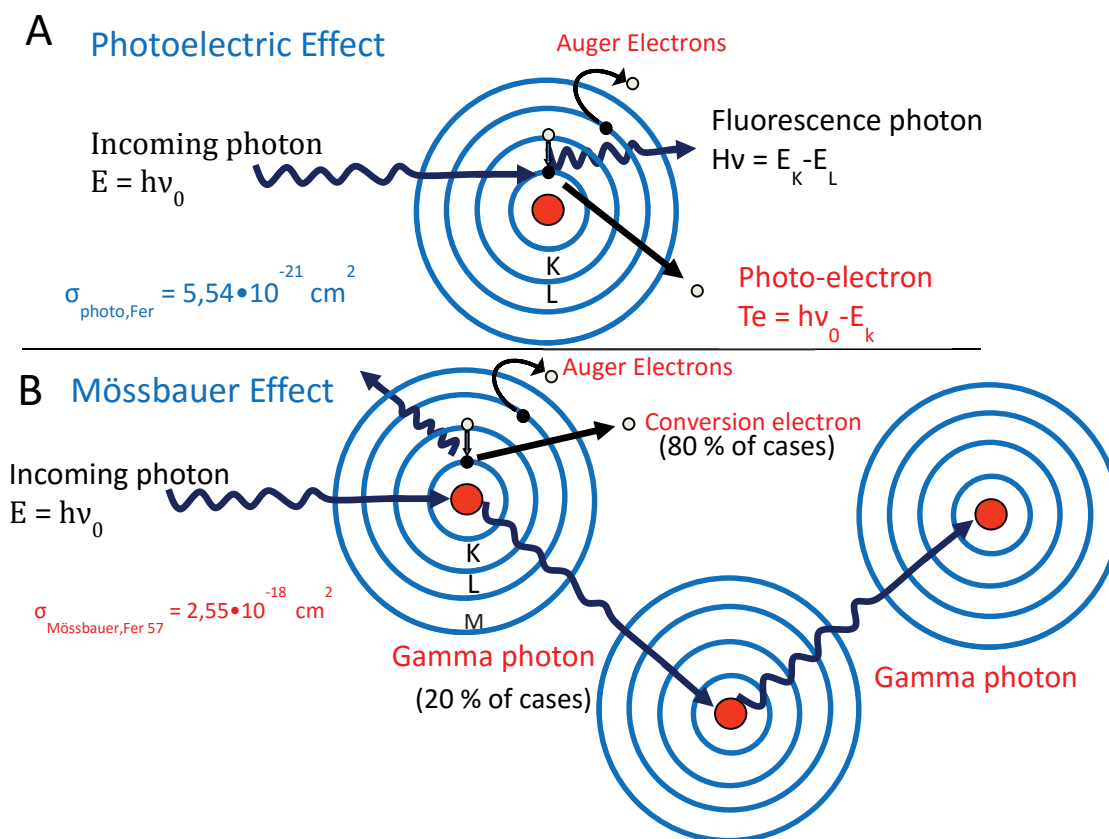


Figure I-2 : Détail de l'interaction photoélectrique (A) et Mössbauer (B) sur un atome de ^{57}Fe . Le photon incident excite le cortège électronique (A) ou le noyau (B), et provoque l'émission d'un photo-électron (A) ou d'un électron de conversion (B). La vacance électronique cause ensuite une cascade d'électrons Auger ainsi que l'émission de photons de fluorescence.

L'isotope Mössbauer le plus communément utilisé est le fer 57 (^{57}Fe), pour son haut f_{LM} , son coefficient de conversion interne α_T élevé, sa présence naturelle dans les cellules sous forme de ferritine, parfois d'hématine ou de fer libre, et la possibilité d'observer l'effet MB à température ambiante. Son énergie d'excitation (14.4 keV) est suffisamment faible pour que le facteur de Lamb-Mössbauer soit important à température ambiante.

Mills *et al* (Mills et al. 1988) a proposé d'utiliser le ^{57}Fe lié à une molécule capable de s'attacher à l'ADN afin que les électrons de conversion et les électrons Auger de fort TEL (transfert d'énergie

Linéique) causent des dommages à l'ADN susceptibles de tuer les cellules tumorales. La section efficace de l'effet Mössbauer est très importante et permettrait d'augmenter l'efficacité d'une radiothérapie et de diminuer la dose aux tissus sains.

W. Sturhahn (Sturhahn and Kohn 1999) mentionne la masse atomique minimale nécessaire pour observer l'effet Mössbauer avec le fer 57 ($2,4 \times 10^7$ unités de masse atomique, soit environ 10^6 atomes de fer), dans le cas d'atomes de fer disposés en mini-couches sur un matériau et non pas dans une configuration sphérique. Un calcul simple, inspiré de la publication de Gu et al (Gu et al. 2009) a permis de supputer la taille minimale des nanoparticules pour satisfaire la condition de « rigidité », indispensable pour observer l'effet Mössbauer, en extrapolant bien au-delà de ses critères d'application les conditions de Sturhahn valables pour une surface plane à une géométrie sphérique :

$$D = 2 \times \sqrt[3]{\frac{n \times F}{\frac{4}{3}\pi \times 2000}} \quad (3)$$

Avec D : diamètre de la nanoparticule (en nm), n : nombre d'atomes de fer, F : volume d'une cellule du réseau cristallin (en \AA^3).

On obtient $D = 27,27$ nm. En théorie, l'effet Mössbauer pourrait donc être observé sur une nanoparticule de fer de 27 nm. En pratique l'effet Mössbauer est essentiellement utilisé pour caractériser des nanoparticules sous forme de poudre en température cryogénique et également à température ambiante, mais jamais en suspension.

Il est donc intéressant d'évaluer s'il serait possible de développer un nouveau traitement basé sur l'effet Mössbauer induit sur des nanoparticules de fer internalisées par des cellules, en prenant en compte les limitations dues à la température, l'énergie, la source, etc. C'est le sujet d'une partie des travaux effectués pendant cette thèse.

Pendant ces travaux plusieurs sources d'irradiation ont été utilisées pour irradier les nanoparticules de fer (synchrotron, générateur de rayons X et irradiateur Gamma). Elles sont présentées dans le paragraphe suivant.

I.1 Sources de rayonnement

I.1.1 Sources Mössbauer

L'environnement grenoblois est particulièrement adapté pour les études Mössbauer puisqu'il concentre sur sa presqu'île scientifique plusieurs laboratoires actifs dans le domaine de la spectroscopie MB. Autant au niveau du CEA qu'au synchrotron, nous avons pu mener des discussions approfondies avec des scientifiques spécialistes de cette spectroscopie.

Tout d'abord, l'équipe Physicochimie des Métaux en Biologie du Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux de l'IRTSV au CEA, dirigée par Jean-Marc Latour, possède 4 spectromètres MB. Ces sources MB sont destinées principalement à étudier le fer, et sont donc composées d'une matrice de Fer/Rhodium. Certaines de ces sources possèdent un cryostat leur permettant de travailler à des températures très basses, typiquement 4K. Spécialisée dans l'étude des métalloprotéines, les échantillons typiques sont des poudres et des échantillons déshydratés, et l'équipe ne travaille pas sur des échantillons biologiques vivants [(Clémancey *et al.* 2014),(Holmes-Hampton *et al.* 2012)].

D'autre part la ligne ID18 de l'ESRF, dont les responsables sont Rudolf Rüffer et Alexander Chumakov, est une ligne dédiée à l'effet MB et ses applications avec un rayonnement synchrotron. Dans ce cadre, la ligne propose à ses utilisateurs de nombreuses techniques Mössbauer spécifiques au synchrotron telles que la Diffusion Nucléaire Inélastique présentée précédemment (A. Chumakov and Rüffer 1998), le Nuclear Lighthouse effect (Roth *et al.* 2005) ou bien la Diffusion Nucléaire Résonante (Potapkin *et al.* 2012).

I.1.2 Rayonnement synchrotron

L'European Synchrotron Research Facility de Grenoble délivre un faisceau intense de rayons X. C'est un Synchrotron de troisième génération qui maintient dans son anneau de stockage des électrons de 6 GeV. La caractéristique principale d'un synchrotron est sa brillance qui peut atteindre 10^{21} photons/sec/mrad/[0.1% bande passante] à Grenoble.

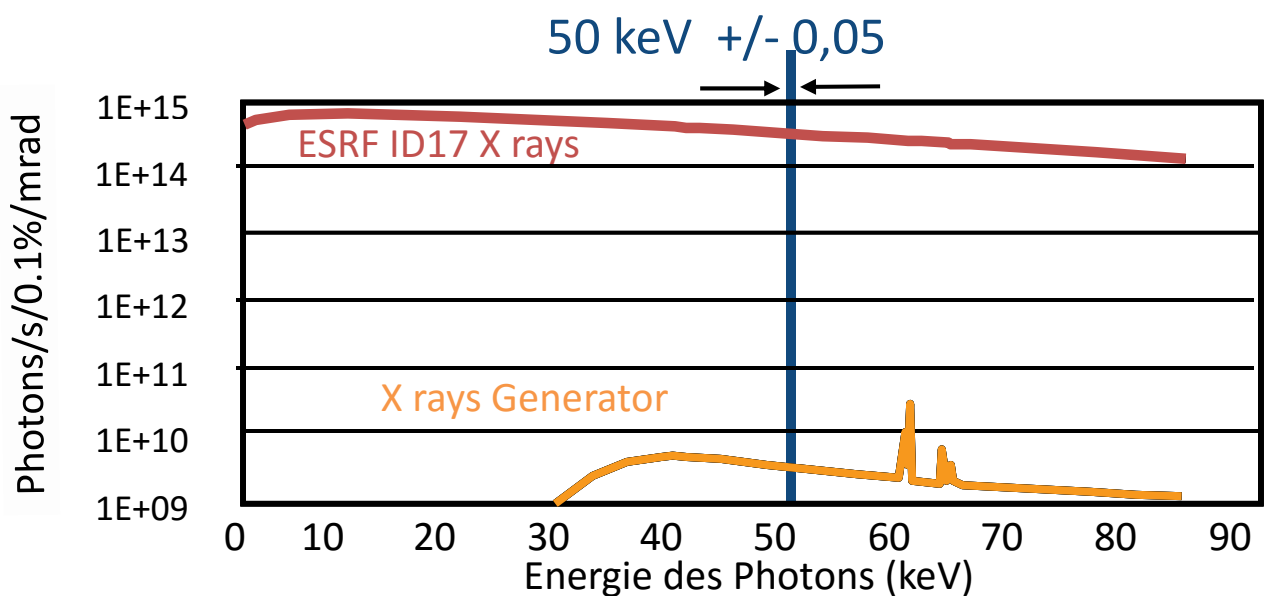


Figure I-3 : Comparaison de la fluence d'un générateur de rayons X médical conventionnel et de la ligne ID17 de l'ESRF. La fluence très importante permet de sélectionner un rayonnement monochromatique (*i.e.* 50 keV) tout en conservant un flux de photons important, typiquement de l'ordre de 10^{11} photons/sec.

Cet institut de recherche pluridisciplinaire se penche sur l'étude de la matière par rayons X dans des domaines variés comme les sciences des matériaux, l'imagerie médicale, la chimie, la photosynthèse, la paléanthropologie... Il peut être décomposé en plusieurs éléments qui sont visibles sur la figure suivante : le Linac, le Booster et l'anneau de stockage (Figure I-4).

Introduction générale

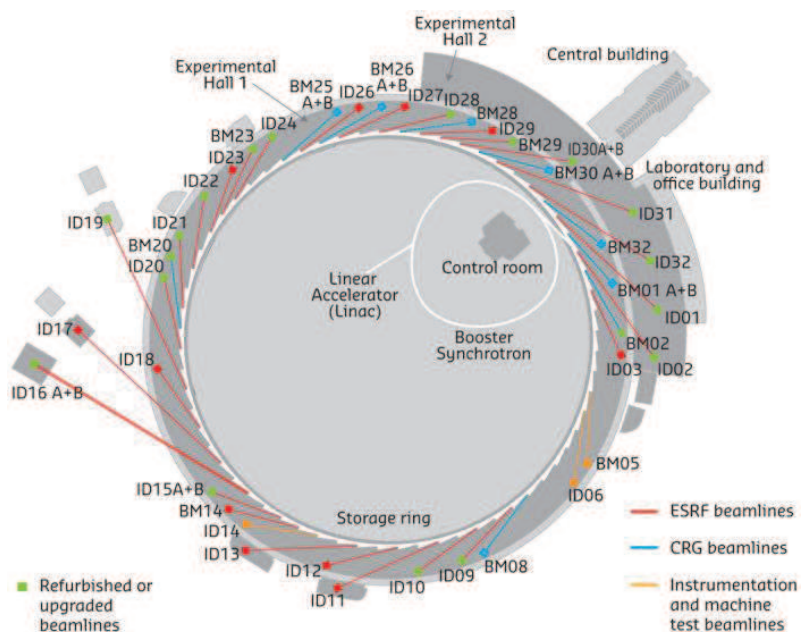


Figure I-4 : Les électrons sont créés dans le Linac et accélérés à 200 MeV puis accélérés graduellement jusqu'à 6 GeV dans le Booster synchrotron, et enfin injectés dans l'anneau de stockage de 844m de circonférence. À chaque déviation par des aimants de courbure ou par des wiglers, des rayons X sont émis tangentiellement à la trajectoire et sont guidés dans la ligne de lumière correspondante.

Au sein de l'anneau de stockage les électrons sont maintenus à une vitesse constante grâce à des cavités accélératrices, et l'émission de rayons X est favorisée par des Wigglers (Figure I-5) qui impriment une trajectoire oscillante grâce à des aimants alternés et des Onduleurs dont l'alternance des aimants produit un phénomène d'interférence pour obtenir la cohérence des rayons X.

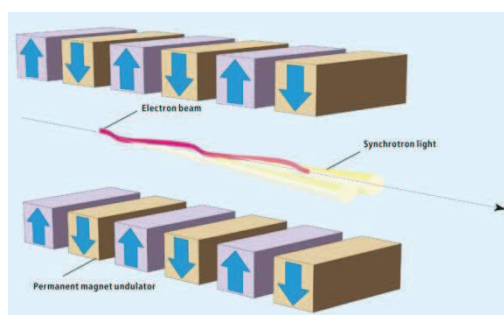


Figure I-5 : L'alternance des aimants permet de créer des rayons X dans une section droite de l'anneau de stockage et d'augmenter la création de rayons X.

Après cette phase de production des électrons, ils sont dirigés dans une ligne de lumière que l'on peut décomposer en 3 parties : la cabine optique, la cabine expérimentale et la salle de contrôle (Figure I-6).

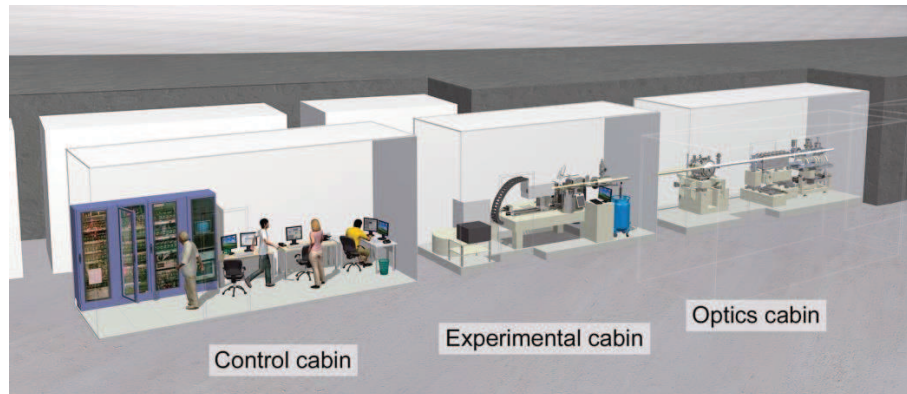


Figure I-6 : Les cabines successives forment une ligne de lumière et permettent de réaliser une expérience avec les rayons X de la source synchrotron, depuis la calibration du faisceau jusqu'à l'analyse des données obtenues sur l'échantillon.

La cabine optique contient les appareils destinés à calibrer le faisceau avant son utilisation dans la cabine expérimentale. Le faisceau est focalisé ou simplement collimaté par des systèmes optiques puis son énergie est calibrée par un monochromateur. La cabine expérimentale contient les porte-échantillons et les détecteurs permettant de mener à bien les expériences.

Durant ces travaux de thèse des expériences ont été effectuées sur plusieurs lignes de lumière possédant des caractéristiques très différentes :

- ID17 est une ligne médicale dédiée au développement d'imagerie et de traitements de radiothérapie innovants. Pour cela elle possède deux cabines expérimentales le long du faisceau, placées respectivement à 40 et 150 m de la source. La plus proche est utilisée pour des applications de radiothérapie par micro-faisceaux dans lequel le faisceau est fractionné spatialement pour permettre le développement d'une thérapie dite par irradiation microfaisceaux qui minimise les effets indésirables. La seconde cabine est située à 150m de la source et sert pour des applications de radiothérapie et d'imagerie médicale avec un faisceau de 15cm par 3mm (Figure I-8).

Introduction générale

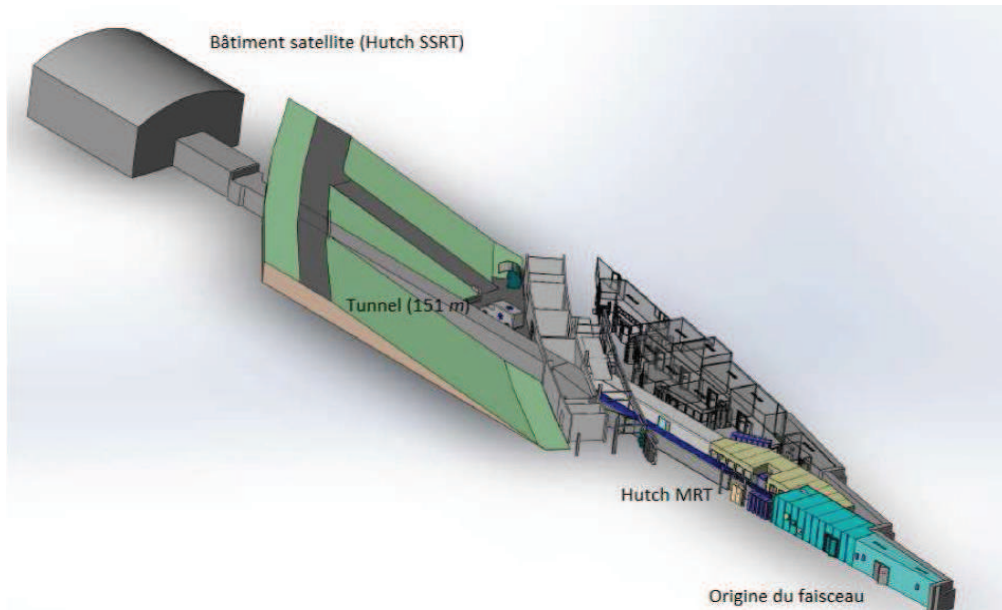


Figure I-7 : Disposition de la ligne médicale ID17. La cabine expérimentale se trouve en dehors de l'anneau central, dans un bâtiment satellite.

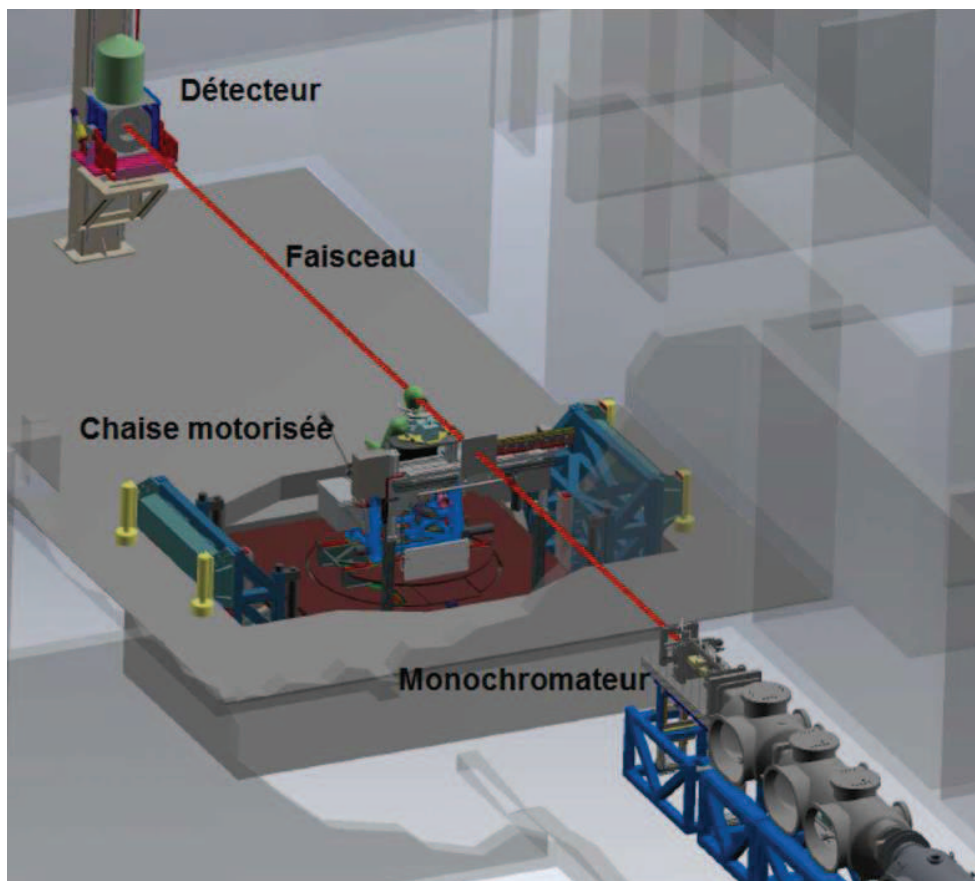


Figure I-8 : Set-up expérimental de radiothérapie clinique et d'imagerie médicale sur ID17. Le faisceau blanc tape sur un cristal monochromateur qui sélectionne une énergie précise ($\Delta E/E = 10^{-3}$). Le patient est positionné sur une chaise motorisée afin d'assurer les rotations et translations nécessaires au traitement.

Radiothérapie par photoactivation de nanoparticules et effet Mössbauer

- ID18 est une ligne dédiée aux applications synchrotron de l'effet Mössbauer avec un faisceau de 0,5mm par 1,2mm.
- ID16 est une ligne de nano-analyse ouverte début 2014 partagée en deux cabines expérimentales qui peut effectuer aussi bien des études de micro fluorescence, d'absorption ou bien de diffraction des Rayons X pour ID16B, que des études de nano-imagerie avec un faisceau de 40x40nm sur ID16A.

La combinaison de l'effet Mössbauer, des nanoparticules et du synchrotron a formé une base de réflexion sur laquelle s'est appuyée notre recherche de traitements de radiothérapie innovants.

Pour autant le synchrotron n'est pas la seule source de rayonnement disponible au laboratoire, comme le montre la partie suivante.

I.1.3 Source de ^{60}Co au CEA

Le bâtiment R au CEA de Grenoble abrite la fondation ARC-Nucléart dédiée à la préservation du patrimoine. Ce bâtiment contient plusieurs systèmes d'irradiation au ^{60}Co . Chacun d'eux est constitué d'un système de fixation des sources et d'un conteneur étanche qui vient se positionner de manière reproductible à proximité de ces sources. Le premier dispositif, utilisé principalement pour la conservation du patrimoine, est illustré par la Figure I-9 :

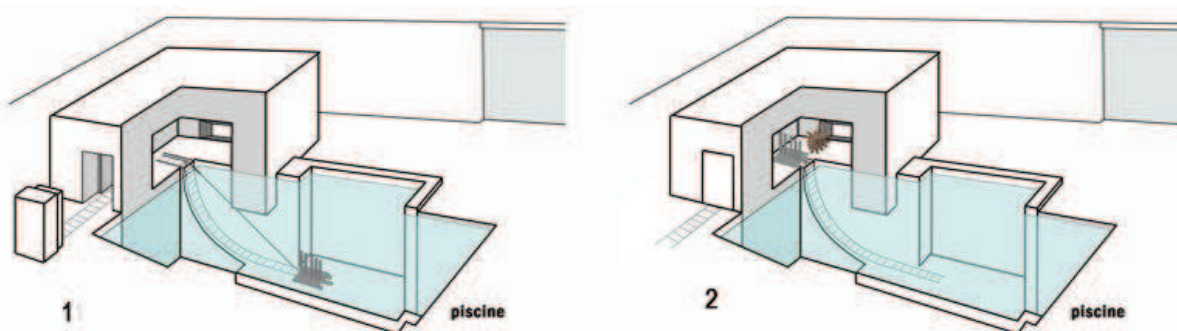


Figure I-9 : Dispositif d'irradiation d'ARC-Nucléart. Position 1 : Hors utilisation. Les sources sont stockées au fond de la piscine. Position 2 : En utilisation. Les sources sont introduites dans la cellule d'irradiation via les rails de transfert. La gamme de débit de dose dans cette configuration est d'environ 100 Gy/h à 2 kGy/h.

Le second dispositif «Anémone», est constitué d'un conteneur parallélépipédique manœuvré au bout d'une potence électrique et vient se poser par un système de guidage au-dessus d'un minimum de 3 sources fixées horizontalement en fond de piscine. Il est aujourd'hui dédié aux expérimentateurs biologistes et biochimistes du CEA.

Le ^{60}Co est un atome instable dont la désintégration *bêta* est à l'origine de deux photons gamma de 1,17 MeV et 1,33 MeV, pour une énergie moyenne de 1,25 MeV. Le débit de dose est calculé à partir de l'activité de la source lors de son installation. De plus une dosimétrie effectuée régulièrement permet de vérifier la dose délivrée et donc le débit de dose.

La Figure I-10 donne la valeur approximative du débit de dose qui décroît selon la décroissance exponentielle de la source ($T=5,27$ ans pour le ^{60}Co), telle que calculée selon les formules suivantes :

$$A = A_0 \cdot \exp\left(-\frac{\ln(2) \cdot (t - t_0)}{5,27 \text{ ans}}\right) \quad (4)$$

$$DdD = DdD_0 \cdot \exp\left(-\frac{\ln(2) \cdot (t - t_0)}{5,27 \text{ ans}}\right) \quad (5)$$

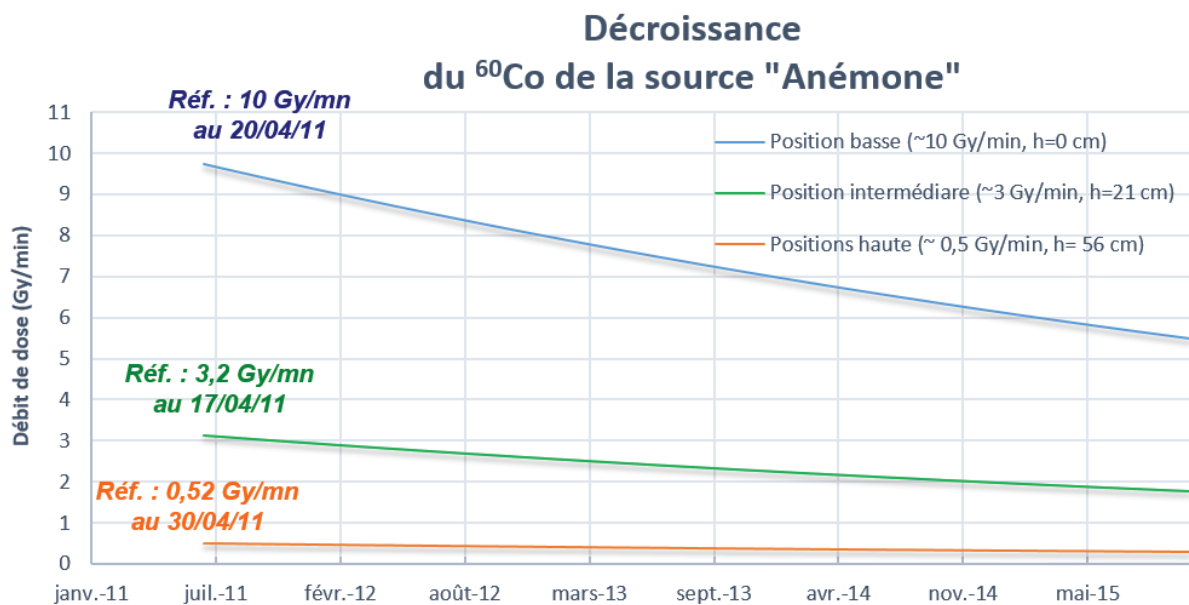


Figure I-10 : Décroissance radioactive de la source de ^{60}Co du dispositif "Anémone" au CEA. 3 positions permettent de varier le débit de dose d'un facteur 20.

Le choix de combinaison entre la position du conteneur, la hauteur de l'échantillon dans le conteneur et la présence ou non d'une feuille de plomb au fond du conteneur permet de décrire une gamme de débits de dose variant du simple au décuple.

Introduction générale

Après cette introduction générale, le second chapitre de cette thèse présentera l'état de l'art des différents domaines scientifiques abordés dans ce manuscrit : la radiothérapie renforcée par effet photoélectrique ou bien Mössbauer , les nanoparticules de fer et la dosimétrie *in situ*. Le chapitre 3 s'intéressera aux résultats de caractérisation des NPF_e et de dosimétrie. L'interaction des nanoparticules utilisées dans ces travaux de thèse avec des cellules tumorales, leur toxicité ainsi que leur internalisation seront abordées dans le chapitre 4, avec les résultats des études cellulaires de radiothérapie photoélectrique et Mössbauer. Enfin le chapitre 5 concentrera l'ensemble des matériels et méthodes utilisées pendant ces travaux.

A la fin de chaque chapitre un résumé présentera les principaux résultats obtenus.

CHAPITRE 2

Etat de l'art

II- *Etat de l'art*

Nous présentons dans ce chapitre, l'historique de la radiothérapie combinant rayons X et éléments lourds puis celui de la radiothérapie par effet Mössbauer, les applications variables des nanoparticules de fer et enfin nous verrons les différentes solutions existantes pour la dosimétrie en radiothérapie.

II.1 *Radiothérapie renforcée par Effet photoélectrique*

Pour renforcer la radiothérapie, les interactions des rayons X avec la matière ont été analysées afin de déterminer la meilleure solution pour renforcer le dépôt de dose.

II.1.1 *Interactions photons-matière*

Les interactions entre les photons et la matière cible sont de plusieurs natures, les principales interactions sont l'effet Compton, la production de paires et l'effet photoélectrique (Seibert and Boone 2005).

- Très succinctement, lors de *l'effet Compton*, le photon incident éjecte un électron libre ou faiblement lié, dont l'énergie de liaison est négligeable devant celle du photon. Le photon est dévié de sa trajectoire.

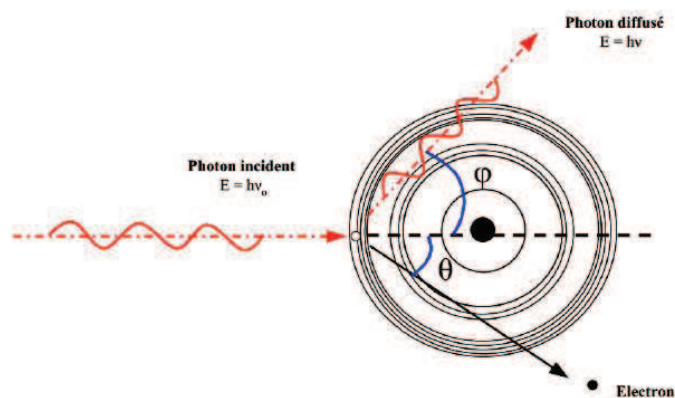


Figure II-1 : Effet Compton.

L'énergie du photon diffusé (E) varie avec l'angle θ selon la formule :

$$E = \frac{E_0}{1 + \frac{E_0}{m_e c^2} (1 - \cos \theta)} \quad (1)$$

Avec E_0 : l'énergie du photon incident et $m_e c^2 = 0.511 \text{ MeV}$.

- Dans certains cas, le champ électrique intense qui entoure le noyau peut provoquer la transformation d'un photon en un électron et un positon. Ce phénomène est connu sous le nom de *production de paires*.

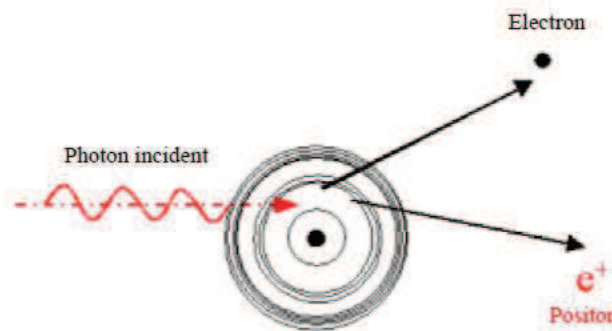


Figure II-2 : Effet de production de paires.

- Dans le cas de *l'effet photoélectrique*, le photon d'énergie incidente $h\nu$ interagit avec un électron d'une couche électronique interne de l'atome cible. L'énergie du photon est entièrement absorbée et l'électron est éjecté avec une énergie cinétique (E_{e^-}) équivalente à la différence entre l'énergie incidente du photon et l'énergie de liaison de l'électron (E_l).

$$E_{e^-} = h\nu - E_l \quad (2)$$

La prévalence de ces interactions dépend de l'énergie de photons et de la nature de la matière

(Figure II-3).

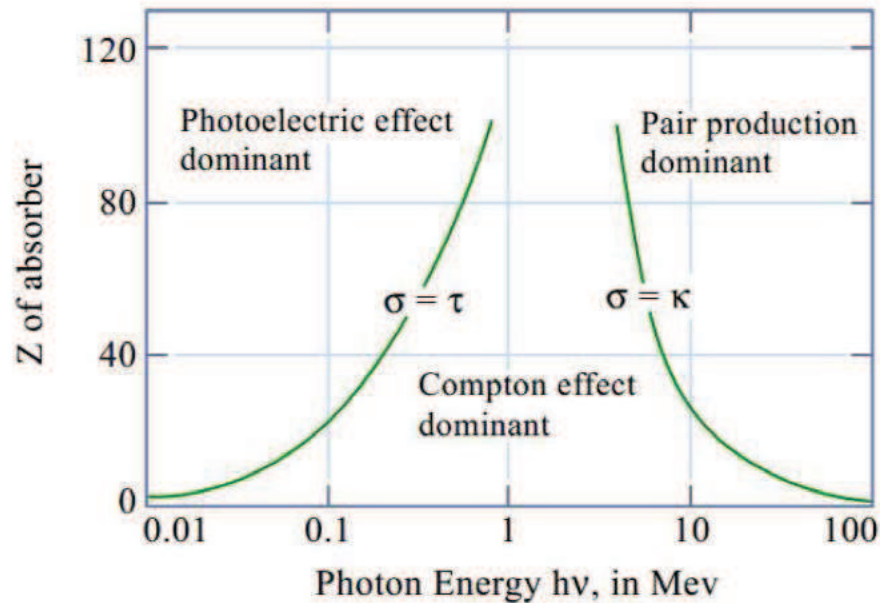


Figure II-3 : Zones de prédominance des interactions en fonction de l'énergie des photons et du numéro atomique de l'élément. Les lignes d'isoprobabilités d'apparition des effets sont représentées. Figure adaptée de (Abdel-Rahman and Podgorsak 2010).

On peut noter que l'effet photoélectrique est prédominant pour des atomes de numéro atomique élevé et pour des rayonnements de basses énergies. Cet évènement physique constitue le principe même de la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron.

II.1.2 Applications à la radiothérapie proposée par Norman

Des observations et études ont montré que l'utilisation d'agents de contraste iodés pendant un examen radiologique (utilisation de rayons X de basse énergie) peut induire des effets délétères sur

les cellules du sang (lymphocytes²) (F. H. Adams et al. 1977 ;Cochran, Khodadoust, and Norman 1980; Cochran and Norman 1982; Norman, Adams, and Riley 1978).

L'angiographie est une technique d'imagerie médicale dédiée à l'étude des vaisseaux sanguins qui ne sont pas visibles sur des radiographies standards. C'est un examen basé sur l'injection d'un produit de contraste lors d'une imagerie par rayons X. En 1978 Norman *et al.* (Norman, Adams, and Riley 1978) ont présenté des résultats montrant chez 9 patients une augmentation des aberrations chromosomiques après une angiographie cardiaque (dose d'exposition estimée à 10-30 cGy et dose moyenne délivrée aux lymphocytes < 2 cGy, avec un tube-X de 65 et 75 kVp, 1,4 et 1,6 mA). Deux mécanismes contribuent à cette observation :

- Une augmentation de la dose absorbée par les cellules exposées en présence d'agent de contraste iodé (indépendamment de la composition chimique de l'agent de contraste utilisé)
- L'agent de contraste produit intrinsèquement des lésions même sans irradiation.

Les données n'avaient cependant pas permis d'estimer quelle fraction des dommages est due à la toxicité intrinsèque du produit de contraste, à la dose en rayons X ou encore à une synergie des deux.

D'autres études (Callisen, Norman, and Adams 1979),(Santos Mello et al. 1983),(Dawson et al. 1988) ont aussi montré que l'effet est observé pour des rayons X de basse énergie mais pas pour des hautes énergies, car il résulte de l'augmentation des sections efficaces photoélectriques.

² Lymphocytes : type de globules blancs.

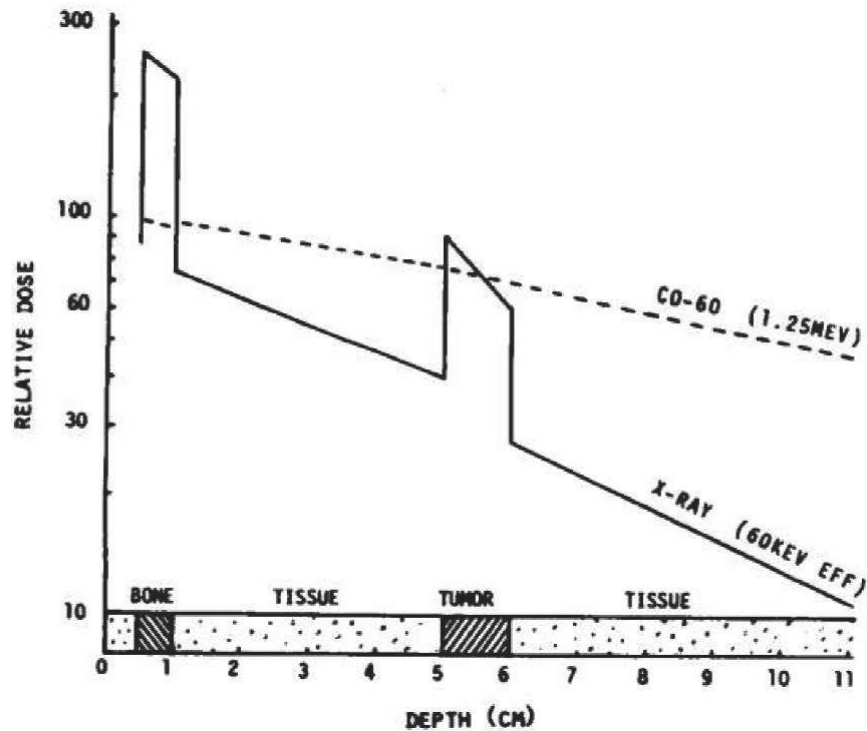


Figure II-4 : Rendement en profondeur dans un cerveau obtenu pour une irradiation à 60 keV contenant une tumeur perfusée avec 4 mg/ml et comparaison avec le rendement en profondeur obtenu à 1,25 MeV, d'après Mello *et al.* (Santos Mello et al. 1983)

Mello *et al.* Proposent en 1983 d'explorer le potentiel de l'augmentation de dose déposée dans les tissus perfusés en iode lors de l'irradiation pour la radiothérapie (Santos Mello et al. 1983). Les problématiques rencontrées sont :

- dépendance de l'augmentation de dose vis-à-vis de la concentration en iode et qualité du faisceau utilisé,
- forte absorption de l'os,
- la concentration en iode dans la tumeur pendant le traitement doit être suffisante en quantité et ce pendant toute la durée de l'irradiation. De ce fait, l'injection d'agent de contraste par voie directe est proposée.

Des études précliniques (Santos Mello et al. 1983; Iwamoto et al. 1987; Iwamoto et al. 1990; Iwamoto et al. 1993; Norman et al. 1997) puis cliniques (Rose et al. 1999) ont confirmé l'intérêt de cette technique pour augmenter la dose déposée dans la tumeur .

A l'ESRF, les études de l'augmentation du dépôt de dose par effet photoélectrique s'appuient sur le faisceau monochromatique délivré par la ligne médicale ID17, qui a permis d'effectuer des études *in vitro* (Corde et al. 2004) puis précliniques avec des agents de contraste iodés sur le rat [(J. F. Adam et al. 2003),(J.-F. Adam et al. 2006)] ou bien avec des agents platinés [(Biston et al. 2004),(Rousseau et al. 2010)]. Des simulations Monte-Carlo (Boudou et al. 2005) ont préparé la transition vers les études cliniques (Edouard et al. 2010; Prezado et al. 2011; Obeid et al. 2014).

Aujourd'hui, la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron (SSRT) fait l'objet d'un essai clinique de phase I et II chez l'homme, à l'ESRF. L'étude concerne le traitement de petites métastases cérébrales. Une injection d'iode (sous forme d'Ioméron®) intraveineuse est réalisée en amont de la radiothérapie synchrotron, réalisée avec un faisceau de 80 keV. Une seule fraction est pour le moment délivrée au synchrotron, le reste de la thérapie étant assurée par le CHU de Grenoble dans le cadre d'un traitement conventionnel. Le premier but de l'essai clinique est de montrer la faisabilité de la technique. Depuis le début de l'essai (en juin 2012), huit patients ont bénéficié du traitement.

II.1.3 Hainfeld et les nanoparticules

Hainfeld en 2004 a ouvert la boîte de Pandore en publiant un article sur l'utilisation de nanoparticules d'or pour la photo-activation chez la souris de tumeurs sous-cutanées (Hainfeld, Slatkin, and Smilowitz 2004), puis plus récemment de tumeurs du cerveau (Hainfeld et al. 2013). Dans son étude de 2004, Hainfeld utilise des nanoparticules d'or (AuNPs) qu'il injecte par voie veineuse pour augmenter l'absorption des rayons X de basse énergie (250 kVp) spécifiquement dans la tumeur. Le modèle utilisé est un modèle sous-cutané (cellules EMT-6, carcinome mammaire) implanté chez la souris. Les nanoparticules ciblent de manière passive la tumeur, par effet EPR. La vascularisation plus

importante de la tumeur et la perméabilité de ses vaisseaux permettent aux NPs de s'y concentrer.

L'injection des NPs avant l'irradiation (2- Gy, 1 fraction – 250 kVp) augmente la survie des souris, avec

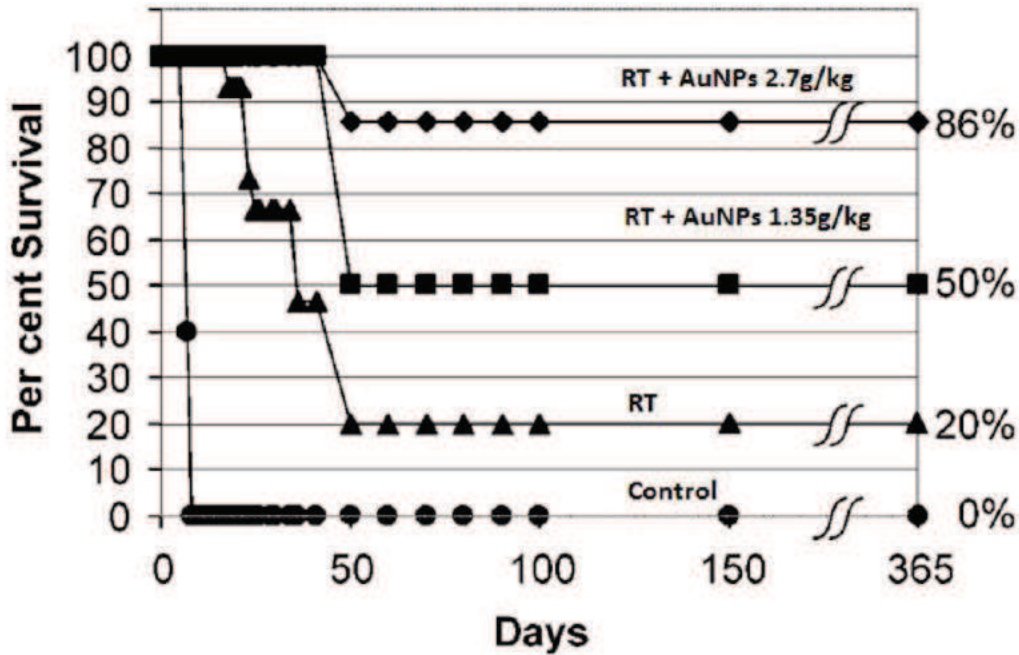


Figure II-5 : Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie de souris porteuses d'une tumeur sous-cutanée et traitées par une injection *i.v.* de NPs, suivie d'une radiothérapie Externe. Hainfeld 2004, cell. EMT-6, RT : RX 250 kVp, 26 Gy, AuNPs 1.9 nm. (Hainfeld, Slatkin, and Smilowitz 2004)

un effet proportionnel à la concentration d'or injectée. Une injection de 2,7 g/kg conduit à 86% de survie à long terme (≥ 1 an).

Une étude plus récente (Kim et al. 2012) illustre l'intérêt des nanoparticules métalliques en combinaison à la protonthérapie pour l'émission d'électrons secondaires de courte portée, appelée le « Coulomb-nanoradiator (CNR) effect ». Les cellules tumorales CT26 sont une fois encore injectées de manière sous-cutanée sur la patte de souris. Les auteurs montrent une efficacité du traitement combiné qui dépend de la concentration des nanoparticules métalliques injectées et de la dose délivrée. Une injection de 300 mg/kg de AuNP ou NPFe associée à une irradiation (21 Gy dans le plateau et 31 Gy dans le pic de Bragg) conduit à la guérison de tous les animaux.

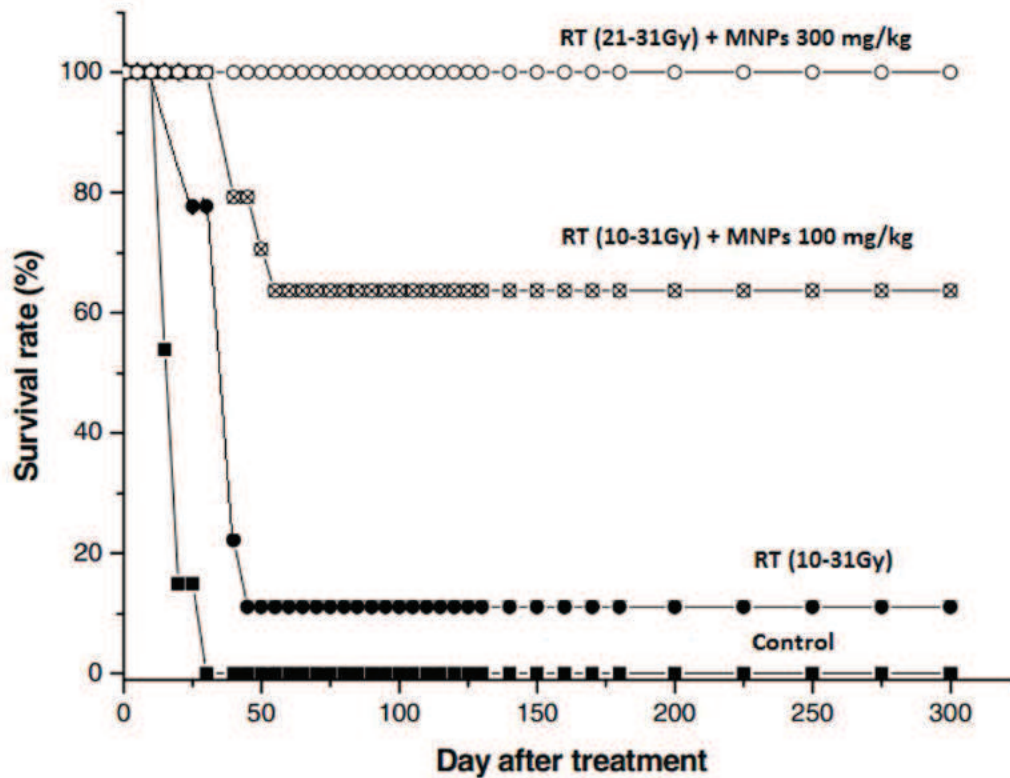


Figure II-6 : Courbe de Kaplan-Meier de souris. Tumeur sous-cutanée CT26, injection *i.v.* de NPFe et protonthérapie à 40 MeV. (Kim et al. 2012)

L'effet photoélectrique n'est pas le seul moyen d'obtenir l'émission d'électrons Auger. D'autres interactions physiques permettent de créer des vacances électroniques qui conduisent à une cascade de désexcitations Auger et à l'émission d'un spectre d'électrons de haut LET qui déposent de l'énergie dans la tumeur, et en particulier, l'effet Mössbauer.

II.2 Radiothérapie renforcée par Effet Mössbauer

Peu connu, l'effet Mössbauer présente sous certaines conditions une opportunité intéressante d'augmentation des effets d'une radiothérapie, mais son utilisation principale est en spectroscopie. Afin de comprendre ses spécificités, un peu de théorie est nécessaire.

L'introduction ayant présenté rapidement l'origine physique de l'effet Mössbauer (MB), nous allons dans cette partie nous intéresser à son application principale depuis sa découverte, la Spectroscopie Mössbauer (SM), et détailler quelques aspects théoriques et pratiques de cette application. Nous parlerons ensuite de son utilisation par certaines lignes synchrotron, et des spécificités des techniques de ces lignes de lumière. Puis nous ferons un état de l'art de la radiothérapie Mössbauer ces 30 dernières années.

II.2.1 *Spectroscopie Mössbauer*

II.2.1.1 *Spectroscopie Mössbauer en laboratoire*

L'effet Mössbauer est principalement utilisé comme technique de spectroscopie, puisqu'il met en jeu une résonance avec une bande d'énergie très étroite, donc très spécifique. Cela permet de déterminer précisément la durée de vie de l'état excité à travers la relation suivante :

$$\tau \cdot \Gamma = \hbar \quad (3)$$

Avec τ la durée de vie de l'état excité et Γ la largeur du pic d'énergie.

La largeur du pic d'énergie est très faible et donc difficile à mesurer. Heureusement, un effet très simple permet de moduler très faiblement l'énergie incidente et d'atteindre ces résolutions en énergie impressionnantes caractéristiques de l'effet MB (pour le ^{57}Fe , $\Gamma = 4.6 \text{ neV}$, ce qui correspond à une durée de vie de l'état excité de 141 ns). L'énergie incidente est modulée par effet Doppler, en montant la source (une pastille d'une matrice de ^{57}Fe -Rhodium) sur une pièce mobile :

$$E = E_0 \times \left(1 + \frac{v}{c}\right) \quad (4)$$

Avec E_0 l'énergie des gammas incidents, v la vitesse de la source mobile, et c la vitesse de la lumière.

La variation d'énergie ainsi obtenue est très faible et permet de discerner les variations d'absorption dues aux interactions hyperfines que sont : les modifications de l'énergie de résonance causées par la distribution de charge nucléaire, la densité de charge électronique et le moment

magnétique nucléaire. La transmission du rayonnement à travers l'échantillon diminue fortement lorsque l'énergie incidente est égale à l'énergie d'excitation du noyau car les photons sont absorbés par les noyaux qu'ils rencontrent. L'épaisseur optimale de ^{57}Fe pour des études de spectroscopie résulte d'un compromis entre un nombre suffisant de noyaux excités et une épaisseur assez faible pour limiter l'absorption. Elle est généralement reconnue comme correspondante à une masse surfacique de 5 mg/cm^2 de fer naturel [(“Spectrométrie Mössbauer | Techniques de l'Ingénieur” 2015)].

Les spectres obtenus par Spectroscopie Mössbauer (SM) donnent des informations sur plusieurs paramètres, qui apparaissent visuellement sur les courbes (Figure II-7 et Figure II-8):

- le déplacement isomérique δ (ou déplacement chimique) est dû à l'interaction de la distribution de charge nucléaire avec le nuage électronique entourant le noyau de l'absorbeur et la source. Il se manifeste par le décalage en énergie du spectre par rapport à la référence, une fine couche de fer.
- l'interaction dipolaire Δ , provenant de l'interaction du moment dipolaire magnétique du noyau avec le champ magnétique externe appliqué au noyau. En effet, les électrons des couches incomplètes créent des gradients de champ électrique au noyau. La séparation quadripolaire reflète l'asymétrie de toutes les charges environnantes.

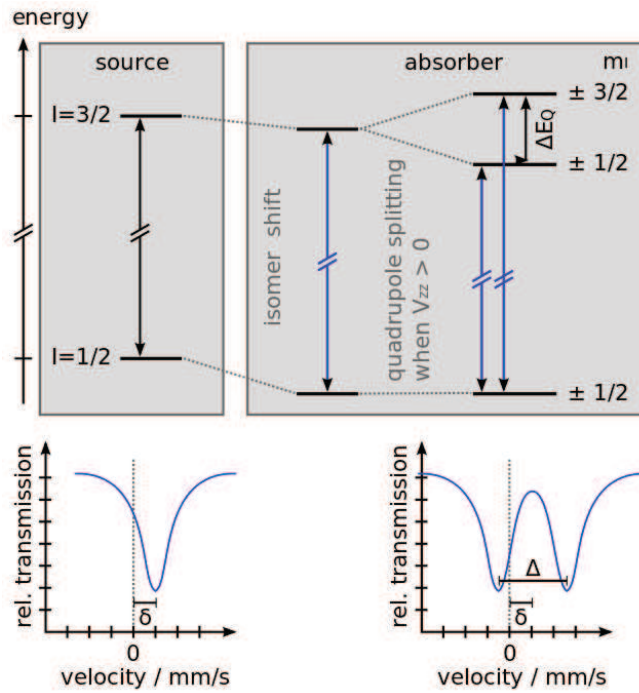


Figure II-7 : Les paramètres principaux des interactions hyperfines, Le déplacement isomérique δ et l'interaction dipolaire Δ , sont directement visibles sur le spectre MB. ("Nomenclature and Conventions for Reporting Mossbauer Spectroscopic Data" 1976)

- la séparation quadripolaire (quadrupole splitting) H_{eff} , dû à l'interaction entre un gradient de champ électrique et un noyau avec une distribution de charge non sphérique ($I > 1/2$) (Figure II-8).

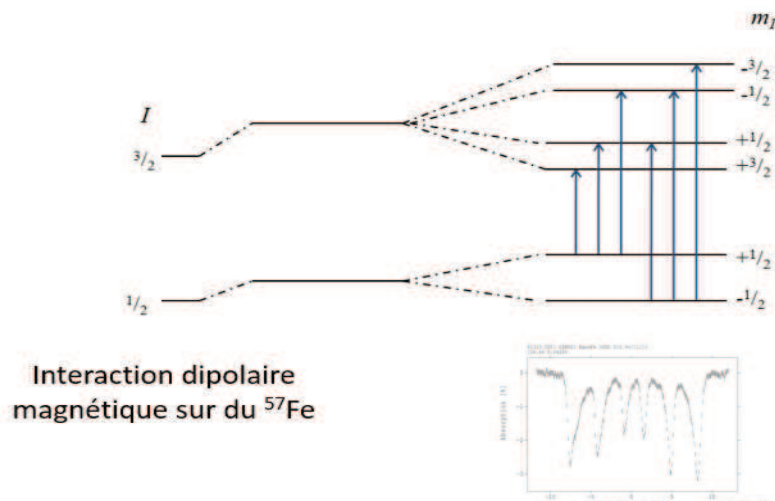


Figure II-8 : La présence d'un champ magnétique peut induire une séparation des niveaux d'énergie, et donc l'apparition de raies supplémentaires. (Spectre obtenu durant cette thèse)

Cette technique permet d'extraire sans destruction de l'échantillon des informations sur la coordination et la configuration électronique des isotopes Mössbauer au sein du matériau. Ses applications vont de l'analyse du vieillissement du béton utilisé pour le stockage des déchets radioactifs [(Monroy-Guzman *et al.* 2015)], jusqu'à la preuve expérimentale de la relativité [(Champeny, Isaak, and Khan 1963)], en passant par l'étude des sols martiens [(Klinghöfer *et al.* 2003); (Morris *et al.* 2006)].

L'avantage principal de la SM réside dans la simplicité du set-up expérimental. La possibilité de monter un spectromètre avec des moyens rudimentaires a pu être illustrée très tôt. Certains ont même fabriqué une source à l'aide d'un simple magnétophone [(Thiel, van den Berg, and Stevens 1968)].

Les spectromètres peuvent fonctionner en mode « vitesse constante » (la source est déplacée à la même vitesse pendant une période, puis la vitesse est changée), ou bien « accélération constante » (l'accélération est préservée de -10 à +10 mm/s). Le mode « vitesse constante » permet de conserver la même énergie d'excitation pendant toute l'irradiation alors que le mode « accélération constante » permet de parcourir toute une gamme d'énergies d'excitation. Certains spectromètres proposent les deux modes, d'autres proposent seulement le mode « accélération constante » (voir § IV.3.3, p. 148).

II.2.1.2 Spectroscopie Mössbauer par électrons de conversion

D'autres techniques ont vu le jour lors des développements de la SM. Bonchev *et al.* [(Bonchev, Jordanov, and Minkova 1969)] a estimé le nombre d'électrons de conversion émis en configuration « backscattering » lors de l'absorption sans recul du rayonnement gamma par un matériau absorbeur et développé la technique de CEMS (Conversion Electron Mössbauer Spectroscopy) qui comptabilise les électrons émis par le matériau absorbeur pour différentes énergies incidentes, et caractérise ainsi la nature du matériau étudié (Figure II-9).

Etat de l'art

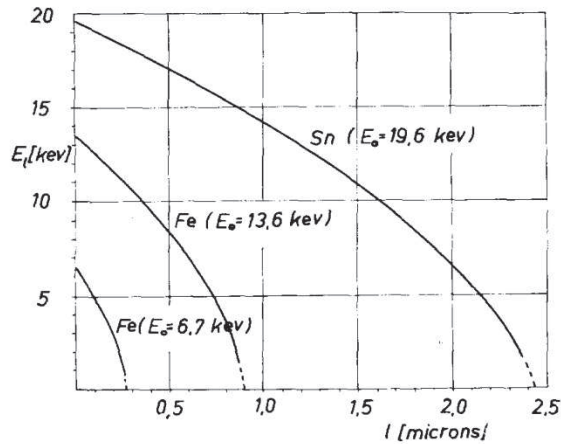


Figure II-9 : Dépendance entre l'énergie de l'électron émis E_1 et l'épaisseur de l'absorbeur (Bonchev, Jordanov, and Minkova 1969).

Liljequist [(Liljequist, Ekdahl, and Bäverstam 1978)] a poussé la simulation dans le cadre du ^{57}Fe , et établi la probabilité d'émission d'électrons de conversion par un absorbeur en fonction de la profondeur d'origine de l'électron (Figure II-10). Cela permet de déterminer que des électrons de conversion produits au cœur d'une particule de plus de 200 nm de rayon ne sortiront pas de la particule, et donc ne participeront pas au dépôt d'énergie d'une radiothérapie.

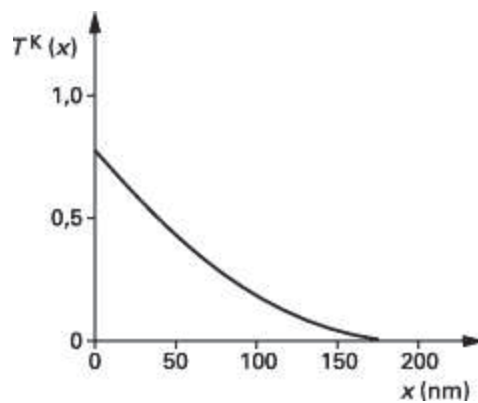


Figure II-10 : Probabilité d'émergence $T^K(x)$ à la surface d'un électron de conversion K du fer en fonction de la profondeur x de son origine (Liljequist, Ekdahl, and Bäverstam 1978). Après 170 nm plus aucun électron émis au cœur du matériau n'est transmis à l'extérieur.

Mais la SM n'est pas seulement représentée dans les laboratoires, elle a aussi des applications dans un synchrotron.

II.2.1.3 Spectroscopie Mössbauer par rayonnement synchrotron

Le développement des sources synchrotron a permis de bénéficier d'une source de rayons X intense, de faisceaux monochromatiques et d'une très bonne définition temporelle des paquets d'électrons et donc des paquets de rayons X. Cela a entraîné le développement de nouvelles techniques Mössbauer, mettant à profit ces caractéristiques idéales. En voici quelques-unes.

II.2.1.3.1 La Diffusion nucléaire résonante

Une technique, développée en 1992 (Nuclear Forward Scattering ou *Diffusion nucléaire résonante*), et basée sur le décalage temporel des désexcitations nucléaires consécutives à l'effet MB, observe les rayons X passant à travers un échantillon irradié grâce à un rayonnement synchrotron [(van Bürck *et al.* 1992)]. Le rayonnement synchrotron est constitué d'impulsions de rayons X très courtes et très intenses, provenant de paquets d'électrons circulant dans l'anneau de stockage selon une distribution différente selon le mode de remplissage (Figure II-11).

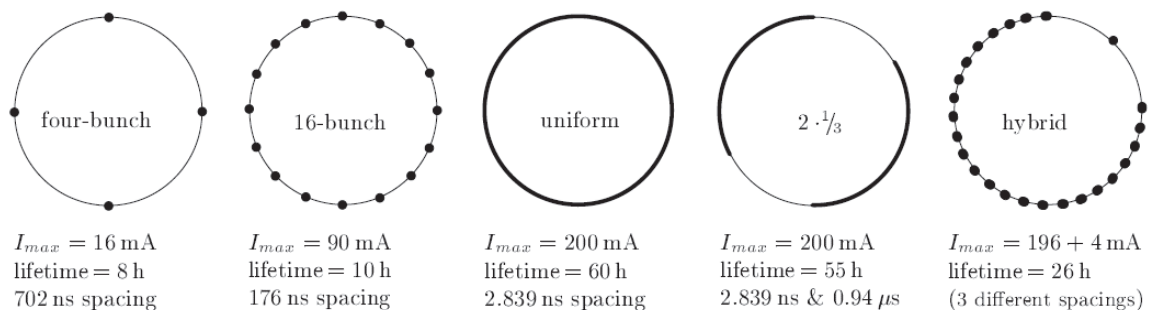


Figure II-11 : Exemples de modes de remplissage des paquets d'électrons dans l'anneau de stockage de l'ESRF, parmi les modes disponibles : 4 ou 16-bunch filling mode ; Uniform filling mode (992 paquets uniformément répartis) ; $2 \cdot \frac{1}{3}$ filling mode ; Hybrid mode $24 \cdot 8 + 1$ filling mode ; $7/8 + 1$ filling mode ; $4 \cdot 10$ filling mode. (Thèse T. Roth). **Figure II-12** : Exemples de modes de remplissage des paquets d'électrons dans l'anneau de stockage de l'ESRF, parmi les modes disponibles : 4 ou 16-bunch filling mode ; Uniform filling mode (992 paquets uniformément répartis) ; $2 \cdot \frac{1}{3}$ filling mode ; Hybrid mode $24 \cdot 8 + 1$ filling mode ; $7/8 + 1$ filling mode ; $4 \cdot 10$ filling mode. (Thèse T. Roth).

Grâce à cela la production de rayons X peut atteindre 10^9 photons par secondes. Il est possible de séparer lors de leur détection les rayons X qui ont été simplement déviés lors de leur trajet dans le matériau (effet Compton), sans être absorbés, de ceux qui ont été absorbés par effet MB. La désexcitation Mössbauer prend plus de temps que la diffusion Compton, et l'observation des désexcitations différées après chaque pulse de rayonnement synchrotron permet de caractériser le matériau étudié. Cette technique est l'équivalent en déplacement temporel du déplacement fréquentiel de la Spectroscopie Mössbauer.

II.2.1.3.2 Le « Nuclear Lighthouse Effect »

Récemment, l'équivalent en déplacement spatial a été mis en évidence grâce à l'effet phare (Nuclear Lighthouse Effect) [(Röhlsberger 2000), (Roth *et al.* 2005)]. La rotation très rapide d'un échantillon sur lui-même pendant son irradiation par un faisceau synchrotron entraîne un déplacement angulaire sur le détecteur du rayonnement issu des désexcitations des isotopes MB. Le spectre « spatial » ainsi dessiné sur le détecteur correspond au spectre « temporel » du NFS ou « fréquentiel » de la SM. L'interprétation de ces spectres est différente, mais les variations ont toujours la même origine, et permettent donc de retrouver plus ou moins facilement les différents paramètres (déplacement isomérique, séparation quadripolaire, interaction dipolaire magnétique).

II.2.1.3.3 Le monochromateur à résonance nucléaire

La SM conventionnelle dans le domaine fréquentiel peut également être effectuée avec des radiations synchrotron en utilisant un monochromateur à résonance nucléaire qui emploie les réflexions pures d'un monocristal de borate de fer ($^{57}\text{FeBO}_3$) [(Potapkin *et al.* 2012)]. À certains angles, les réflexions des rayons X par un cristal sont interdites. Placé sous cet angle, le seul rayonnement provenant du monocristal sera dû à l'émission de rayons gamma par effet MB sous l'effet de l'irradiation synchrotron, qui a lieu dans toutes les directions. Chaque photon émis par le cristal possède la résolution en énergie nécessaire pour l'effet MB, au prix d'une réduction drastique du flux de photons. Cette dernière méthode permet d'accéder directement au déplacement isomérique et à la séparation quadripolaire, qui révèlent l'état de spin du noyau Mössbauer.

II.2.1.4 *La diffusion nucléaire inélastique*

La ligne ID18 de l'ESRF a participé depuis son origine au développement d'une technique d'étude des matériaux basée sur l'effet MB et liée à la diffusion nucléaire résonante appelée diffusion nucléaire inélastique, (NIS, pour Nuclear Inelastic Scattering³) qui servira pour ces travaux de thèse [(A. Chumakov and Rüffer 1998)]. Cette technique permet d'acquérir indirectement des informations sur les modes de vibration du réseau atomique, en comptabilisant les quanta de vibration au sein du réseau pour chaque énergie, c'est-à-dire la densité d'état des phonons.

« Tous les mouvements des particules formant le réseau cristallin peuvent être décrits comme la superposition d'un grand nombre de vibrations caractéristiques dont la distribution est appelée spectre fréquentiel du cristal. La nature des liaisons entre les particules du réseau détermine la structure du spectre de vibration du réseau, qui est souvent très compliquée. Cependant, la substitution d'un spectre fréquentiel beaucoup plus simple suffit souvent pour des considérations qualitatives.

Cette description classique des mouvements dans un cristal correspond dans le monde quantique à un ensemble d'oscillateurs harmoniques découplés possédants des énergies quantifiées. Le spectre de vibration décrit la distribution des fréquences fondamentales des oscillateurs (Density of States, DOS), tandis que la température détermine leur « nombre d'occupation ». Ce nombre d'occupation détaillant simplement les états d'énergie occupés par les oscillateurs.

L'énergie de recul émise lors de l'émission ou l'absorption d'un quantum d'énergie par un noyau lié à un cristal est absorbée par ce cristal sous forme d'énergie translationnelle et d'énergie interne. L'augmentation d'énergie de translation du réseau cristallin est toujours négligeable à cause de la masse énorme du cristal par rapport à la masse d'un noyau seul. L'augmentation d'énergie interne se

³ Aussi appelée dans la littérature : Nuclear resonance vibrational spectroscopy (NRVS), Nuclear inelastic absorption (NIA), Nuclear resonant inelastic x-ray scattering (NRIXS), or Phonon assisted Mössbauer effect.

traduit par un changement de nombre d'occupation des oscillateurs. Les énergies de ces oscillateurs étant quantifiées, le cristal absorbe l'énergie de recul de manière quantifiée. Les transitions nucléaires d'un noyau lié au cristal sont normalement accompagnées par la transition simultanée des oscillateurs quantiques. L'émission d'un gamma peut donc être accompagnée d'une transition d'un oscillateur vers un état d'énergie voisin. De la même manière, une émission d'un photon gamma peut être accompagnée de la transition de deux oscillateurs, ou plus. A cause de la quantification des oscillateurs, il y a une certaine probabilité que l'émission gamma se fasse sans que les oscillateurs changent d'état, le facteur de Lamb-Mössbauer f_{L-M} . » [("Rudolf Mössbauer - Nobel Lecture: Recoilless Nuclear Resonance Absorption of Gamma Radiation" 2015)]

En mesurant la densité d'état des phonons on peut obtenir des renseignements sur le comportement du matériau en réponse à une excitation, l'énergie disponible dans le réseau atomique, ainsi que les propriétés thermiques du matériau [(A. I. Chumakov and Sturhahn 1999)].

Un faisceau de photons incident à l'énergie légèrement différente de la résonance du ^{57}Fe ($E_0 \pm \Delta E$) est envoyé sur un échantillon. Les atomes de ^{57}Fe peuvent être excités si les photons échangent de l'énergie avec les vibrations du réseau atomique.

Si un photon d'énergie $E_0 + \Delta E$ ($E_0 - \Delta E$) est absorbé, un phonon d'énergie ΔE est créé (ou annihilé). La diffusion inélastique est mesurée en comptabilisant les produits de désexcitation caractéristiques (principalement les rayons x de fluorescence K_α à 6.4 keV provenant de la conversion interne au sein du noyau, donc apparaissant avec un délai) en fonction de l'énergie du faisceau incident. On peut éliminer les rayons X atteignant le détecteur avant ce délai, car ils proviennent de l'effet photoélectrique et non de l'effet MB. Cela permet de calculer des ratios entre les deux effets.

Le montage expérimental est détaillé Figure II-13.

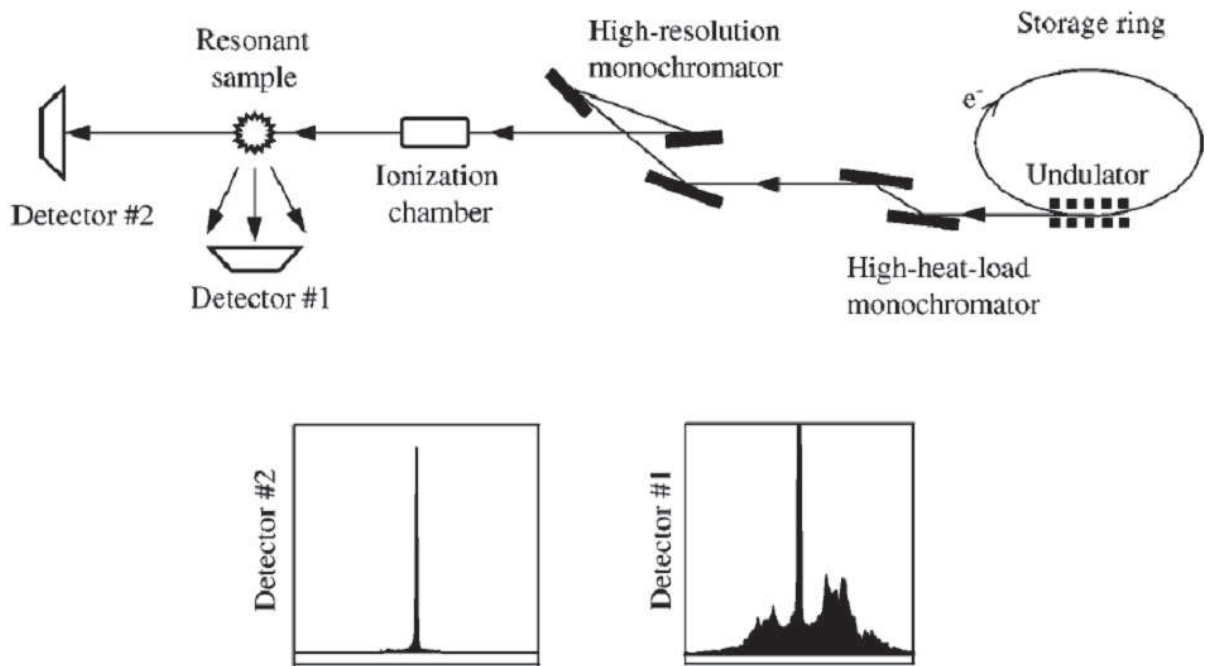


Figure II-13 : Montage expérimental d'une expérience de diffusion nucléaire inélastique (NIS). Le détecteur #1 récupère les photons de fluorescence émis par l'échantillon. Le détecteur #2 permet de récupérer la fonction instrumentale, la distribution en énergie du faisceau incident. Figure issue de (A. I. Chumakov and Sturhahn 1999).

Les données brutes d'une mesure de diffusion nucléaire inélastique présentent donc un nombre de phonons créés ($E > 0$) ou annihilés ($E < 0$) pour des gammes d'énergies généralement comprises entre -100 et 100 meV, centrées sur le pic de résonance Mössbauer.

La mesure d'un spectre de diffusion nucléaire inélastique permet de remonter par des calculs relativement simples à un spectre de densité d'état des phonons (DOS : Density of States), qui donne la quantité de phonons disponibles pour chaque valeur d'énergie (en meV). Par exemple la Figure II-14, issue de (Handke *et al.* 2005).

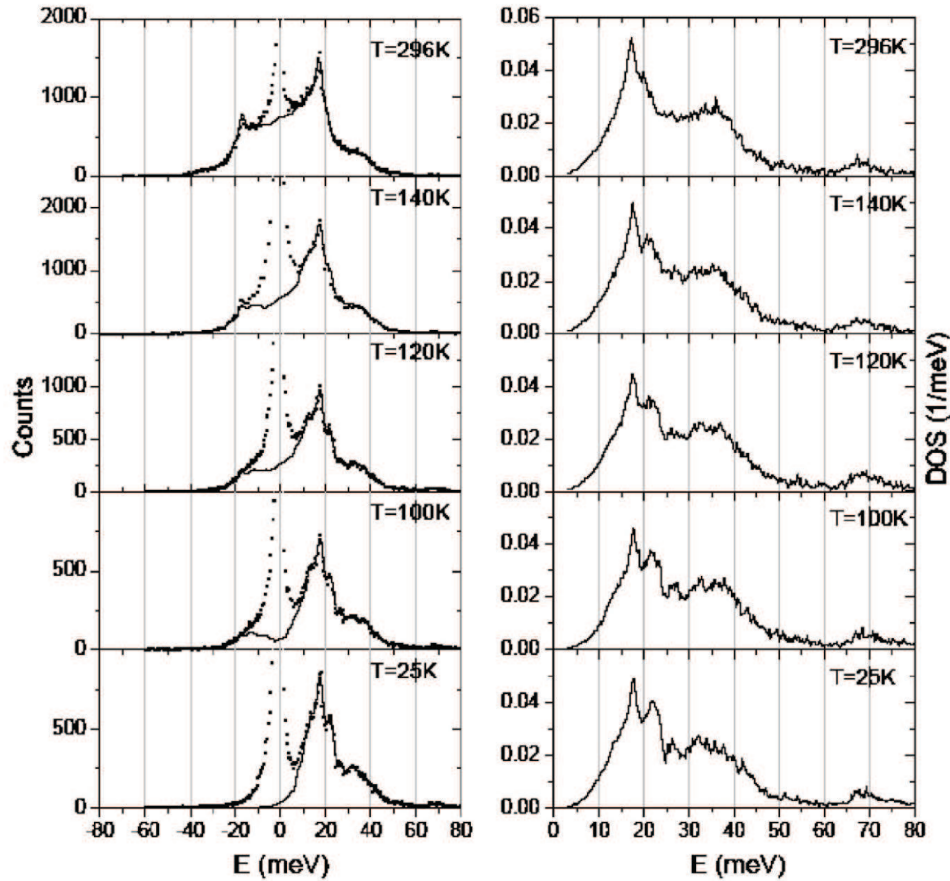


Figure II-14 : (Gauche) Données brutes de NIS pour différentes températures (points) et après soustraction du pic central (ligne). (Droite) Densité d'état des phonons extraite des données brutes.

Issu de (Handke *et al.* 2005).

Pour cela, les valeurs brutes sont décomposées en plusieurs contributions (A. I. Chumakov and Sturhahn 1999). Tout d'abord le pic d'absorption dû à la composante élastique (terme à 0-phonon), et ensuite les absorptions inélastiques accompagnées par la création (absorption) de n-phonons.

La probabilité normalisée d'absorption nucléaire inélastique $W(E)$:

$$W(E) = f_{LM} \left[\delta(E) + \sum_{n=1}^{\infty} S_n(E) \right] \quad (5)$$

Avec S_n les composantes à n phonons. Le terme à un seul phonon est donné par la formule :

$$S_1(E) = \frac{E_R \cdot g(|E|)}{E \cdot (1 - e^{-\beta E})} \quad (6)$$

Les termes suivant peuvent être calculés à partir d'une convolution itérative :

$$S_n(E) = \frac{1}{n} \int_{-\infty}^{\infty} S_1(E') S_{n-1}(E - E') dE' \quad (7)$$

Pour une mesure NIS de haute définition on trouve une composante élastique deux ordres de grandeur plus importante que la contribution inélastique (A. I. Chumakov and Sturhahn 1999). On trouve donc toujours au milieu du spectre NIS un grand pic élastique.

Cette technique présente donc l'avantage de fournir le DOS du matériau à partir des données brutes de l'échantillon, contrairement à la méthode de détermination du DOS par neutrons (Brockhouse and Stewart 1955), qui nécessite un modèle du réseau cristallin, et donne donc une mesure indirecte. De plus, la mesure du DOS par *coherent inelastic neutron scattering* modélise la relation de dispersion par un Dirac, sans prendre en compte l'élargissement dû à la température. En conséquence, les deux techniques donneront des résultats légèrement différents (A. I. Chumakov and Sturhahn 1999) (Figure II-15).

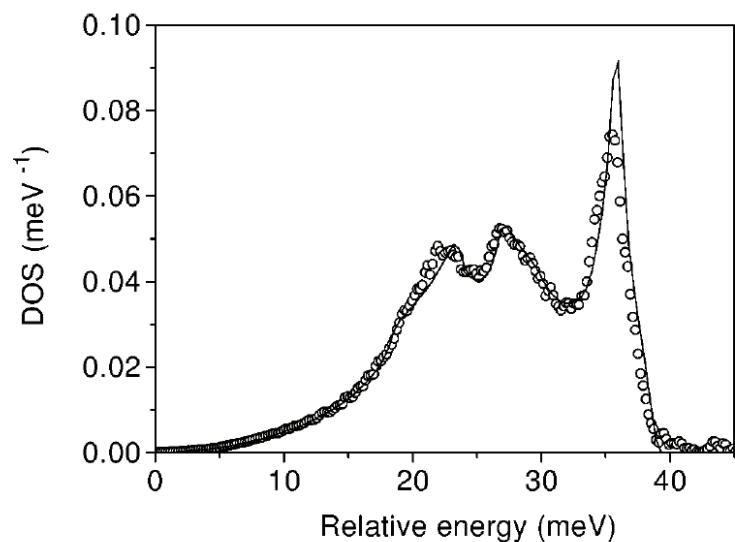


Figure II-15 : Comparaison des données de densité d'état des phonons dans l' α -iron, obtenus par NIS [T.S. Toellner et al., Argonne National Laboratory (1997) non publié] (cercles) et par diffusion inélastique des neutrons [(Schober and Dederichs 1981)] p. 56] (ligne). Les données issues des neutrons ont été convoluées avec une fonction instrumentale Gaussienne de 0.66 meV de largeur.

La diffusion nucléaire inélastique (cercles), donne un DOS plus réaliste que la diffusion inélastique des neutrons (ligne) car elle prend en compte la durée de vie limitée des phonons, qui a pour conséquence l'élargissement du pic de résonance, ainsi que l'influence de la température. Cette technique d'obtention du DOS permet de déterminer les caractéristiques dynamiques d'un matériau et sera utile à cette étude lors des expériences sur ID18.

II.2.2 Radiothérapie Mössbauer

II.2.2.5 Le travail pionnier de Mills

Mills le premier [(Mills *et al.* 1988), (Reiff, Mills, and Farrell 1990)] a proposé d'utiliser l'effet MB afin de produire des électrons Auger qui pourraient être létaux pour les cellules environnantes. Il conjugue un atome de ^{57}Fe à un intercalant de l'ADN, la Bléomycine (Figure II-16), afin d'immobiliser l'atome de fer au sein de l'ADN, pour favoriser l'effet MB et provoquer des Cassures Double Brin (CDB).

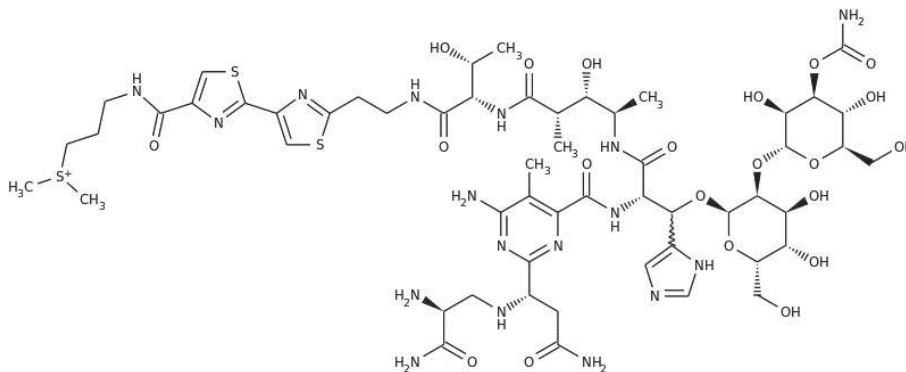


Figure II-16 : Bléomycine. Très grande molécule (1,5 kDa), cet intercalant de l'ADN peut catalyser la formation de Cassures Double Brin et Simple Brin en présence d'un métal de transition (Fe(II) ou Cu(I)), de l'oxygène et d'un réducteur à un électron.

Des cellules HTB26 (une lignée cellulaire de cancer du sein) ont été incubées *in vitro* avec le conjugué ^{57}Fe -Bléomycine, ou bien injecté *in vivo* dans la tumeur sous-cutanée d'une souris CH3, et observé la prolifération cellulaire après irradiation avec une source Mössbauer (^{57}Co dans une matrice de rhodium) calibrée à « vitesse constante » sur le maximum d'absorption du complexe du fer avec la Bléomycine (+1,5 mm/s par rapport à la résonance d'une fine feuille de fer). Il compare ses résultats avec une absence d'irradiation et en présence ou en absence de conjugué. Malgré avoir montré une diminution d'un facteur 4 de la prolifération cellulaire lors de l'irradiation MB à la résonance de la bléomycine (+1,5 mm/s), ainsi qu'une inhibition de 87% de la croissance tumorale et cela avec une dose très faible (10^{-5} Gy), Mills n'a pas effectué de test off-résonance, pour observer les effets de la source Mössbauer sans l'effet MB. Il manque donc à cette étude ce contrôle qui aurait permis de confirmer l'efficacité de la thérapie Mössbauer et les effets observés peuvent être expliqués par la seule toxicité connue de la bléomycine. Ce défaut flagrant de l'étude a été immédiatement noté par Humm (Humm 1988) et également Brenner (Brenner, Geard, and Hall 1989), qui proposent que l'effet observé soit dû aux effets combinés des rayons X de 6.4 keV également émis par la source et de la bléomycine.

Cet article a créé un grand intérêt dans la communauté scientifique, et certains laboratoires ont essayé de reproduire ces résultats en variant quelque peu les conditions expérimentales et les modèles cellulaires. L'objectif à chaque fois est de répondre à la question simple : une thérapie par effet Mössbauer est-elle envisageable ?

II.2.2.6 À la recherche d'une confirmation expérimentale

Dans une expérience assez similaire, Ortalli (Ortalli *et al.* 1992) a observé une inhibition de la croissance cellulaire dans plusieurs lignées cellulaires différentes, en utilisant de l'hématine au lieu de la bléomycine (Figure II-17). L'hématine correspond à un noyau hème dont le Fer est oxydé. La combinaison de 0.1 mM d'hématine et d'une irradiation avec une source MB de 100 mCi pendant 4

heures ont abouti à une réduction de 75% de la croissance de cellules de la moelle osseuse de patients atteints de Leucémie myéloïde chronique. Les échantillons étaient placés aux quatre coins d'une plaque 24-puits et à 4 cm de la source MB.

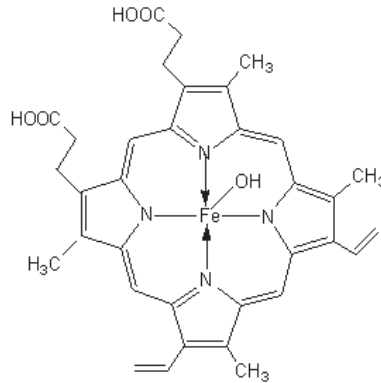


Figure II-17 : Hématine, candidat pour la thérapie Mössbauer.

Ortalli montre une relation possible entre la quantité de fer dans une cellule et l'efficacité de la thérapie MB, sans atteindre les résultats de Mills. Cependant, une fois encore dans cette étude l'irradiation avec une source Mössbauer n'a pas été testée en dehors de la résonance.

MacDonnel (MacDonnell 1995) répète l'expérience en utilisant un complexe n'induisant pas de cassures de l'ADN comme intercalant, le $[^{57}\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{DPPZ})](\text{PF}_6)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (phen = 1,10-phenanthroline ; DPPZ = dipyrido[3,2-a :2',3'-c]-phenazine) (Figure II-18).

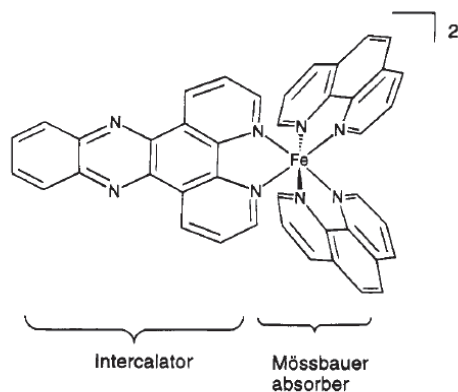


Figure II-18 : Complexe alternatif de liaison ^{57}Fe -ADN (MacDonnell 1995).

Le recouvrement de la raie d'absorption Mössbauer de ce complexe avec l'énergie incidente de la source immobile a permis d'irradier les échantillons sans utiliser l'effet Doppler pour ajuster l'énergie incidente, et donc d'avoir un très bon rendement d'irradiation. Le complexe mis en contact avec un plasmide et irradié à température ambiante par la source MB n'a pas mis en évidence l'efficacité de l'effet MB pour induire des dommages à l'ADN et donc une linéarisation du plasmide. Les seuls effets observés ont été retrouvés dans les contrôles et donc attribués à l'effet photoélectrique des photons émis par la source Mössbauer.

L'effet MB se manifestant peu en solution à cause du phénomène de recul, certains groupes ont tenté des expériences dans du gel d'agarose (3%), mimant la viscosité du milieu biologique afin de restreindre la diffusion des complexes contenant les isotopes Mössbauer. L'effet a été observé dans des solutions de glycérol à -100, -5 et 0°C [(Bunbury *et al.* 1963)] ou bien dans des cellules non congelées comme *E. Coli* à 3°C (Bauminger *et al.* 1976) ou des globules rouges à 4°C (Gonser, Grant, and Kregzde 1964).

Notant que l'effet MB pouvait avoir lieu dans la cellule seulement avec des atomes en interaction avec une matrice solide, Barbieri (Barbieri *et al.* 1998) en conclut que seuls la membrane, le cytosquelette, l'ADN et la ferritine sont des candidats potentiels pour lier les atomes de ^{57}Fe . Il a cherché à savoir si une solution visqueuse de complexes ADN-Ferritine manifestait une absorption résonante (Figure II-19).

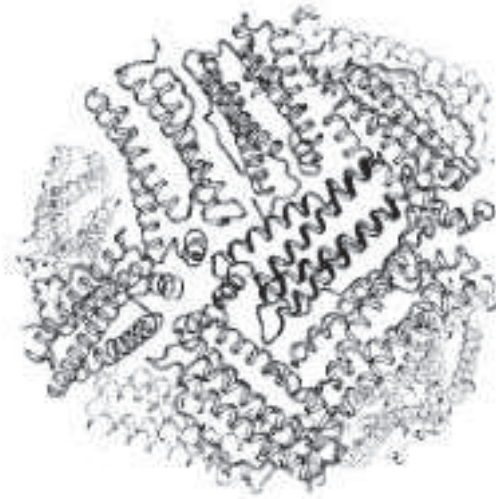


Figure II-19 : Ferritine, molécule présente dans l'organisme servant à stocker et transporter le fer, en moyenne 450 atomes de fer sont stockés dans cette structure circulaire, soit 10% de sa capacité totale (Hempstead *et al.* 1997).

La ferritine est une protéine contenant du fer (30% du fer corporel), avec l'hémoglobine (60%), l'hémosidérine et la gastroferrine. On la retrouve aussi bien chez les animaux, les plantes ou les micro-organismes (Theil 1987). Elle apparaît sous deux formes chez *E. Coli* : une contenant un hème (HCF) contenant environ 800 atomes de fer ; et une autre forme (FTN) contenant un seul atome de fer. Chez l'homme en moyenne 450 atomes de fer sont stockés dans cette structure circulaire, soit 10% de sa capacité totale.

Barbieri a réussi à obtenir une faible absorption résonante à température ambiante seulement pour *E. Coli* non-mutant et contenant donc les deux formes de ferritine (HCF et FTN). Il conclut que FTN est trop petit pour manifester l'effet MB en solution, et la taille plus importante de HCF contribue à diminuer la dépendance du facteur de Lamb-Mössbauer avec la température.

Cela laisse penser qu'une très grande concentration d'atomes de fer agglomérés pourrait réduire encore plus la dépendance de f_{LM} en température et donc obtenir une grande résonance à température ambiante dans une cellule. Les nanoparticules de fer seraient un bon moyen d'obtenir une grande concentration localisée d'atomes de fer tout en minimisant l'effet de recul.

En 2002 Terrissol (Terrissol, Pomplun, and Martin 2002) modélise le dépôt d'énergie dû à l'effet MB sur du ^{57}Fe couplé à de la bléomycine selon le modèle décrit par Wu *et al.* (Wu *et al.* 1996) dans les mêmes conditions que celles supposées par Mills (Mills *et al.* 1988). Il cherche à quantifier l'augmentation des cassures double brin (CDB) par simulation Monte Carlo. Pour cela il modélise l'interaction ADN-Bléomycine (Figure II-20) et l'émission d'électrons Auger dans le cas d'une désexcitation du ^{57}Fe (Figure II-21).

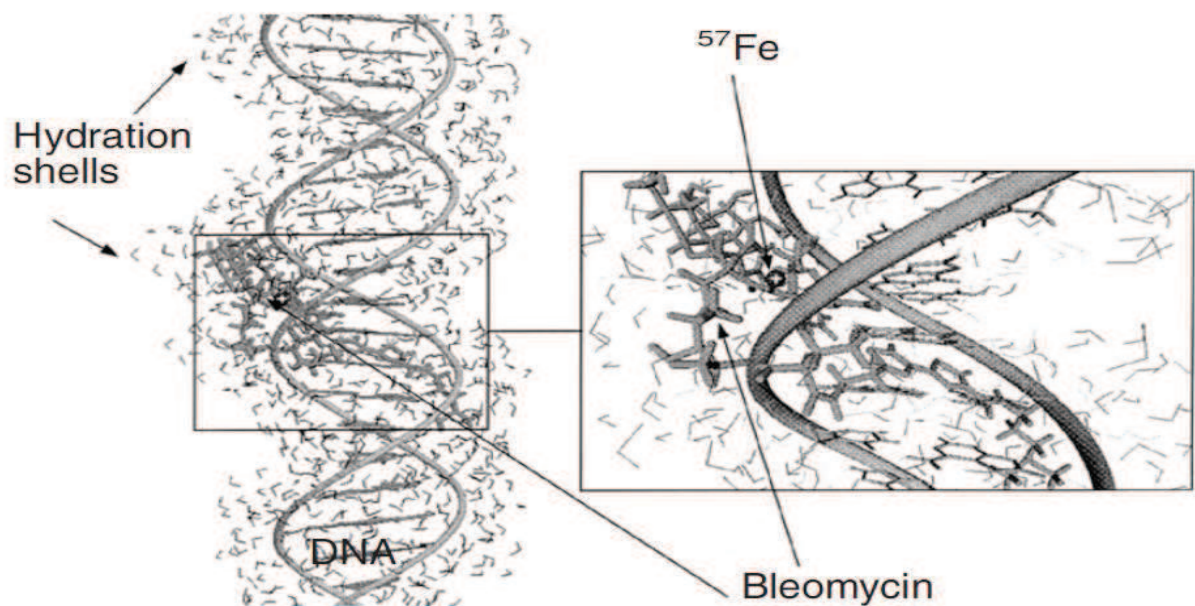


Figure II-20 : Modèle du complexe Fer-Bléomycine-ADN utilisé par Terrissol pour simuler l'effet sur l'ADN d'une thérapie Mössbauer postulée par Mills. Les molécules d'eau formant la couche d'hydratation autour de l'ADN et de la Bléomycine sont prises en compte dans la modélisation.

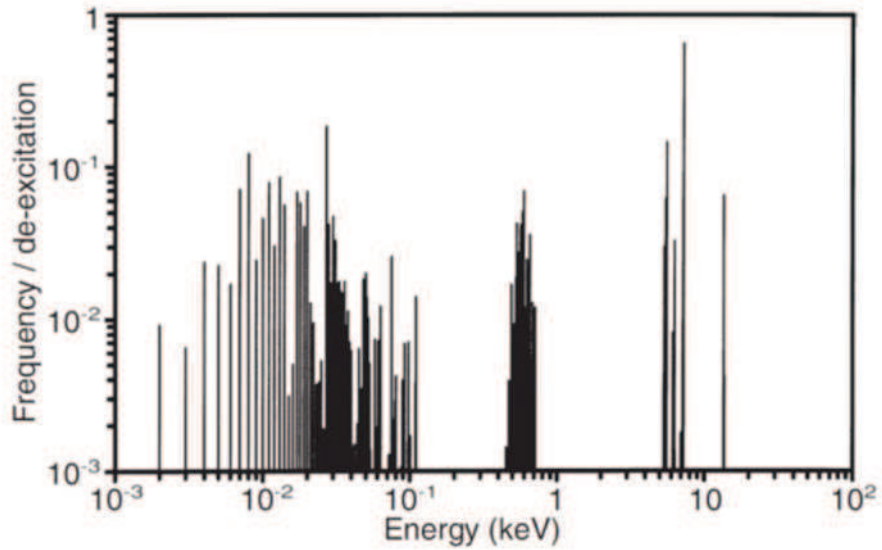


Figure II-21 : Spectre en énergie des électrons Auger émis par désexcitation du ⁵⁷Fe.

Grâce à ces informations il a calculé le nombre de cassures simple brin (CSB) et de CDB suite à une désexcitation du ⁵⁷Fe proche de l'ADN. Ses résultats (Figure II-22) déterminent qu'une désexcitation MB induit 0.65 CDB et conclut à l'efficacité de la thérapie MB pour augmenter l'effet thérapeutique de la bléomycine.

Complexity of damage for a BLM-DNA segment induced by a ⁵⁷Fe de-excitation. 'No break' includes the gamma emission case; 'SSB' a single SSB is observed; 'SSB+' two or more SSBs on the same strand; 'DSB' two SSBs on opposite strands within a distance of 10 base pairs; '2 SSB' two or more SSBs on different strands outside the 10 basepairs distance; 'DSB++' at least two DSBs; 'DSB+' all other cases with one DSB.

| | |
|----------|-------|
| No break | 0.207 |
| SSB | 0.146 |
| SSB+ | 0.128 |
| 2 SSB | 0.095 |
| DSB | 0.143 |
| DSB+ | 0.119 |
| DSB++ | 0.162 |

Figure II-22 : Résumé des probabilités de cassure simple brin et double brin après désexcitation Mössbauer du ⁵⁷Fe à proximité de l'ADN.

En 2002, Mohammed Gaci (Gaci 2002) a défendu à Poitiers une thèse intitulée « Radiothérapie interne (Electron Auger) par stimulation Gamma résonante Mössbauer : chimère ou réalité ? Etude physico-chimiques, cellulaires et biomoléculaires. » Ce travail est très intéressant et exactement relié à notre questionnement.

Tout d'abord le choix de l'isotope Mössbauer est soigneusement détaillé. Il est basé sur les propriétés physiques des différents éléments. Comme vu précédemment, l'énergie d'excitation détermine la température à laquelle l'effet MB peut être détecté. Typiquement il n'existe pas d'isotope Mössbauer avec une énergie d'excitation supérieure à 200 keV, la plus haute transition MB mesurée étant l'¹⁹⁰Os à 186.9 keV. Une énergie d'excitation basse implique un f_{LM} non négligeable à température ambiante. Un retour rapide à la théorie de l'effet MB permet de mettre en évidence l'importance de la température de Debye θ_D qui s'exprime :

$$\theta_D = \frac{hc_s}{2Lk_B} \sqrt[3]{\frac{6N}{\pi}} \quad (8)$$

Avec h la constante de Planck, c_s la vitesse des phonons dans le matériau, L la dimension du cube de solide considéré, k_B la constante de Boltzmann, N le nombre d'atomes constituant le solide.

Le facteur de Lamb-Mössbauer mentionné en introduction s'exprime :

$$f_{LM} = e^{-\left(\frac{E_\gamma}{\hbar c}\right)^2 \langle x^2 \rangle} \quad (9)$$

Il peut s'exprimer avec le modèle de Debye (Rado 1966) :

$$f_{LM} = \exp \left\{ -\frac{6E_R}{k_B \theta_D} \left[\frac{1}{4} + \left(\frac{T}{\theta_D^2} \right) \int_0^{\frac{\theta_D}{T}} \frac{x}{e^x - 1} dx \right] \right\} \quad (10)$$

Avec T la température en Kelvin et E_R l'énergie de recul.

En pratique la température de l'échantillon relativement à la température de Debye a son importance et définit deux régimes :

$$f_{LM} = \exp \left\{ -\frac{E_R}{k_B \theta_D} \left[\frac{3}{2} + \left(\frac{\pi^2 T^2}{\theta_D^2} \right) \right] \right\} \quad \text{Pour } T \ll \theta_D \quad (11)$$

$$f_{LM} = \exp \left\{ -\frac{6E_R T}{k_B \theta_D} \right\} \quad \text{Pour } T \geq \frac{\theta_D}{2} \quad (12)$$

En pratique θ_D exprime la force des liaisons dans un solide. Un θ_D élevé indique donc la possibilité d'un f_{LM} élevé. Une autre considération théorique intéressante se manifeste au zéro absolu :

$$f_{LM}(T = 0) = \exp \left\{ -\frac{3E_R}{2k_B \theta_D} \right\} \quad (13)$$

On voit donc que même à zéro degrés f_{LM} est inférieur à 1. C'est dû au mouvement de point zéro quantique, c'est-à-dire. le fait que même au plus bas de son potentiel d'énergie, le principe d'incertitude d'Heisenberg dicte la nécessité d'une énergie résiduelle et donc d'un mouvement résiduel, qui empêche la probabilité d'interaction Mössbauer d'être de 100%.

Gaci a établi un comparatif des différents isotopes afin de déterminer le plus adapté pour une application de radiothérapie. Il prend en compte aussi bien l'énergie d'excitation, la couche de demi-atténuation dans l'eau, la section efficace (la probabilité d'interaction de l'atome avec un rayon incident) et l'abondance naturelle de l'isotope, sans oublier la facilité de mise en œuvre des irradiateurs. À partir de ces critères de choix, il retient 7 isotopes Mössbauer d'intérêt à des fins médicales : ^{57}Fe , ^{119}Sn , ^{125}Te , ^{121}Sb , ^{151}Eu , ^{127}I et ^{129}I .

| Elément Mössbauer | E_R (keV) | CDA (cm) | σ_0 (10^{-20}cm^2) | α | σ_{en} (10^{-20}cm^2) | a% | θ_D (K) |
|-------------------|-------------|----------|--------------------------------------|----------|---|-------|----------------|
| ⁵⁷ Fe | 14.4 | 0.335 | 256 | 9 | 230 | 2.14 | 429 |
| ¹¹⁹ Sn | 23.9 | 1.1 | 140 | 5.1 | 117 | 7.61 | 195 |
| ¹²⁵ Te | 35.5 | 2.21 | 27 | 13 | 25 | 6.99 | 153 |
| ¹²¹ Sb | 37.1 | 2.33 | 20 | 11 | 18.3 | 57.2 | 211 |
| ¹⁵¹ Eu | 21.6 | 0.95 | 23 | 29.5 | 22.2 | 47.48 | 180 |
| ¹²⁷ I | 57.6 | 3.55 | 21 | 3.7 | 16.5 | 100 | 109 |
| ¹²⁹ I | 27.8 | 1.48 | 38 | 5.3 | 32 | 0 | 109 |

Table II-1 : Paramètres physiques des isotopes Mössbauer. E_R = Energie de résonance ; CDA = couche de demi-atténuation dans l'eau ; σ_0 = section efficace MB; α = coefficient de conversion interne ; $\sigma_{en}=\alpha/(\alpha+1)\times\sigma_0$ = section efficace d'émission électronique après résonance MB ; a% = abondance isotopique. θ_D = Température de Debye.

L'étain (¹¹⁹Sn) est intéressant puisqu'il possède une énergie d'excitation de 23.4 keV et une abondance isotopique de 7.6%. Cependant sa température de Debye est seulement de 195K. L'élément qui ressort clairement est le ⁵⁷Fe, comme attendu. Sa température de Debye de 429K [(Sharma 1965)], son haut f_{LM} et sa section efficace très importante le place largement en haut du classement.

Cette recherche argumentée d'isotopes autres que le seul ⁵⁷Fe envisagé par Mills a donc permis de confirmer que les autres isotopes étaient intéressants mais que le ⁵⁷Fe restait prépondérant dans une grande part des paramètres observés.

Gaci a utilisé le même complexe Fer-Bléomycine que Mills, et irradié avec 2 Gy des E. Coli avec une source MB à 1,4 ; 1,5 et 1,6 mm/s. Malgré ses efforts, il n'a pas réussi à obtenir une radiosensibilisation par effet MB. Cela démontre qu'une radiothérapie Mössbauer avec des atomes de ⁵⁷Fe individuels couplés à des molécules stabilisatrices n'est pas efficace.

Ces efforts pour confirmer ou infirmer l'intérêt de l'effet MB pour une radiothérapie se soldent par un demi-échec. Deux questions principales restent en suspens à la lecture de ces articles. La difficulté d'obtenir l'effet MB en milieu aqueux, et la rigidité de l'échantillon cible, sont des questions importantes pour la pérennité de cette idée. Dans les études passées, les cellules ont été irradiées sans vérifier que l'effet MB avait lieu dans les conditions de l'expérience, c'est à dire en milieu aqueux.

Pour pallier ce problème, on peut légitimement se poser la question de savoir si des nanoparticules peuvent avoir une rigidité suffisante pour éviter le recul. Cette question posée à des spécialistes de MB n'a pas obtenu de réponse. Certains éléments supportent l'idée que l'utilisation de nanoparticules permette d'obtenir une rigidité suffisante et une concentration importante d'isotopes dans la cellule afin d'avoir un effet même en milieu aqueux.

Pour résumer, les différentes recherches bibliographiques n'ont pas pu donner de réponse définitive à la question sous-jacente : l'effet MB est-il applicable dans le cadre d'une radiothérapie ?

Les paramètres d'une irradiation Mössbauer de cellules tumorales doivent être soigneusement déterminés par avance, sous peine de résultats difficiles à interpréter. Les choix des nanoparticules, du modèle cellulaire ou bien de l'énergie d'irradiation doivent être basés sur des considérations théoriques mais aussi bien souvent pratiques. Notre choix d'isotope Mössbauer s'étant porté sur le fer, le choix de nanoparticules de fer (NPFE) a été notre première tâche.

II.3 *Nanoparticules de Fer*

Bien qu'utilisées depuis de nombreuses années dans diverses applications, les nanoparticules de fer ont connu un regain d'intérêt ces derniers temps, comme le prouvent les publications récentes.

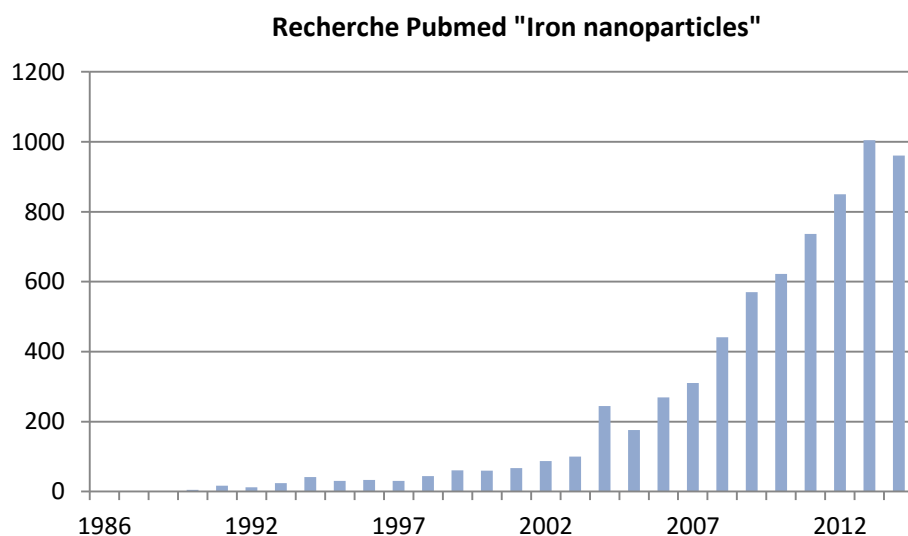


Figure II-23 : Nombre de publications concernant les nanoparticules de fer sur la période 1986-2014 d'après PubMed.

Il existe de nombreux types de nanoparticules d'oxydes de fer : wüstite FeO, magnétite Fe₃O₄, hématite α-Fe₂O₃, maghémite γ-Fe₂O₃, etc...

Leur utilisation varie de la décontamination des eaux afin d'enlever les colorants, les métaux lourds ou bien les composés aromatiques (Saharan et al. 2014); (Araújo, Castro, and Fiúza 2015), jusqu'à des applications dans la médecine clinique pour traiter l'anémie, imager les nœuds lymphatiques ou bien les cancers de la tête et du cou (Cortajarena et al. 2014).

Leur dimension nanométrique leur confère un caractère superparamagnétique très intéressant pour le ciblage magnétique (Batlle and Labarta 2002). En quelques mots, lorsqu'un matériau ferromagnétique ou ferrimagnétique atteint une taille suffisamment petite, le morcellement en sous-domaines d'orientation magnétique différente disparaît pour laisser place à un domaine d'aimantation unique. Cette aimantation peut se renverser sous l'effet de la température car l'excitation thermique est alors suffisante pour surmonter la barrière énergétique et changer aléatoirement l'orientation du mono-domaine magnétique. L'aimantation moyenne apparaît nulle en l'absence de champ magnétique, on parle de rémanence nulle. En revanche en présence d'un champ magnétique externe on observe un fort paramagnétisme, c'est-à-dire une forte aimantation dans la direction imposée par le champ magnétique extérieur. Cet effet est appelé le superparamagnétisme.

Ces propriétés magnétiques font du fer des agents de contraste particulièrement adaptés pour l'Imagerie par Résonance Magnétique car ils accélèrent la relaxation longitudinale ou bien transverse des protons, et apportent donc un plus grand contraste à l'image. On peut trouver d'excellentes revues des agents de contraste IRM utilisés en clinique (Wang, Hussain, and Krestin 2001);(Villaraza, Bumb, and Brechbiel 2010).

De l'IRM à la thermo thérapie (Obaidat, Issa, and Haik 2015), les nanoparticules d'oxyde de fer offrent des propriétés intéressantes comme outils théranostiques, pouvant combiner thérapie et diagnostic, grâce à leur anisotropie de surface, leur interface d'échange et leur interaction dipolaire

particulière, mais également le couplage entre leurs domaines magnétiques internes (Dennis et al. 2015).

Pour le traitement des tumeurs, les nanoparticules se présentent comme des vecteurs idéaux dans de nombreux cas. Certains procédés de fabrication permettent de conserver une cavité au sein de la nanoparticule pouvant piéger des molécules d'intérêt, principalement des agents anti-tumoraux. Ces nanovecteurs transportent les molécules actives depuis le site d'injection jusqu'au tissu tumoral par effet EPR (Enhanced Permeability and Retention), un effet décrit depuis 1986 (Matsumura and Maeda 1986). La perméabilité de la vascularisation tumorale est en effet plus élevée que pour un tissu sain, et le drainage lymphatique est moins efficace, ce qui entraîne une accumulation naturelle des nanoparticules dans la tumeur après une injection systémique (par voie sanguine). Les nanoparticules délivrent alors leur contenu de manière régulière, par exemple du sulforaphane pendant plus de trois jours (Do et al. 2013). Cette délivrance continue *in situ* d'agents anti-tumoraux représente une piste intéressante pour le développement de futurs traitements (Figure II-24).

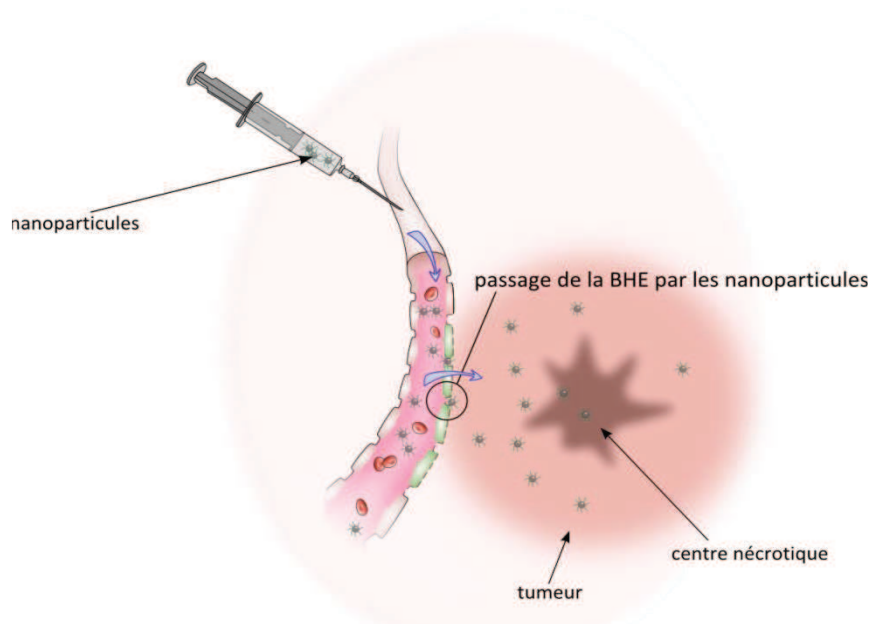


Figure II-24 : Des nanoparticules injectées dans le sang peuvent naturellement traverser la Barrière Hémato-Encéphalique poreuse au niveau de la tumeur et s'y accumuler. Schéma illustratif.

Les nanoparticules de Fer ont trouvé ces dernières années de nombreuses applications en biotechnologies. Leur processus de fabrication a été raffiné peu à peu, permettant de mieux contrôler leur taille et leurs propriétés de surface afin d'améliorer leur biocompatibilité.

Les nanoparticules de fer peuvent être internalisées dans les cellules par différents mécanismes. L'endocytose est un processus complexe rassemblant plusieurs procédés différents en fonction de la taille des objets, tels que la phagocytose, la macropynocytose. D'autres phénomènes impliquant la clathrine ou la cavéoline (Canton and Battaglia 2012) sont également possibles qui peut mener à une concentration importante des nanoparticules dans les cellules. Cette internalisation peut être influencée par différents paramètres : l'ajout de molécules dans le milieu de culture (protamine (Golovko et al. 2010)), le milieu de culture lui-même (Geppert et al. 2012) ou encore le ciblage à l'aide d'un peptide en surface [(Reddy et al. 2006), (Porkka et al. 2002)].

La présence des NP de fer induit une modification du dépôt de dose. Des solutions de dosimétrie en milieu liquide existent et permettraient de mettre en évidence l'augmentation de dose attendue.

II.4 Dosimétrie in situ et augmentation de dose

Le but d'un traitement de radiothérapie est de déposer de l'énergie par rayonnement au sein de la tumeur. Pour cela il faut augmenter le différentiel entre la dose à la tumeur et la dose aux tissus sains. Une partie de nos efforts se sont tournés vers un moyen de quantifier *in situ* la dose déposée lors d'une irradiation. Cela permet de quantifier l'augmentation de dose causée par les différents éléments ajoutés au traitement, dans notre cas des nanoparticules de fer. Plusieurs solutions ont été envisagées car il est très difficile de mesurer une augmentation de dose qui peut être extrêmement locale autour des nanoparticules.

II.4.1 Etat de l'art de la dosimétrie

De nombreuses solutions existent pour mesurer le rayonnement d'une source. Les photons émis ne déposent pas directement leur énergie aux tissus, mais la transfèrent aux électrons du milieu

traversé. Ces électrons ionisent ensuite les milieux via des ionisations et des excitations des molécules présentes. La fraction d'énergie transmise par les photons aux électrons du milieu, de manière non radiative, s'appelle le coefficient massique de transfert d'énergie : $\frac{\mu_{en}}{\rho}$ ($\text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$). Ses valeurs dépendent de l'énergie des photons ainsi que du matériau traversé. Elles sont tabulées pour les principaux éléments ainsi que pour les matériaux d'intérêt dosimétrique dans le rapport 46 de l'International Commission on Radiation Units and Measurements (1992).

Au cours de l'histoire et avec le développement de la dosimétrie, de nombreuses unités ont vu le jour. La dose a été définie comme la quantité d'énergie déposée par unité de masse. Le rad, établi en 1953, a été supplanté en 1974 par une unité 100 fois plus grande, le Gray (Gy) :

$$D = \Phi \frac{\mu_{en}}{\rho} \quad (14)$$

Avec D la dose en Gy (équivalent au $\text{J} \cdot \text{kg}^{-1}$), Φ la fluence photonique en $\text{J} \cdot \text{m}^{-2}$, $\frac{\mu_{en}}{\rho}$ le coefficient massique de transfert en énergie en $\text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$

Les dosimètres les plus courants sont ceux utilisés pour la radioprotection des travailleurs exposés à des rayonnements.

II.4.1.1 *Dosimètres relatifs de radioprotection*

Utilisés pour le contrôle des taux d'exposition au rayonnement sur des périodes longues dans le cadre de la santé au travail, par exemple pour les travailleurs de catégorie B, ces dosimètres passifs mesurent principalement des doses faibles. Ils s'intéressent non seulement à la dose mais à l'équivalent de dose, qui prend en compte la nocivité du rayonnement par rapport aux tissus. Ils sont très souvent constitués de matériaux thermoluminescents (fluorure de calcium ou fluorure de lithium). Chauffer ces matériaux provoque une émission de lumière proportionnelle à la dose reçue par le matériau. C'est donc une dosimétrie *a posteriori*. Au CEA, les dosimètres de radioprotection à usage personnel sont récupérés et lus chaque trimestre.

D'autres technologies permettent une dosimétrie absolue et active, pour un suivi instantané de l'irradiation.

II.4.1.2 *Chambres d'ionisation*

Au synchrotron la dosimétrie est effectuée avec des chambres d'ionisation. Elles servent à mesurer la dose ou bien à contrôler le faisceau. Le gaz présent dans la chambre est ionisé par le rayonnement et les charges produites proportionnellement sont récupérées par une anode. Le courant est transmis à un électromètre qui l'interprète en dose. Cette dose est ensuite directement convertie en dose dans l'eau. Les chambres d'ionisation sont en général prévues pour des champs d'irradiation couvrant tout leur volume sensible et sont étalonnées avec des sources polychromatiques, c'est-à-dire comportant un spectre d'énergie assez large. Au synchrotron le faisceau est de petite dimension (1 mm de hauteur pour 15 cm de large) et monochromatique, ce qui peut poser des problèmes. Le volume sensible de la chambre d'ionisation est donc translaté le long du faisceau.

La chambre PTW Semiflex ion chamber 31002 (Freiburg, Allemagne) possède un petit volume sensible de 0,125 cm³. Elle est calibrée dans l'air pour des énergies allant de 30 keV à 50 MeV, et est habituellement positionnée à l'endroit où l'échantillon va être irradié. C'est le détecteur de référence. Le débit de dose dans l'eau (en Gy/mA/s) est estimé d'après la lecture L (valeur corrigée de la température et de la pression) de l'électromètre (PTW UNIDOS) auquel elle est connectée (facteur de calibration intégré et modifiable par l'utilisateur) :

$$\dot{D}_{eau,éch} = \frac{L}{I \cdot \Delta t} \cdot \frac{\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)_{eau,E}}{\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)_{air,E}} \quad (15)$$

Avec I le courant électronique dans l'anneau de stockage du synchrotron au moment de la lecture (en mA), Δt le temps d'exposition de la chambre au faisceau (en secondes) et $\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)_{matériau,E}$ les coefficients massiques d'absorption en énergie de l'eau et de l'air à l'énergie considérée.

Le facteur de correction pour la température et la pression qui lui est modifiable par l'utilisateur, prend la forme :

$$k_{T,P} = \frac{T \cdot P_0}{T_0 \cdot P} \quad (16)$$

T_0 et P_0 sont les température et pression de référence (293,15K et 1013,25 hPa respectivement).

Une autre chambre d'ionisation a été utilisée pour la dosimétrie des sources Mössbauer conventionnelles au CEA. La chambre PTW 23342 (Freiburg, Allemagne) possède un volume sensible de 0,02 cm³. Elle est spécifique pour les rayons X de basse énergie et sa réponse est linéaire avec la dose, pour des énergies allant de 10 à 100 keV.

Des chambres d'ionisation travaillant en mode intégration de charges sont placées dans la cabine optique sur le parcours du faisceau. Elles servent de sécurité pour éviter de dépasser une dose seuil fixée par les médecins pour les patients impliqués dans les protocoles d'irradiation, pour l'angiographie (Bertrand et al. 2005) ou bien la SSRT (Prezado et al. 2011), qui permettent une mesure de la dose absolue absorbée dans l'eau avec une précision de 2%. Une fois calibrées, ces chambres permettent de vérifier la dose effectivement délivrée à un échantillon, au cours d'une irradiation.

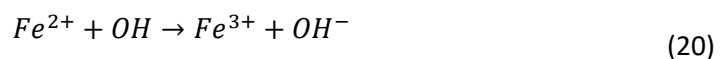
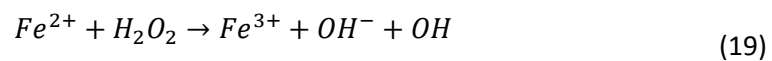
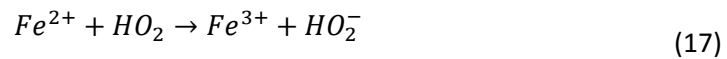
II.4.1.3 *Dosimètres solides*

Les films radiochromiques EBT3 (Ashland, KY, Etats-Unis) sont spécifiquement développés pour la dosimétrie en radiothérapie. La lecture du gel est faite par Densité Optique (DO) dans 3 couleurs (en rouge pour plus de sensibilité, en vert pour les hautes doses, en bleu pour plus d'uniformité) avec un simple scanner. Ils sont peu sensibles à la lumière (voir § III.3, p. 99).

D'autres dosimètres solides se présentent souvent sous forme de gels, qui peuvent permettre par IRM ou tomographie X de remonter à une distribution de dose en 3D. Le dosimètre solide de référence est le gel de Fricke. En 1927, Fricke propose de s'appuyer sur la transformation des ions d'une solution

ferreuse (ions Fe^{2+}) en ions Fe^{3+} sous l'effet de la radiolyse de l'eau après irradiation, pour mesurer la dose déposée. Dans le cadre de la radiolyse de l'eau, des radicaux OH° et H° sont produits 10 à 100 ps après le passage de la particule ionisante. Les OH° en solution ont été proposés comme principaux responsables des dommages biologiques. En effet, Fulford *et al* (Fulford et al. 2001) ont déterminé que dans certaines conditions, entre 50 et 70% des dommages à l'ADN produits en radiothérapie standard par rayons X sont causés par les radicaux OH° .

Les H° réagissent avec le dioxygène dissous pour former un radical hydroperoxyde (HO_2). La réaction chimique du Fe^{2+} avec, dans le cadre de la radiolyse de l'eau, se décompose ainsi :



Au bilan, le rendement d'oxydation des ions ferreux en ions ferriques $G(Fe^{3+})$ dans la solution de Fricke s'écrit :

$$G(Fe^{3+}) = 2G(H_2O_2) + 3G(H) + G(OH) \quad (21)$$

En 1984, Gore propose d'utiliser l'IRM pour cartographier la dose en volume (Gore, Kang, and Schulz 1984). Les ions sont stabilisés dans un gel pour conserver l'information spatiale. Pour une revue du gel de Fricke, voir la référence (Schreiner 2004). Son principal inconvénient vient de la diffusion des ions fer dont les conséquences sont très visibles dans les zones de fort gradient, et sa lecture en RMN doit être rapide après irradiation, ce qui n'est pas toujours possible.

En 1993, Maryanski propose d'utiliser un gel qui polymérise sous l'action d'un rayonnement ionisant, opacifiant la zone irradiée (Maryanski et al. 1993). Leur lecture est plus facile puisqu'elle n'est plus limitée à l'IRM, mais est également possible par tomographie optique, X ou bien par échographie. Fong (Fong et al. 2001) améliore l'idée en rajoutant un antioxydant aux solutions de monomères, ce qui facilite grandement leur préparation, rendue possible en présence d'oxygène. On parle de gels normoxiques. L'étude des gels normoxiques de polyacrylamide pour la dosimétrie en radiothérapie a donné lieu à plusieurs travaux de thèses [(Vergote 2005); (Boudou 2006)]. Ces travaux ont montré qu'il est possible de mesurer avec des gels NPAGs l'augmentation macroscopique de dose induite par un agent de contraste iodé mélangé uniformément dans le gel (Gastaldo et al. 2008). La mesure reproduit fidèlement l'évolution du DEF en fonction de l'énergie (Figure II-25).

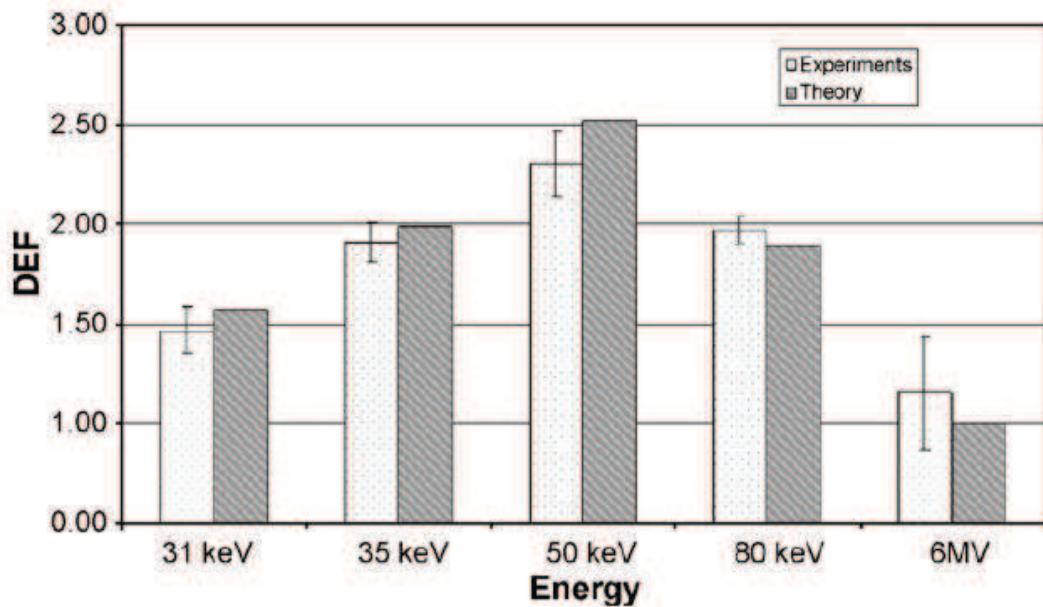


Figure II-25 : Facteurs d'augmentation de dose en présence de 10 mg/ml d'iode dans un dosimètre nPAG à différentes énergies. Comparaison du DEF théorique avec les données expérimentales. Issu de (Gastaldo et al. 2008).

II.4.1.4 Dosimètres liquides

Pour notre application, à savoir l'observation de l'augmentation du dépôt de dose en présence de NPFe, nous nous sommes tournés vers un dosimètre chimique liquide, à lecture différée.

Les gels NPAGs dont nous avons validé l'utilisation pour mesurer l'augmentation de dose avec des agents de contraste iodés, ne peuvent pas être utilisés avec les nanoparticules de fer qui gênent la lecture optique, X ou IRM. Cela nous apporte une mesure *in situ*, ainsi qu'une analyse rapide *a posteriori* et une facilité de préparation des échantillons pour comparaison.

De nombreuses molécules ont été utilisées comme dosimètres potentiels. La version liquide du dosimètre de Fricke en est un exemple [(Fricke and Hart 1966)]. Version liquide du dosimètre solide, il se lit par spectrophotométrie ou par titration. Il fonctionne selon le même principe mais comporte de sévères limitations. Il est utilisable pour des doses comprises entre 10 et 10^4 Gy, et pour un rayonnement d'énergie supérieure à 500 keV.

Des modifications lui ont été apportées, jusqu'à aboutir au FBX [(Bansal et al. 2013)]. En combinant le sulfate de fer, l'acide benzoïque et le xylénol orange, ils ont acquis une sensibilité à une dose minimale de 6 cGy, dans une gamme d'énergie de 33 à 1250 keV. Le FBX a été utilisé *in situ* dans un fantôme d'irradiation de la vessie et du rectum. Ses performances ont été comparées avec les calculs d'un logiciel de planning de traitement. Ils ont abouti à une différence de dose de 3,5%. Le FBX se lit par densité optique (DO) à 540 nm, 30 minutes après irradiation. Sa réponse est indépendante de l'énergie et de la température, mais la solution est très complexe à préparer et toxique.

Une autre solution consiste à détecter les OH° produits par l'hydrolyse de l'eau lors d'une irradiation. Ces OH° ont une durée de vie très limitée (10^{-9} secondes) et sont difficilement détectables. En revanche les produits d'interaction avec certaines molécules ont des durées de vie beaucoup plus longues et sont mesurables plus ou moins facilement. Cette mesure indirecte des OH° permet de remonter à la dose déposée. Gutteridge [(Gutteridge 1981) ;(Halliwell and Gutteridge 1981) ;(Aruoma 1994)] a utilisé la formation d'adduits TBA-MDA (un composé rose qui absorbe à 532nm et qui se forme après chauffage à bas pH d'acide thiobarbiturique) sur la 2-désoxyribose pour mesurer la formation des OH° en présence de fer.

II.4.1.5 *Dosimètres liquides fluorescents*

Lorsque le produit de la réaction chimique est fluorescent, la lecture en est considérablement simplifiée et la sensibilité souvent améliorée. Des recherches ont donc été menées pour développer ce type de dosimètre. La réaction des OH^\bullet avec la molécule considérée produit une nouvelle molécule qui est fluorescente. La mesure de cette fluorescence permet de remonter à la quantité d' OH^\bullet produite par le dépôt de dose. Plusieurs candidats ont été envisagés :

L'acide téréphtalique (Figure II-26) [(W. A. Armstrong et al. 1963) ;(Matthews 1980) ;(Fang, Mark, and von Sonntag 1996)].

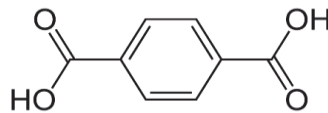


Figure II-26 : Acide téréphtalique, $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4$, aussi appelé acide paraphtalique, il entre dans la composition du PET.

D'autres ont utilisé l'acide benzoïque (Figure II-27) [(William A. Armstrong, Black, and Grant 1960) :

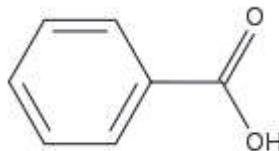


Figure II-27 : Acide benzoïque, de formule $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$.

Ces essais ont mis en évidence des problèmes d'instabilité des produits de réaction après l'irradiation.

L'utilisation de la Rhodamine B (Beshir et al. 2014) (Figure II-28) quant à elle présente les inconvénients d'une part d'être très sensible à la lumière, il faut garder l'échantillon dans le noir complet, et d'autre part de mesurer seulement des doses élevées comprises entre 100 et 2000 Gy.

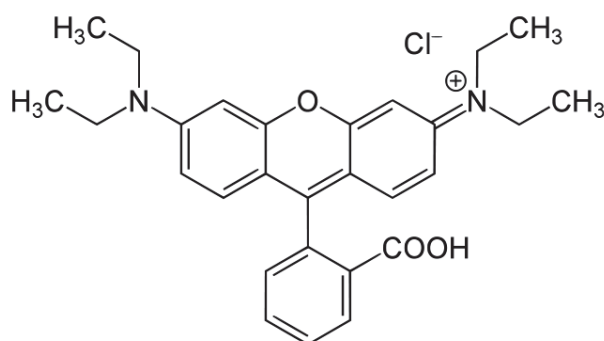


Figure II-28 : Rhodamine B, de formule $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$.

Composé fluorescent émettant à 610 nm.

D'autres enfin ont utilisé la coumarine native [(Gopakumar et al. 1977) ;(Ashawa, Kini, and Madhvanath 1979)] ou légèrement modifiée comme son ester succinimidyle [(Makrigiorgos et al. 1993) ;(Subrata Chakrabarti et al. 1996) ;(S. Chakrabarti et al. 1998)] ou bien sa forme 3-acide - carboxylique (3CC) qui s'oxyde en ombelliférone (7-hydroxy coumarine, 7OHC) lorsqu'elle est irradiée, par l'action des OH^\bullet (Figure II-29) [(Collins 1994) ;(Manevich, Held, and Biaglow 1997)].

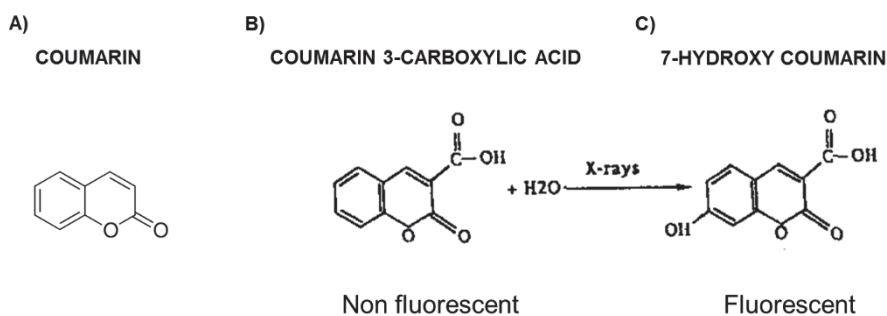


Figure II-29 : Principe de fonctionnement du dosimètre à base de coumarine. A) Molécule de coumarine, $C_9H_6O_2$. B) Cette modification de la molécule n'est pas fluorescente et peut être oxydée par les OH^\bullet produits lors d'une irradiation. C) L'ombelliférone (7-hydroxy coumarine) se forme par hydroxylation en présence de OH^\bullet . Elle est fluorescente.

Louit [(Louit et al. 2005)] a détaillé les différents produits d'irradiation de la coumarine (3OHC, 4OHC, 5OHC, 6OHC, 7OHC, 8OHC) ainsi que la chaîne de réactions menant de la 3CC à la 7OHC. Il

montre que la 7OHC une molécule insensible aux oxydations à un seul électron. Ce produit est donc spécifique des OH° , et Louit détaille ses vitesses de formation en fonction de la concentration en coumarine dans la solution.

Cécile Sicard-Roselli a utilisé la coumarine comme dosimètre et montré l'importance de l'interaction liquide-nanoparticule dans la production d' OH° (Sicard-Roselli et al. 2014). L'effet radiosensibilisant ne proviendrait pas premièrement des interactions directes du rayonnement avec les nanoparticules mais des interactions des nanoparticules avec les éléments produits par radiolyse dans le milieu.

Maeyama [(Maeyama et al. 2011)] confirme le résultat obtenu par Manevich [(Manevich, Held, and Biaglow 1997)]. Ils donnent respectivement un rendement de 5% et 4,4% de la réaction de conversion 3CCO en 7OHC après irradiation quel que soit le LET du rayonnement (de 0,2 à 1000 eV/nm).

En 2012 Yamashita *et al* [(Yamashita et al. 2012)] utilisent un faisceau d'électrons pour déterminer, par radiolyse pulsée, que la 3CC interagit bien avec les OH° et avec les électrons hydratés, avec des constantes de 6.8×10^9 and $2.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivement. Ils déterminent ensuite par simulation que le rendement de conversion de 3CC en 7OHC par les OH° est de 4,4%.

II.4.1.6 La 2'-désoxyadénosine (dAdO)

Une solution de dosimétrie intéressante s'est présentée à nous à travers des travaux entamés par Jean-Pierre Pouget en 1998 au LAN. En listant les conséquences d'une irradiation gamma sur les bases de l'ADN il a observé, entre autres, (Frelon et al. 2000) que la 2'-désoxyadénosine (dAdO, $C_6H_{13}N_5O_3$) s'oxydait en 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyadénosine (8-oxo dAdo) au contact des HO° (Figure II-30).

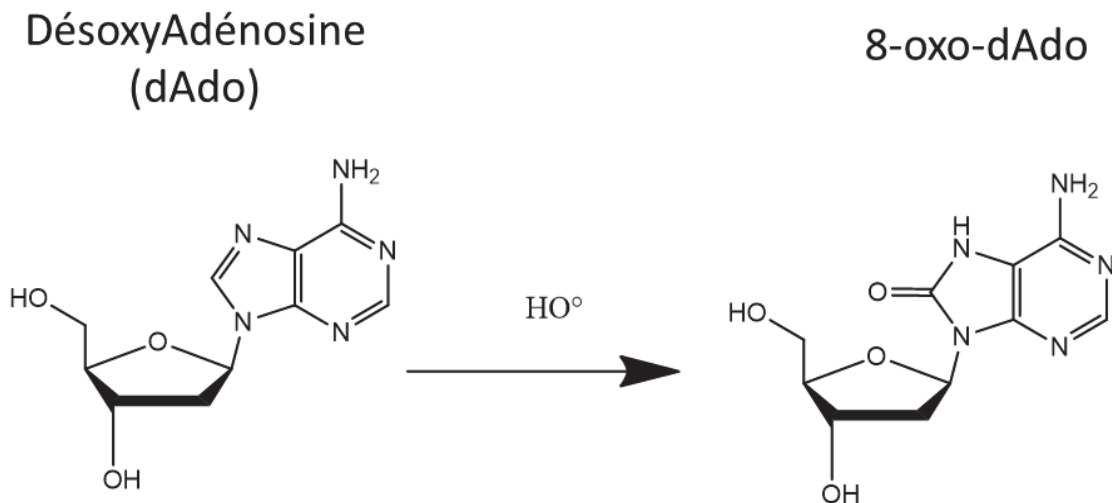


Figure II-30 : Principe de fonctionnement du dosimètre à base de dAdO. Réaction d'oxydation de la dAdO en présence d' HO° .

La formation de 8-oxo dAdo est linéaire avec la dose, contrairement à la formation de 8-oxoGuanine, l'homologue purinique qui elle se décompose rapidement. Elle est sensible à partir de 50 mGy. Elle est spécifique des HO° et le produit de réaction est stable dans le temps, à des températures de $-20^\circ C$, $+4^\circ C$ ou $+25^\circ C$ pendant 30 jours. Dans un milieu oxygéné, le taux de formation de la 8oxo-dAdo dépend directement du rendement de formation de OH° estimé à 2,7 molécules/100 eV. L'analyse se fait par HPLC-MS/MS (Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem), une technique qui associe une analyse par chromatographie en phase liquide avec une détection spécifique par spectrométrie de masse. La dAdO en solution aqueuse a déjà été confirmée

comme dosimétrie liquide, grâce aux résultats obtenus par Jean-Pierre Pouget puis Florence Taupin lors de travaux précédents (Figure II-31).

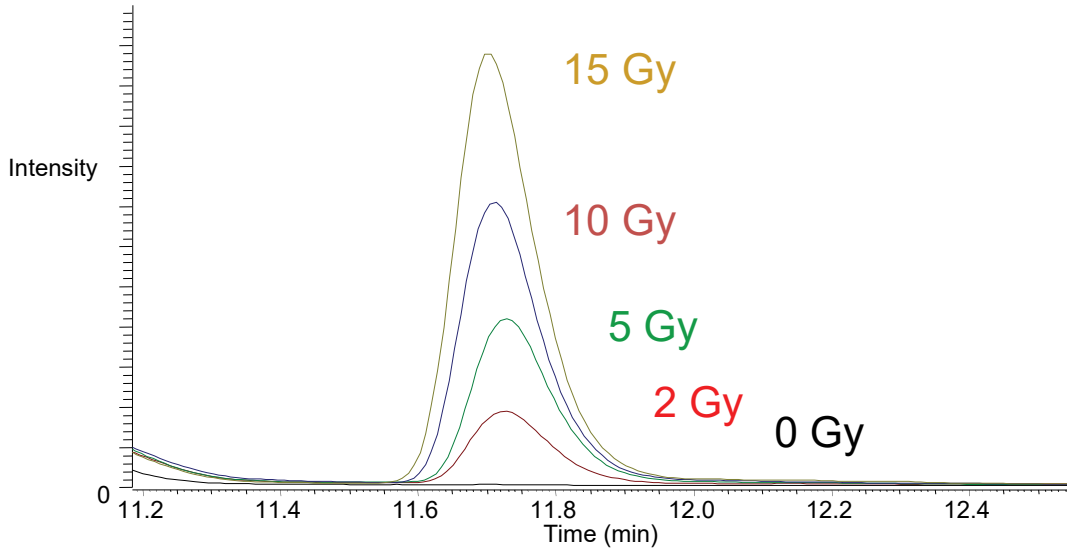


Figure II-31 : Détection de 8-oxodAdo par HPLC-MS/MS après irradiation de dAdO à 10^{-4} M avec différents doses de rayonnement (Thèse Florence Taupin).

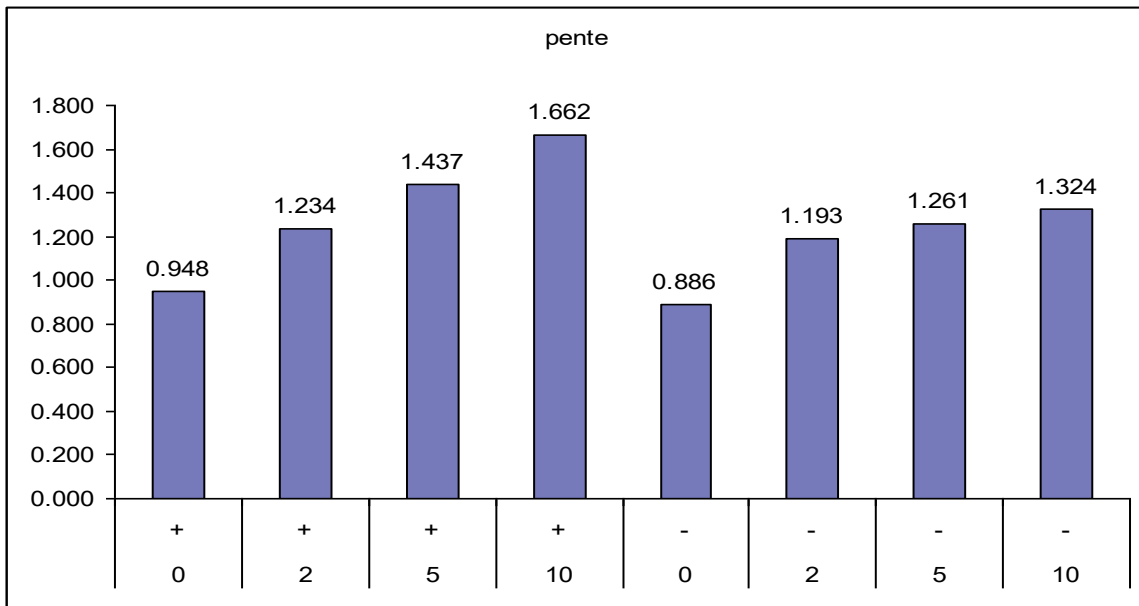


Figure II-32 : Mesurée par HPLC-MS/MS, la pente de formation de 8oxo-dAdO varie en fonction de la concentration de sels de Gadolinium et de l'énergie d'irradiation, en-dessous (-) et au-dessus (+) du K-Edge du Gadolinium. (Thèse Florence Taupin).

Cette quantification permet ensuite de tracer une pente de formation de la dAdO en fonction de la dose, et de mettre en évidence le rôle radiosensibilisant de sels de Gadolinium en fonction de l'énergie d'irradiation (Figure II-32).

Après ces états de l'art successifs, le chapitre suivant présentera les résultats obtenus en caractérisation des nanoparticules, leur fabrication, leur taille et leur poly-dispersion, ainsi que les résultats obtenus en dosimétrie.

CHAPITRE 3

Résultats physiques

III- *Résultats physiques*

Ce chapitre présente les résultats obtenus dans ce travail de doctorat pour préparer les expériences *in vivo* de radiothérapie.

Dans un premier temps nous avons cherché à mesurer les paramètres pouvant influencer nos expériences de radiosensibilisation de cellules tumorales avec des nanoparticules de fer. Pour cela, nous avons mesuré la taille et l'agrégation des nanoparticules, ainsi que leur potentiel Zêta.

Ensuite nous avons exploré les différents moyens de mesurer la dose lors d'une irradiation. Les dosimètres chimiques fluorescents nous ont paru la meilleure solution et nous avons donc fait quelques expériences avec la coumarine et la résazurine.

III.1 *Nanoparticules*

La recherche de nanoparticules d'oxyde de fer (NPF_e) disponibles aussi bien dans le commerce ou développées par des laboratoires de recherche nous a convaincus de la multiplicité infinie des fournisseurs. Cependant, les travaux de JK Kim et GH Choi présentant un fort intérêt pour une application de l'effet MB, nous les avons donc contactés. Ils ont en effet utilisé des nanoparticules (NPs) de Fe₃O₄, (contenant deux Fe(III) pour un Fe(II)) afin d'augmenter la radiosensibilité de cellules tumorales par effet photoélectrique à 7.1 keV sur la ligne IB2 du synchrotron Pohang Accelerator Laboratory en Corée du Sud (Choi *et al.* 2012). Leurs travaux seront détaillés dans le chapitre 3 de cette thèse. Leurs NPs sont recouvertes d'alginate afin de les maintenir dispersées en solution et d'augmenter leur temps de résidence dans le système vasculaire. JK Kim et GH Choi ont généreusement accepté de nous envoyer une quantité importante de leurs NPs (1,2 g sous forme de 80 ml à une concentration de 15 mg/ml) et nous avons pu travailler principalement avec ce lot. D'autres collaborateurs nous ont également transmis des lots de nanoparticules similaires (voir §

III.1.1.1, p. 79). Leurs propriétés d'interaction avec les cellules tumorales (internalisation, cytotoxicité) seront développées dans le chapitre 4.

III.1.1 *Caractérisation des nanoparticules*

III.1.1.1 *Procédé de fabrication*

Les nanoparticules produites en Corée du Sud par JK Kim et son équipe pour ses travaux de recherche (Choi et al. 2012) sont produites selon un procédé détaillé § V.1, p.157 [(Park et al. 2007),(Vijayakumar et al. 2000)] :

En mesurant la taille de 200 particules avant et après traitement de surface à l'alginate, Kim et al ont observé des tailles de $10,6 \pm 0,78$ nm et 13-15 nm respectivement.

80 ml de NPFe ainsi obtenues ont été envoyées au laboratoire en septembre 2013, un deuxième lot de NPFe équivalent a été renvoyé en juillet 2015, suite à l'intérêt porté par JK Kim à nos résultats. Afin de comparer ces NPFe avec d'autres, nous avons demandé à des collaborateurs chimistes et possédant les connaissances nécessaires pour la fabrication de nanoparticules de nous transmettre des NPFe produites selon le même procédé. Cécile Sicard-Roselli, du Laboratoire de Chimie Physique d'Orsay nous a envoyé deux lots, l'un avec coating et l'autre sans coating d'alginate. Stéphane Roux, chimiste à l'Institut UTINAM (Université de Franche-Comté / CNRS) nous a également transmis un lot de NPFe enrichies avec du ^{57}Fe fourni par nos soins ($^{57}\text{NPFe}$).

III.1.1.2 *Mesure de la taille par DLS*

D'après JK Kim, une nanoparticule de fer de 13 nm représente plus de 6000 atomes de fer.

Le diamètre hydrodynamique d'une nanoparticule correspond à sa taille en comptant son enveloppe d'hydratation, c'est-à-dire toutes les molécules d'eau qui sont adsorbées à la surface. Il est donc un peu plus grand que le diamètre réel de la nanoparticule.

Résultats physiques

La technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS) consiste à illuminer dans le visible une cuvette de spectroscopie contenant une solution diluée de nanoparticules et de mesurer la lumière transmise et diffusée, qui reflète le mouvement brownien. Cette diffusion de lumière dépend :

- des propriétés optiques du matériau constituant les nanoparticules et du liquide de suspension
- de la dispersion en diamètre hydrodynamique des nanoparticules qui modifie le mouvement brownien.

L'analyse de la variation temporelle du signal lumineux, plus particulièrement à travers son autocorrélation, permet de remonter par des modèles mathématiques à la distribution de taille des nanoparticules présentes dans l'échantillon. En effet, dans un temps donné, la variation de lumière diffusée par une grosse particule sera moins importante que par une petite particule.

Olivier Renard du laboratoire DRT/LITEN/DTNM/SEN/LSIN au CEA Grenoble m'a formé à l'utilisation d'un appareil de DLS, le Zetasizer Nano-ZS (Malvern, Royaume-Uni) (Figure III-1).



Figure III-1 : Appareil de DLS Zetasizer Nano-ZS de Malvern au CEA.

Une mesure de DLS nécessite une cuvette de spectrophotométrie remplie au quart d'eau distillée. Une goutte de l'échantillon très dilué est versée dans la cuvette. L'appareil moyenne 12 mesures espacées de 10 secondes afin de prendre en compte la décantation éventuelle de l'échantillon. Le résultat d'une mesure de DLS pour les NPF de Kim *et al* se présente sous cette forme (Figure III-2):

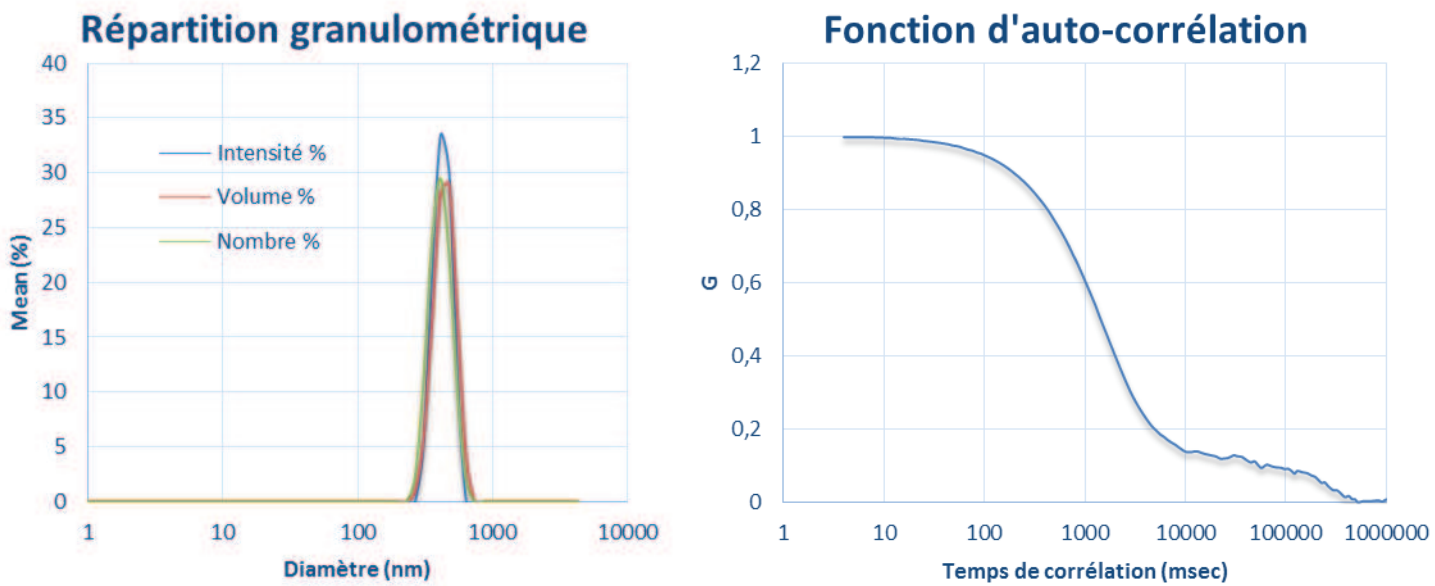


Figure III-2 : La fonction d'auto-corrélation issue de la mesure de DLS permet de déterminer par modèle mathématique la répartition granulométrique de l'échantillon. (Zetasizer Nano-ZS, CEA)

La valeur moyenne du diamètre est de 571 nm, ce qui indique qu'elle n'est pas composée de nanoparticules individuelles mais d'un grand nombre de nanoparticules agglomérées.

Résultats physiques

Les différentes NPFe obtenues précédemment ont été mesurées par DLS : Les deux lots de NPFe venues de Corée du Sud, les NPFe enrichies en ^{57}Fe par S. Roux et enfin les deux lots fournis par Cécile Sicard, avec coating et sans coating d'alginate. La poly-dispersion observée est assez grande, le facteur concerné variant entre 0 et 1. Chaque mesure moyenne trois dizaines de mesures consécutives. Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant.

Table III-1 : Mesures de DLS de nanoparticules de magnétite au Zetasizer Nano-ZS. Chaque ligne moyenne trente mesures et mentionne leur écart type. Le lot 1 a deux ans de plus que le lot 2, l'aggrégation y est beaucoup plus importante.

| Type de nanoparticules | Diamètre moyen (en nm) | Poly-dispersion |
|-------------------------|------------------------|-------------------|
| Lot 1 NPFe | 500.5 ± 118 | $0.491 \pm 0,087$ |
| Lot 2 NPFe | 117.03 ± 2.55 | $0.287 \pm 0,027$ |
| $^{57}\text{NPFe}$ Roux | 26.33 ± 1.99 | $0.366 \pm 0,034$ |
| Sicard sans Alginate | 345.3 ± 77.1 | $0.630 \pm 0,058$ |
| Sicard Alginate | $70.56 \pm 0,69$ | $0.180 \pm 0,020$ |

D'après ces mesures le lot de nanoparticules le plus homogène est celui envoyé par Cécile Sicard et recouvert d'alginate, en effet la poly-dispersion ainsi que l'écart entre les mesures sont faibles. Recouvrir les NPFe d'une couche d'alginate sert de dispersant, et empêche les nanoparticules de s'agglomérer. Les deux lots de NPFe sont agglomérés malgré leur couche d'alginate.

III.1.1.3 *Mesure du potentiel Zêta par DLS*

L'appareil Zetasizer Nano-ZS (Malvern, Royaume-Uni) permet également de mesurer le potentiel Zêta. Dans ce cas la cuvette est spécifique. Elle comporte une paire d'électrodes qui induisent un potentiel électrique dans la solution. Le potentiel Zêta, c'est la charge présente à la surface de la double couche électrique (DCE) qui caractérise l'interaction solide-liquide des colloïdes. Les ions de la solution qui portent une charge opposée à la charge de surface de la particule (les contre-ions) sont attirés par elle. Lorsque la particule bouge, une partie des contre-ions bouge avec elle. Elles définissent une surface qu'on appelle « plan de glissement » (slipping plane) et qui forme la limite externe de la DCE. Le champ électrique appliqué sur la solution permet de mesurer la migration des nanoparticules et d'en déduire la charge externe.

Les répulsions électrostatiques empêchant la sédimentation et l'agglomération, une suspension de nanoparticules affichant un potentiel Zêta élevé est plus stable qu'une autre avec un potentiel Zêta faible. Lorsque ce potentiel atteint zéro, les répulsions électrostatiques sont minimisées et les forces de Van Der Waals facilitent l'agglomération. Si la valeur absolue est supérieure à 30 mV, la répulsion électrostatique est considérée comme suffisante pour éviter l'agglomération pour des raisons électrostatiques, mais elle est toujours possible pour d'autres raisons (Hanaor et al. 2012).

La mesure de DLS sur le lot 1 des NPFe donne une valeur de $-21,7 \pm 4,09$ mV, C'est avec ce lot de nanoparticules, le premier à notre disposition, que nous avons procédé aux études cellulaires indispensables pour caractériser les effets physiques et biologiques de notre étude.

III.2 Mesures de dosimétrie

III.2.1 Coumarine

Pour obtenir une concentration de 3-acide carboxylique coumarine (3CC) de 10^{-4} M, nous avons utilisé un spectrophotomètre en lecture à 290 nm et la loi de Beer-Lambert donnant l'absorbance :

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot C \quad (22)$$

Avec, pour une longueur d'onde λ , A_{λ} : l'absorbance, ε_{λ} : le coefficient d'extinction molaire (en $\text{L}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), l : l'épaisseur de la cuvette utilisée (en cm) et C : la concentration molaire de la solution (en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Une petite recherche a permis de trouver la valeur du coefficient d'extinction molaire de 3CC à 290 nm (Tablet et al. 2012) : $\varepsilon_{290 \text{ nm}} = 12115 \text{ L}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Pour chaque expérience la concentration de 3CC était vérifiée en mesurant l'absorbance à 290 nm dans une cuvette de 1 cm, puis en divisant le résultat par $\varepsilon_{290 \text{ nm}}$ pour obtenir la concentration en 3CC de l'échantillon.

III.2.1.4 Mesure de la fluorescence sans nanoparticules

Nous avons comparé deux moyens de mesure de la fluorescence de la 7OHC après irradiation : le Fluodrop et le HPLC-Fluo.

III.2.1.4.1 Lecture au Fluodrop

Le Fluodrop (Nanodrop, ThermoFisher, DE, Etats-Unis) présent au laboratoire permet de mesurer rapidement la fluorescence issue de très petits volumes ($1 \mu\text{l}$), sur un spectre de 220 à 750nm.

Afin de déterminer la linéarité de la mesure au Fluodrop, des échantillons de 3-acide carboxy coumarine à 10^{-4} M ont été irradiés à 1,25 MeV sur la source ^{60}Co du dispositif « Anémone » de ARC Nucléart au CEA Grenoble.

Radiothérapie par photoactivation de nanoparticules et effet Mössbauer

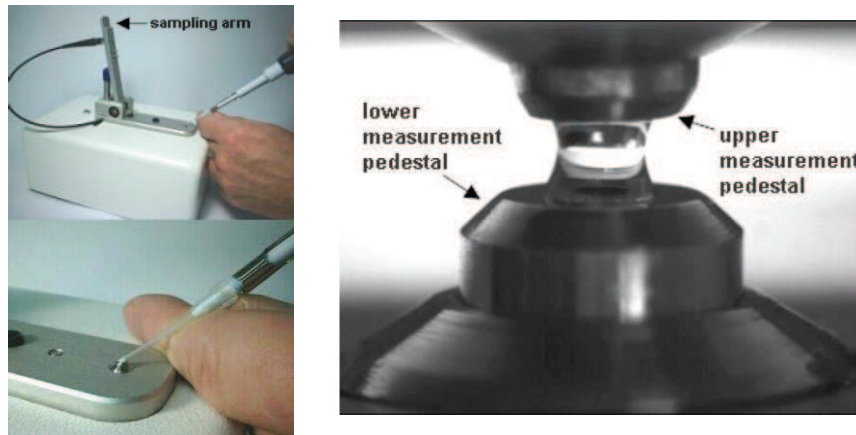


Figure III-3 : Le Fluodrop permet de mesurer rapidement la fluorescence de petits volumes. A gauche, le dépôt de l'échantillon est extrêmement simple. A droite, le volume complet de l'échantillon est mesuré instantanément.

Les mesures de fluorescence à 440 nm, juste après et 24h après irradiation, sont présentées Figure

III-4.

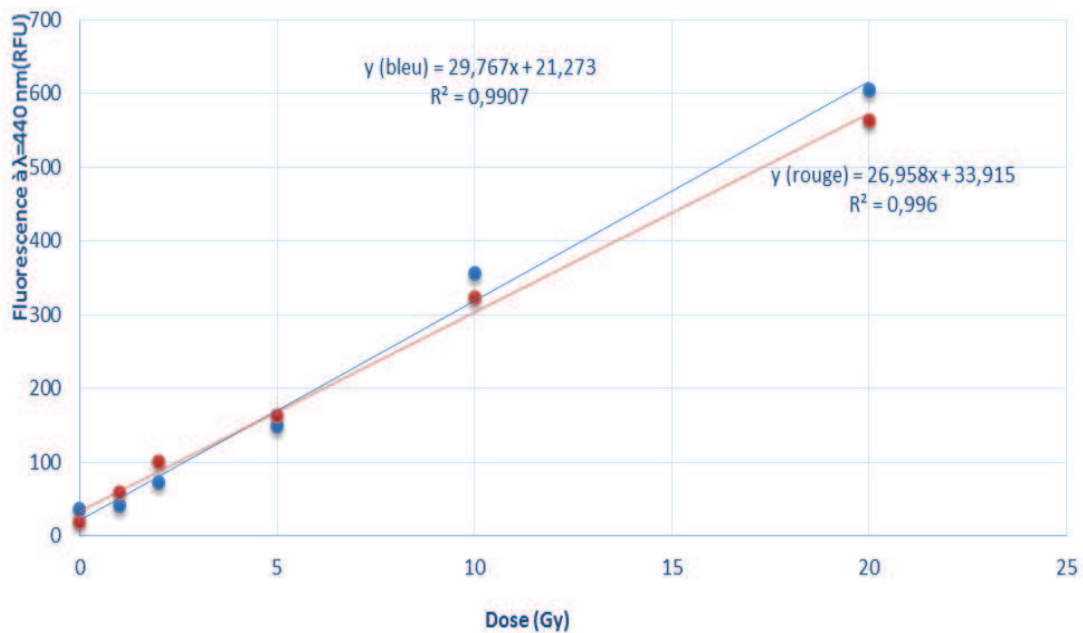


Figure III-4 : Lecture au Fluodrop de solutions de 3CC (10^{-4} M). Irradiation gamma à 1,25 MeV. Débit de dose : 2,25 Gy/min. Mesure juste après irradiation (en bleu) et après 24h (en rouge).

Chaque échantillon est mesuré en moins d'une minute. L'appareil nécessite d'être rapidement nettoyé entre chaque acquisition. L'apparition de fluorescence due à la transformation du 3CC en 7OHC est linéaire avec la dose, et relativement stable pendant 24H.

Des échantillons irradiés sur la ligne ID17 par un faisceau monochromatique à 80 keV ont été également mesurés au Fluodrop (Figure III-5).

Mesure au Fluodrop de coumarine irradiée à l'ESRF

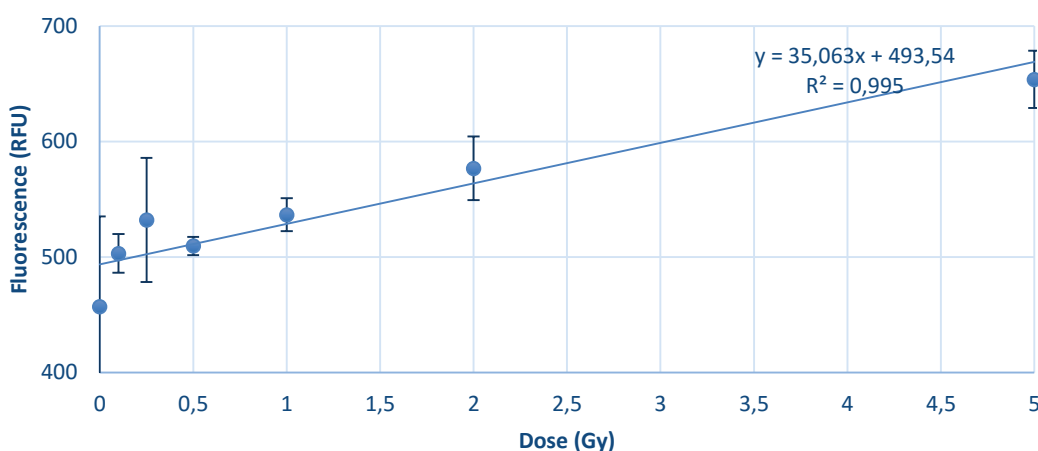


Figure III-5 : Irradiation de 3CC (10^{-4} mM) avec un faisceau monochromatique de photons à 80 keV sur ID17. Lecture en triplicat au Fluodrop, 24h après irradiation. On observe une forte valeur basale dont on n'a pas l'explication, qui écrase la dynamique observée dans la **Figure III-4**.

III.2.1.4.2 Lecture au HPLC + détecteur de fluorescence

Un détecteur de fluorescence a été ajouté en sortie de HPLC (1200 Series) afin d'améliorer la mesure. Ce détecteur mesure la fluorescence émise par les espèces chimiques après la séparation des espèces chimiques à l'aide d'une colonne en phase inverse de type : colonne de silice greffée C18 type uptipshère 5 μ M ODB 250*4.6 mm, éluée avec 5mM de formiate (Interchim, Montluçon, France). Cette séparation au HPLC nécessite une dizaine de minutes par échantillon. Le changement automatisé d'échantillon permet de lancer une centaine d'échantillon à la suite. En doublant la mesure de

fluorescence par une mesure en UV, on peut observer que la 3CC est visible en UV à 290 nm en plus d'être légèrement fluorescente, alors que la 7OHC est visible seulement en fluorescence. 7OHC sort de la colonne un peu plus tôt que la 3CC. Cela permet d'identifier la 7OHC de deux manières, et assure une bonne séparation des espèces.

Des mesures de fluorescence d'échantillons irradiés à 1,25 MeV et 80 keV nous a permis de comparer les performances des deux techniques de lecture (Fluodrop et HPLC-Fluo).

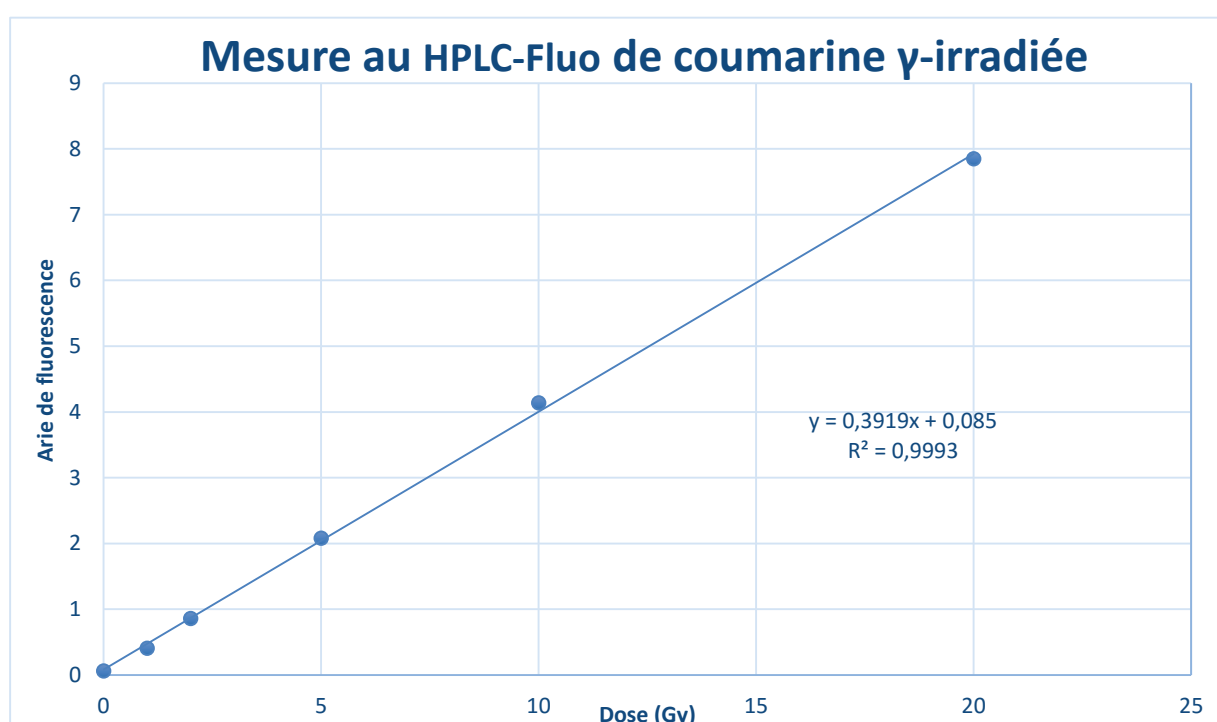


Figure III-6 : Mesure au HPLC-Fluo de la fluorescence émise 24h après irradiation par le 7OHC après purification.

On peut observer que la linéarité est meilleure au HPLC avec un R^2 de 0,9993, contre $R^2 = 0,9907$ au fluorodrop . De plus, la fluorescence parasite à 0 Gy est presque nulle grâce à la séparation des espèces chimiques, contrairement au Fluodrop qui mesure la fluorescence de toutes les molécules présentes dans l'échantillon.

Résultats physiques

La sensibilité à 1 Gy est très bonne, comme le montre la Figure III-7, ce qui présage une bonne sensibilité entre 0 et 1 Gy, une gamme de doses peu couverte par les dosimètres actuels.

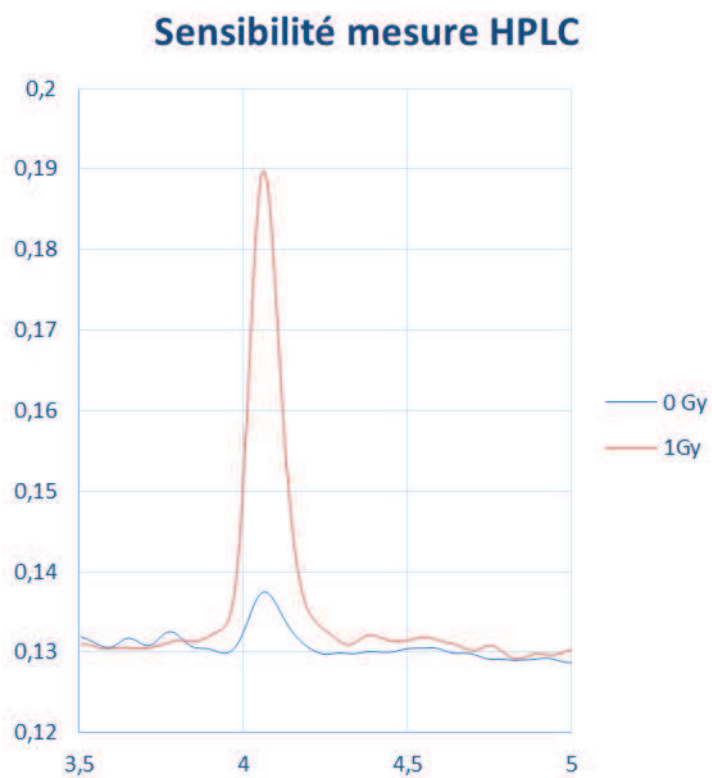


Figure III-7 : Sensibilité de la mesure au HPLC. La grande différence entre 1 Gy et 0 Gy démontre la sensibilité de la technique.

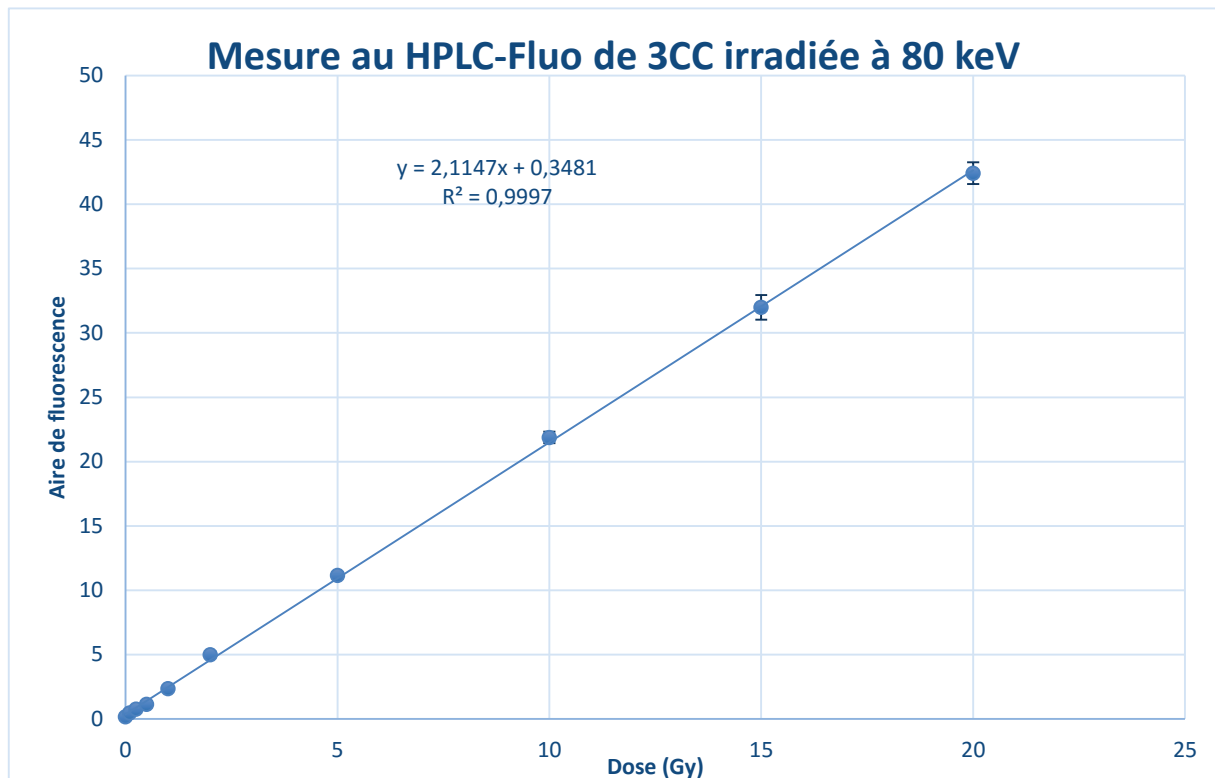


Figure III-8 : Irradiation de 3CCO (10⁻⁴ mM) avec un faisceau monochromatique de photons à 80 keV sur ID17. Lecture en triplicat de la 7OHC au HPLC-Fluo, 48h après irradiation.

La linéarité est très bonne ($R^2=0,9997$) et la valeur basale négligeable, signe d'une bonne séparation des espèces chimiques sources de fluorescence parasite. Les mesures faites en triplicat montrent très peu de disparité et les écart-types sont très faibles (compris entre 5 et 2% de la valeur mesurée). Cela montre que le HPLC-Fluo effectue une bonne séparation des espèces chimiques et diminue d'autant la fluorescence parasite. Le dosimètre est très sensible, il mesure une dose aussi faible que 10 cGy.

La lecture au HPLC-Fluo prend plus de temps mais permet des mesures plus spécifiques, plus sensibles et plus précises.

Pour comparer la réponse de la coumarine en fonction de l'énergie d'irradiation, des échantillons ont été irradiés au synchrotron à 35.3, 60 et 80 keV, ainsi que sur le dispositif « Anémone » au CEA à 1,25 MeV, avec deux débits de dose : 0,40 Gy·min⁻¹ et 2,25 Gy·min⁻¹. Le débit de dose des irradiations

Résultats physiques

à basse énergie a été maintenu à une valeur constante du même ordre de grandeur que le « High rate » en Gamma (2 Gy/ minute).

Les pentes de formation de 7OHC en fonction de la dose sont reportées sur le graphe suivant (

Figure III-9).

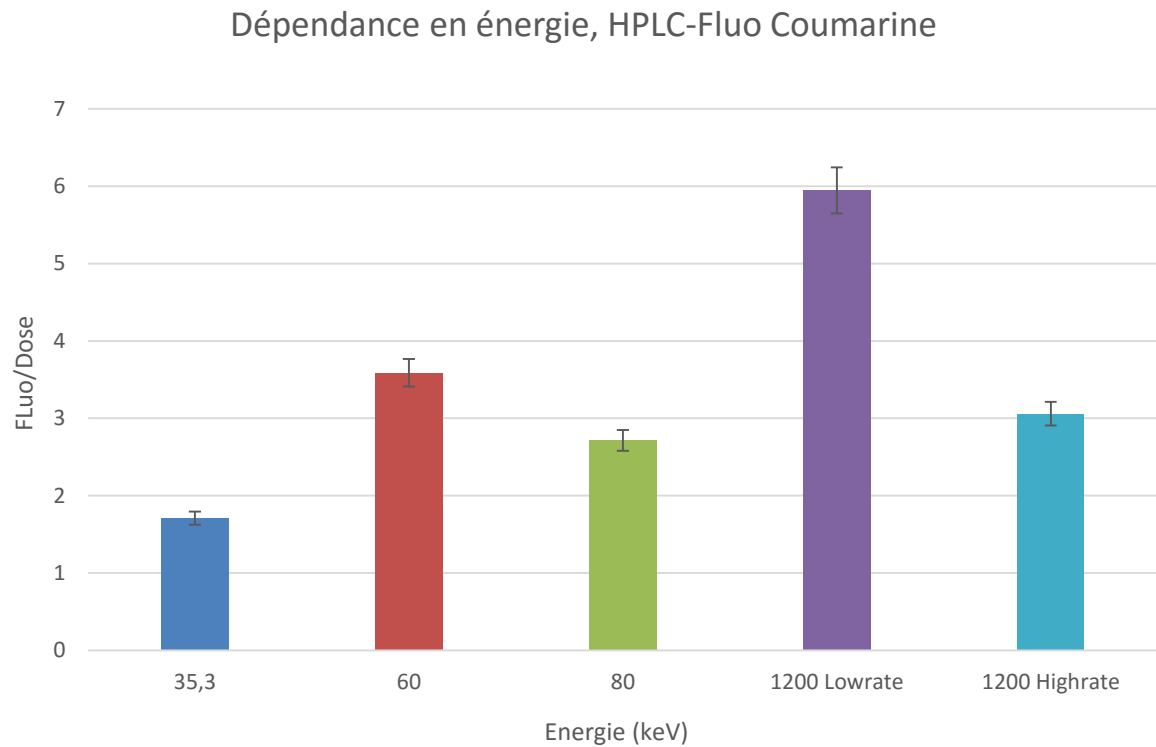


Figure III-9 : Pentas de formation de 7OHC en fonction de l'énergie d'irradiation, mesurée au HPLC-Fluo. Erreur fixée à 5%

Les deux débits de dose sur la source ^{60}Co ont permis de montrer que la formation de 7OHC dépend du débit de dose. Pour une même dose, la concentration de 7OHC augmente pour des débits de dose plus faibles. Ici un débit de dose 5,6 fois plus élevé à 1,2 MeV donne une pente deux fois moindre. Les expériences n'ont pu être réalisées qu'une seule fois, l'incertitude sur la mesure est donc donnée égale à l'écart type maximal des mesures de coumarine par HPLC, 5%.

III.2.1.5 *Mesure de la fluorescence avec nanoparticules*

Dans tous les essais que nous avons faits, nous n'avons pu obtenir de résultats probants en présence de nanoparticules, que ce soit après lecture au Fluodrop ou au HPLC-Fluo. A chaque fois la présence de nanoparticules empêche la mesure d'une augmentation de fluorescence avec la dose déposée. Pour essayer de comprendre ce phénomène nous avons introduit des nanoparticules de Fer dans un échantillon contenant 1 ml de coumarine préalablement irradié avec 20 Gy d'un rayonnement monochromatique à 60 keV sur ID17. L'évolution du signal de fluorescence, suivi en fonction du temps, pour deux échantillons distincts est tracée sur la Figure III-10. Pour chaque point, un aimant très intense est placé en dessous de l'Eppendorf pendant une minute, ce qui sépare les nanoparticules de la solution pour le prélèvement du μl nécessaire à la mesure par Fluodrop.

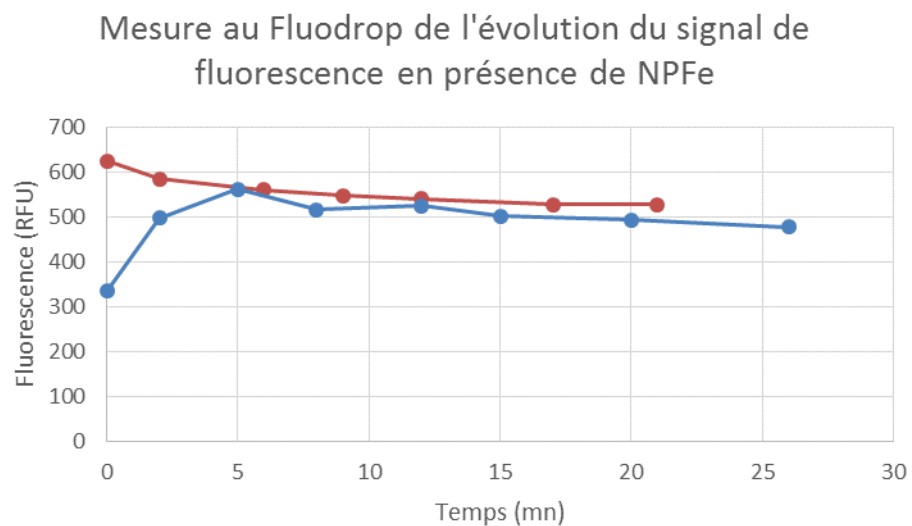


Figure III-10 : Evolution du signal de fluorescence mesuré par Fluodrop, après introduction de deux concentrations de NPFe. En rouge : 2 mg/mL, en bleu : 1 mg/mL.

Une pente descendante régulière affecte le signal de fluorescence, indiquant que le contact prolongé des NPFe avec la coumarine provoque une disparition complète de la fluorescence au bout de 2h30..

Résultats physiques

Pour éviter la présence des nanoparticules pendant une longue période après irradiation nous avons tenté de centrifuger chaque échantillon dans les minutes suivant leur irradiation, puis de prélever seulement le surnageant afin d'éliminer au maximum les NPFe de l'échantillon (Figure III-11).

La fluorescence en absence de nanoparticules est bien proportionnelle à la dose déposée, mais la présence de NPFe provoque la disparition du signal.

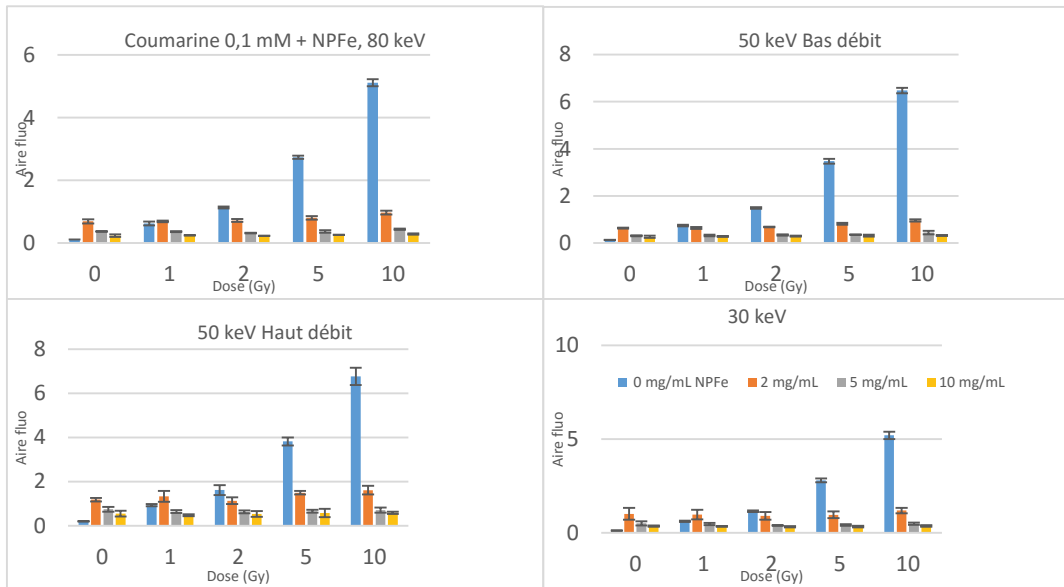


Figure III-11 : Fluorescence de la coumarine après irradiation en présence de nanoparticules. Mesure au HPLC-Fluo.

La précipitation des NPFe par centrifugation se révélant sans effet, nous avons essayé de provoquer cette précipitation avec du NaCl 4M. En introduisant le NaCl dans l'échantillon juste après l'irradiation, les nanoparticules présentes pendant l'irradiation pour augmenter le dépôt de dose sont immédiatement précipitées au fond de l'Eppendorfs.

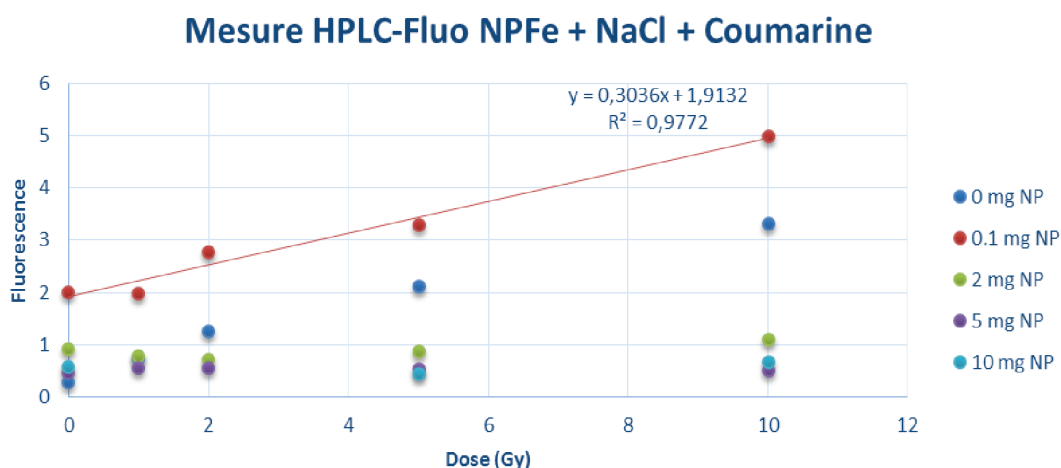


Figure III-12 : Mesure au HPLC-Fluo de la formation de 7OHC sous irradiation en présence de 10^{-4} M de 3CC, de NPFe et de NaCl 4 M. Même en absence de NPFe la mesure est détruite. La présence de NaCl empêche d'observer la formation de

Avec nos conditions expérimentales et malgré nos efforts, la coumarine n'a pas permis de quantifier la dose déposée dans les échantillons contenant des NPFe à ces concentrations de fer élevées.

Cécile Sicard-Roselli (Sicard-Roselli et al. 2014) a pu mesurer par la coumarine avec des concentrations de NP d'or très faibles l'augmentation de dose en présence de NPs.

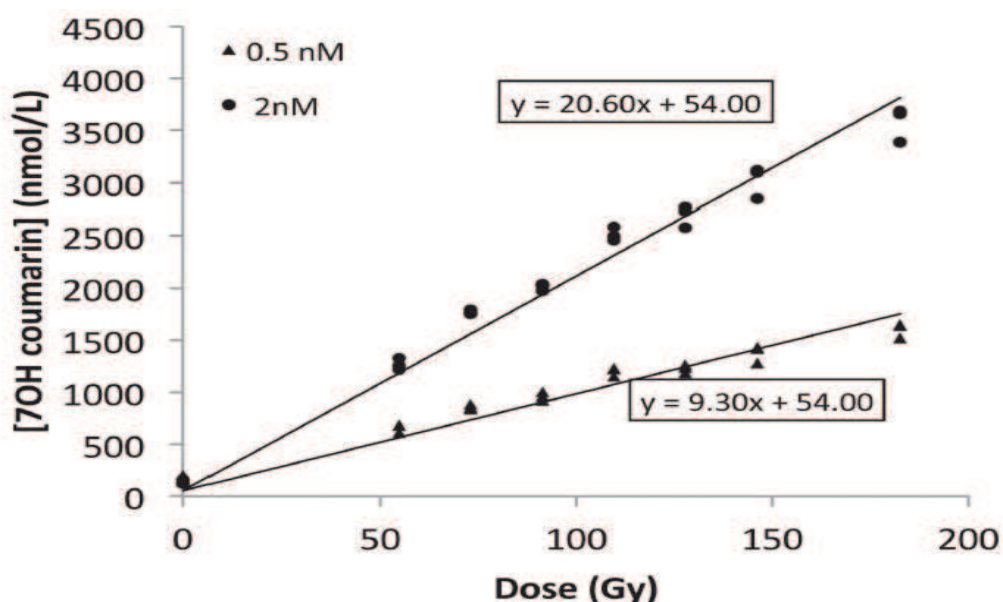


Figure III-13 : Concentration en 7OHC en fonction de la dose après irradiation à 20 keV à $2 \text{ Gy}\cdot\text{s}^{-1}$. Issu de (Sicard-Roselli et al. 2014).

D'autres molécules et d'autres techniques de mesure peuvent permettre d'obtenir des résultats en présence de nanoparticules.

III.2.2 Résazurine

III.2.2.6 Principe

Baldacchino *et al* (Balcerzyk and Baldacchino 2014) ont étudié le rendement de formation d'électrons aqueux sous irradiation en utilisant la molécule de résazurine (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) dans de l'eau désoxygénée par bullage de gaz neutre. Au contact des électrons aqueux la résazurine (RNO) subit une réduction en résorufine (RN, 7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one) fluorescente, induisant aussi un changement de couleur, du bleu vers le rose. Cette fluorescence est mesurable pendant l'irradiation grâce à un spectroscope de fluorescence et un laser utilisé comme source d'excitation. La cuvette contenant l'échantillon est illuminée par le laser pendant l'irradiation et la fluorescence induite est récoltée et analysée par le spectroscope. Le spectre en temps réel trahit l'apparition de fluorescence due à la réduction de la RNO en RN (Figure III-14).

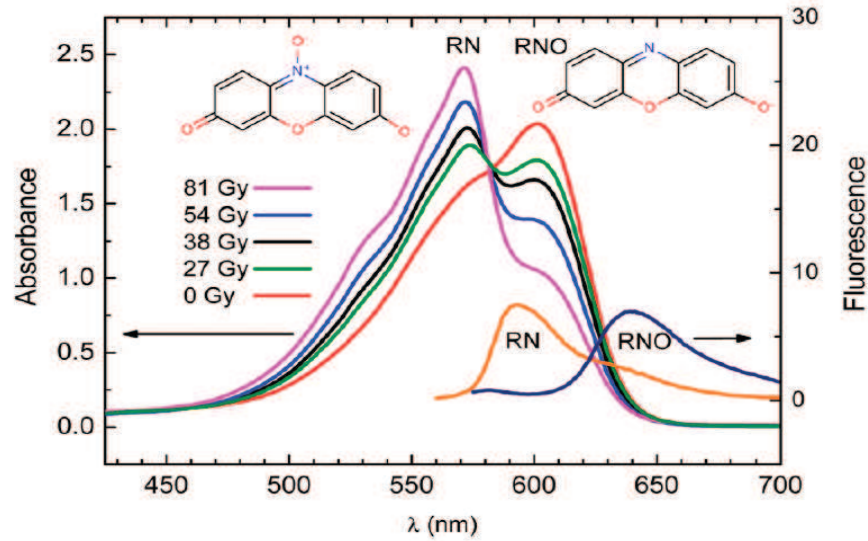
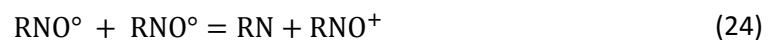
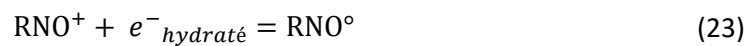


Figure III-14 : Spectre d'absorption d'une solution aqueuse saturée en Argon de $5 \cdot 10^{-5}$ M RNO en présence de *tert*-butanol, 10^{-2} M, irradié avec des rayons Gamma. Débit de Dose : $6 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$, chemin optique : 1 cm. Les spectres de fluorescence normalisés de RNO et RN sont donnés en bas à droite pour information (Balcerzyk and Baldacchino 2014).

Sans NPs, la pente à l'origine dérivant la concentration de RN en fonction de la dose déposée doit correspondre au rendement de l'électron hydraté divisé par 2 car il faut prendre en compte 2 réactions :



Il faut donc 2 RNO° , donc 2 $e^-_{\text{hydraté}}$ pour faire un RN (Balcerzyk and Baldacchino 2014).

III.2.2.7 Mesure de l'augmentation de dose en présence de NP de Gd

Gérard Baldacchino et Ibtihel Denden, du « Laboratoire Interactions, Dynamique et lasers » au CEA Saclay sont venus sur ID17 pour expérimenter leur dosimètre sur un faisceau monochromatique de rayons X et faire une preuve de faisabilité de la mesure d'augmentation de dose avec des nanoparticules de Gadolinium. La mise en place de cet appareillage sur la ligne ID17 lors d'un temps de faisceau auquel nous avons participé a permis de mesurer le rendement de formation des électrons aqueux sous un faisceau de rayons X monochromatique pour des énergies de 45 à 80 keV.

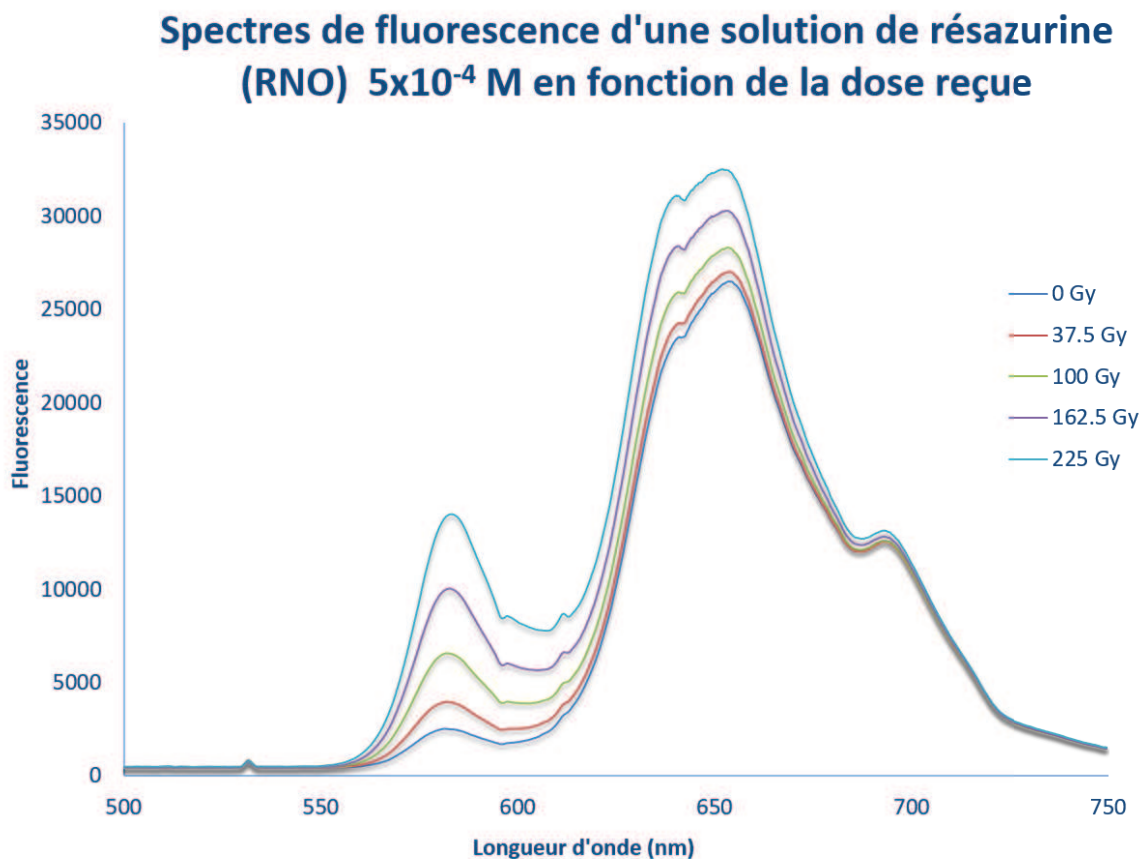


Figure III-15 : Spectres de Fluorescence d'une solution de RNO (5×10^{-4} M) en fonction de la dose reçue à 80 keV. La solution de résazurine (RNO) contient initialement une impureté de résorufin (RN). (Baldacchino *et al.*, non publié)

Les résultats obtenus et qui feront l'objet d'un article montrent que la présence de nanoparticules de Gadolinium (NPGd) augmente le rendement de formation de la RN. De plus, le rendement

radiolytique de la RN augmente de pair avec la concentration de NPGd. Cependant les doses déposées pour observer ces effets sont très importantes, bien au-delà de 100 Gy. Pour être quantitatif et mesurer précisément cette augmentation, d'autres essais devront être effectués en contrôlant le débit de dose pour maintenir les doses déposées entre 0 et 100 Gy.

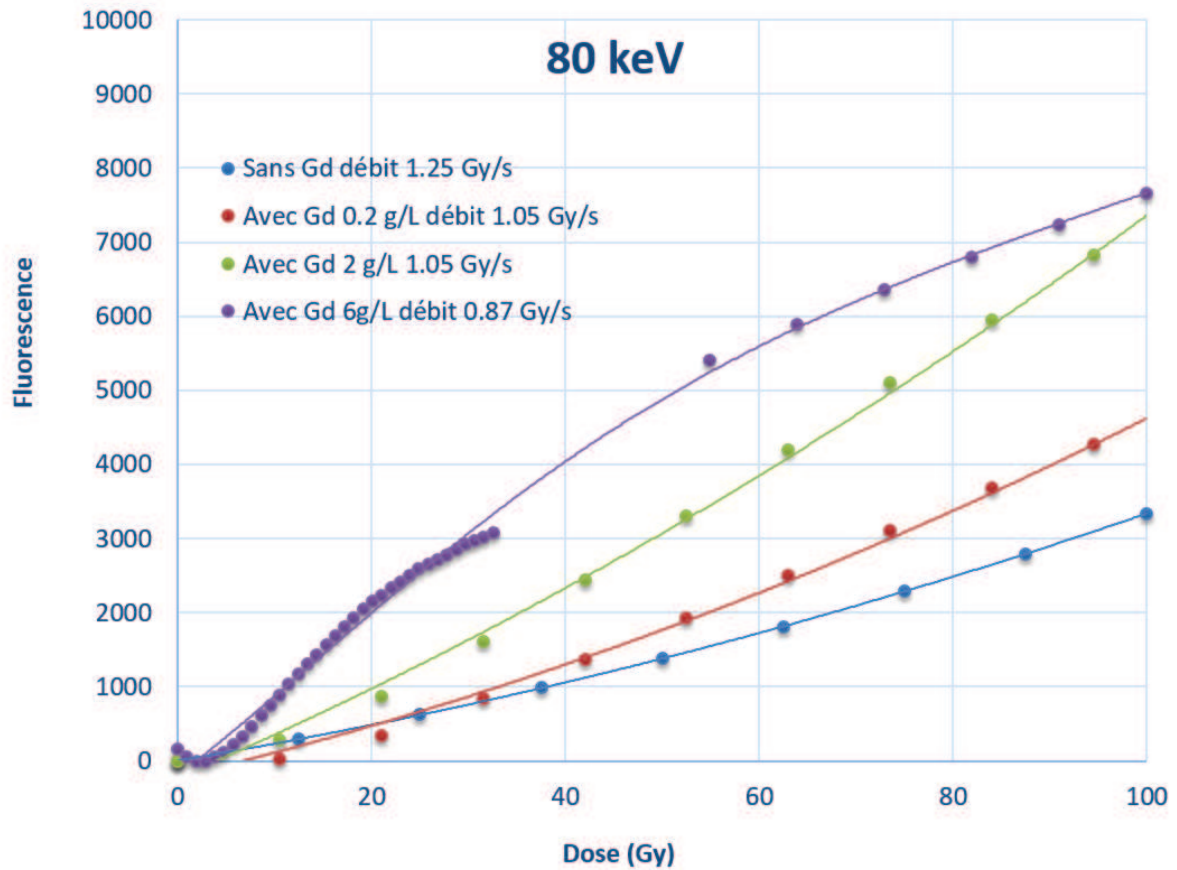


Figure III-16 : Maximum de fluorescence de RN formé sous irradiation monochromatique à 80 keV en fonction de la dose. Solution initiale de RNO de concentration 5×10^{-4} M. (Baldacchino *et al.*, non publié)

Les résultats montrent également une variation de la vitesse de réduction de RNO en fonction du débit de dose. Comme observé avec la coumarine, pour une même dose, la concentration de RN augmente pour des débits de dose plus faibles (Figure III-17).

Résultats physiques

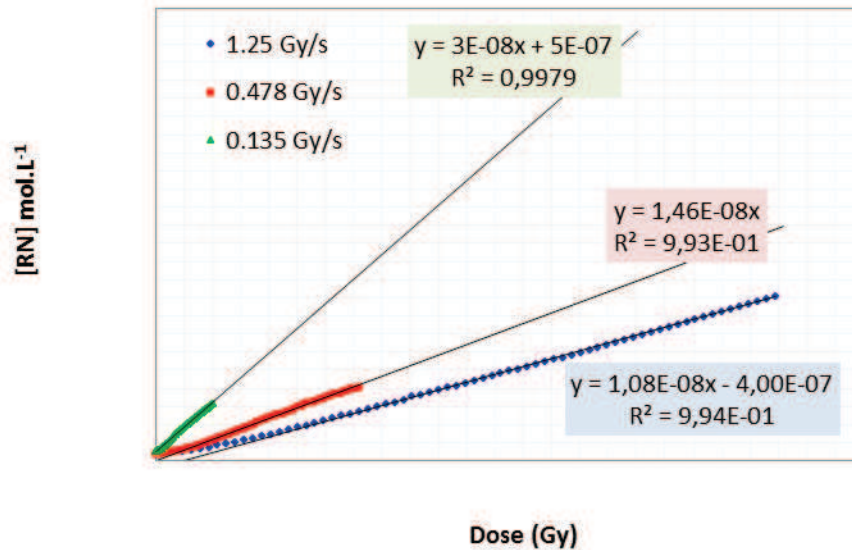


Figure III-17 : Effet du Débit de dose sur la formation de resorufin (RNO) irradiée par rayons X en fonction de la dose absorbée. Concentration de resazurin (RNO) : $5 \cdot 10^{-4}$ M, Energie : 80 keV. (Baldacchino et al, non publié)

Ici une augmentation du débit de dose d'un facteur 9 provoque une diminution de la pente d'un facteur 3. L'explication pourrait provenir des doses trop importantes. Le débit de dose sur la ligne ID17 est en effet très grand. Au-delà de 100Gy, les dosimètres sont souvent saturés ou en montre les signes par des changements de pente par exemple. La pente à l'origine (pour des doses comprises entre 0 et 100 Gy) des deux DdD les plus importants est assez similaire. Pour le plus faible débit de dose, il s'est passé autre chose qui donne une pente plus abrupte. Malgré nos efforts pour maintenir les conditions de l'expérience à l'identique, l'explication pourrait provenir d'une des causes suivantes:

- Modification de la détection
- Modification de l'intensité d'excitation par le laser
- Modification de la géométrie de détection

Une dernière hypothèse serait que les débits de dose deviennent si importants qu'ils modifient le rendement de l'électron hydraté. Or des rendements ont déjà été mesurés avec des single shot de 10 ns délivrant 20 Gy (DdD = 2 GGy/s). On est très loin de ces valeurs donc un effet du débit de dose est hautement improbable.

III.3 Gafchromic EBT3

Les films Gafchromic EBT3 (Ashland, KY, Etats-Unis) sont radiochromiques, c'est-à-dire qu'ils se colorent avec le rayonnement. Ils sont étudiés spécifiquement pour la radiothérapie et sont sensibles, d'après le fournisseur, à des doses comprises entre 1 cGy et 40 Gy. Ils sont constitués d'une couche centrale sensible de composition brevetée de 30 μm et de deux couches symétriques en polyester de 125 μm (Figure III-18).

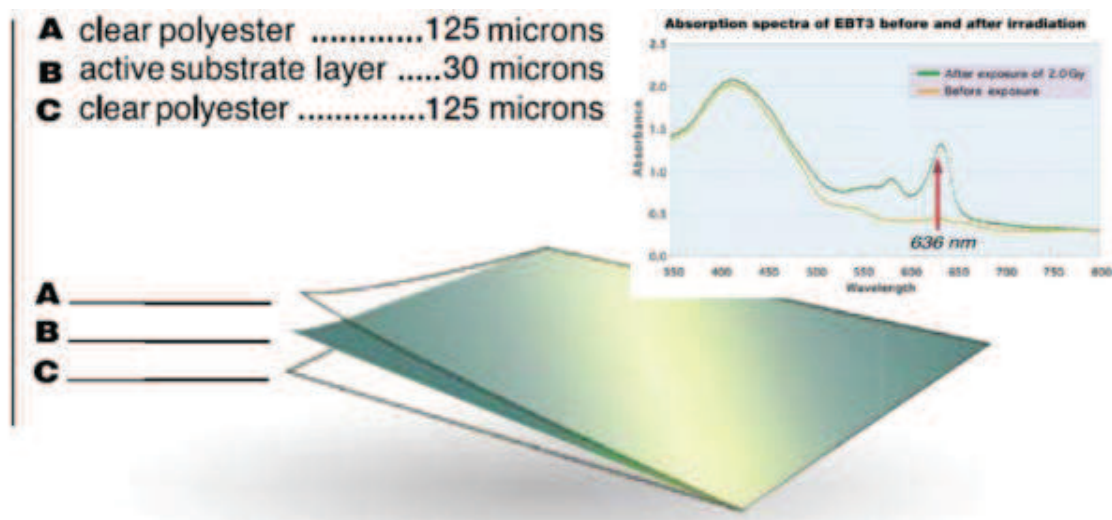


Figure III-18 : Composition du film EBT3. Une couche centrale sensible est entourée de deux couches symétriques en polyester de 125 μm . La différence de coloration la plus forte après irradiation se trouve à 636 nm.

La lecture des films EBT3 se fait l'observation de leur Densité Optique (DO) avec un simple scanner ou numériseur à balayage.

Une explication détaillée du protocole à suivre et de l'incertitude minimale atteignable (2% pour des doses supérieures à 0,4 Gy) se trouve dans un article de Devic *et al* (Devic et al. 2005). Pour minimiser l'incertitude liée au matériel de lecture, Devic prend en compte toutes les caractéristiques du scanner (pixel mort, etc...) pour déterminer la dose reçue par des films EBT (Prototype A) et HS. Les films sont scannés cinq fois avec une résolution de 0,113mm/pixel, et les DO sont calculées à partir d'une ROI de 2x2 mm, c'est-à-dire 18x18 pixels.

La formule simplifiée utilisée pour déterminer la DO des films EBT3 est la suivante :

Résultats physiques

$$DO = \log_{10} \frac{\text{moyenne des pixels de la zone irradiée}}{\text{moyenne des pixels d'un film blanc}} \quad (6)$$

Des films EBT3 ont été irradiés en triplicats par nos soins sur la source ^{60}Co du CEA, afin d'observer la réponse du film à des hautes énergies. Les DO ont été calculées à partir d'une ROI de 40x40 pixels (Figure III-19):

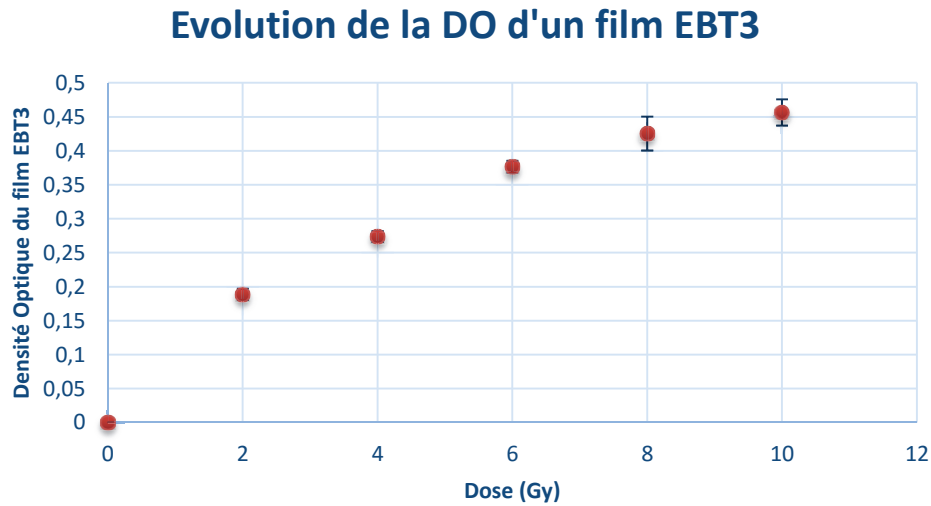


Figure III-19 : Irradiation Gamma à 1,25 MeV de films EBT3.

Pour observer la réponse du film EBT3 à des irradiations à différentes énergies, les films ont été irradiés sur la ligne ID17 et sur un générateur de rayons X à 6 MeV situé au CHU de Grenoble par les soins de Gaëtan Galisot (Figure III-20).

Evolution de la DO d'un film EBT3

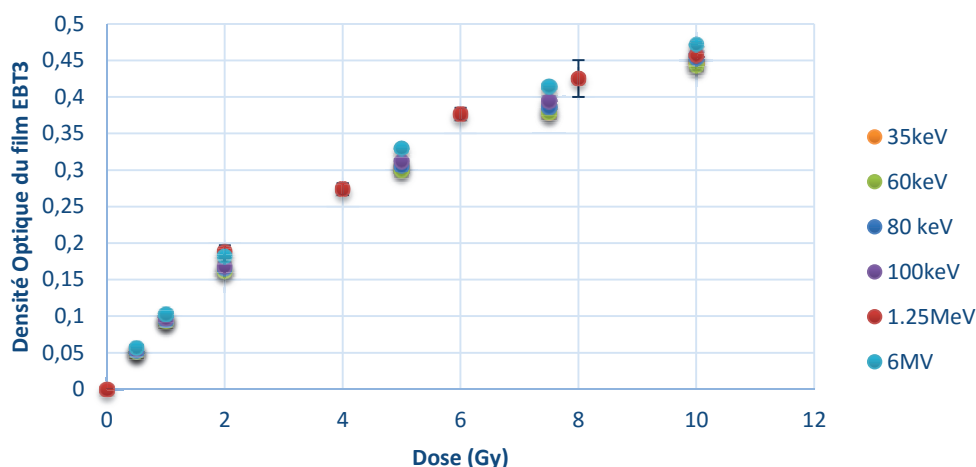


Figure III-20 : Irradiation à plusieurs énergies de films EBT3. La réponse générale du film est remarquablement similaire pour une gamme d'énergie très étendue.

Les courbes ont été approximées avec une fonction de la forme :

$$DO(\text{dose}) = \log_{10} \left(\frac{a+b \cdot \text{dose}}{c+\text{dose}} \right) \quad (7)$$

Les coefficients a b et c pour chaque énergie sont résumés dans le tableau suivant (Table III-2).

Table III-2 : Coefficients de la formule (7) page 101, des courbes de DO pour les films EBT3 à plusieurs énergies d'irradiation. Sum(diff^2) : Somme des carrés des différences entre les valeurs et la courbe de tendance.

| | 35keV | 60keV | 80 keV | 100keV | 1.25MeV | 6MV |
|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| sum(diff^2) | 3,61E-05 | 3,06E-05 | 2,47E-05 | 6,09E-06 | 5,25E-04 | 1,42E-05 |
| a | 30,18 | 47,12 | 37,20 | 37,28 | 19,77 | 24,91 |
| b | 7,93 | 10,79 | 9,40 | 9,59 | 6,65 | 7,82 |
| c | 29,57 | 45,84 | 36,50 | 36,45 | 19,74 | 24,80 |

La réponse des films EBT3 est peu dépendante de l'énergie d'irradiation. De 35 keV à 6 MeV la forme générale de la réponse radiochromique est identique, et les valeurs de DO évoluent entre 0 et 0,5 pour des doses de 0 à 10 Gy. Malgré son prix élevé, la facilité de mesure des films à l'aide d'un scanner, et sa réponse identique sur une large gamme d'énergie sont les principales qualités qui lui permettent d'être utilisé dans un contexte de radiothérapie.

III.4 Conclusion

La mesure de dose délivrée *in situ* en présence de nanoparticules en solution représente une perspective très intéressante pour l'évaluation de techniques physiques d'augmentation de doses. Beaucoup d'études Monte-Carlo mettent en évidence l'importance du dépôt de dose à l'échelle nanométrique autour des nanoparticules après une irradiation de photons [(Carter et al. 2007),(S. X. Zhang et al. 2009)], ou de protons (Wälzlein et al. 2014), la distribution de dose particulière pouvant entraîner la mort des cellules tumorales. Cependant l'observation expérimentale de cette augmentation de dose par effet photoélectrique est difficile. Bien que chaque dosimètre envisagé dans ces travaux (Coumarine, Résazurine) montre un comportement linéaire lors d'une irradiation, les nanoparticules perturbent la plupart de ces dosimètres, pendant l'irradiation ou bien lors de leur lecture *a posteriori*. Elles provoquent la décroissance continue du signal fluorescent de la coumarine en présence de NPFe, et détruisent le signal même lorsqu'on précipite les NPFe par centrifugation ou par l'ajout de NaCl.

Seule la RNO a permis de mesurer l'augmentation de dose en fonction de la concentration de NPGd à 80 keV. La fluorescence étant mesurée durant l'irradiation, elle n'est pas sensible aux perturbations des nanoparticules *a posteriori*. Comme pour la coumarine, la formation de RN varie à l'inverse du débit de dose. Contrairement à la 3CC, la RNO est sensible aux électrons aqueux. La différence entre OH° et électrons ainsi que la mesure pendant l'irradiation expliquent peut-être l'absence d'interférences avec les nanoparticules.

Malgré de grandes difficultés expérimentales, des solutions variées ont été explorées, avec plusieurs molécules, fluorescentes ou non, et impliquant des appareils de mesure allant du simple Fluodrop et du scanner jusqu'à des systèmes de HPLC- MS/MS plus imposants.

Pour conclure, un système simple de mesure de la dose déposée en solution permettant de mesurer la contribution de nanoparticules à de fortes concentrations n'est pas encore d'actualité. La

diversité de chimie de surface des nanoparticules complique encore la tâche. Une solution robuste face aux interférences des nanoparticules présenterait un intérêt conséquent pour la communauté scientifique, permettant de confirmer expérimentalement sans intermédiaire biologique (et donc sans variations liées aux lignées cellulaires) l'augmentation de dose en présence de nanoparticules calculée par simulation Monte-Carlo.

III.5 *Résumé de chapitre*

Dans ce chapitre, nous avons présenté les résultats de caractérisation des NPF_e. Malgré une taille individuelle de 13 nm mesurée par TEM, les nanoparticules s'agglomèrent et forment des agrégats de 500 nm, mesurés par DLS. Ensuite nous avons présenté plusieurs molécules envisagées pour mesurer la production d'OH° pendant une irradiation :

- La coumarine (3CC) se réduit au contact des OH° en 7OHC fluorescente. Mesurable au Fluodrop (échantillon très réduit et temps d'analyse minimum) ou bien au HPLC-Fluo (analyse plus longue mais séparation préalable des espèces chimiques, donc meilleure sensibilité et linéarité), la 7OHC est sensible et proportionnelle à la dose en absence de nanoparticules. Sa formation diminue avec l'augmentation du débit de dose. De nouveau la présence de nanoparticules perturbe le dosimètre. Nous avons tenté sans succès d'éliminer l'interférence des nanoparticules par centrifugation ou bien par précipitation en présence de sels.
- La résazurine RNO est réduite en résorufine au contact des électrons aqueux. Irradiée autour du K-Edge du Gd sur la ligne ID17 par Baldacchino *et al*, la fluorescence de la RN excitée par un laser est mesurée par un spectroscopie de fluorescence. Sa formation linéaire avec la dose, diminue cependant avec l'augmentation du débit de dose. La présence de NPGd n'a pas perturbé la mesure, qui a mis en évidence l'augmentation du dépôt de dose avec la concentration de NPGd.

Tester la RNO de G. Baldacchino et les protocoles de dosimétrie par 3CC de C. Sicard-Roselli sur les nanoparticules de fer pourrait apporter des informations précieuses pour le développement de nouvelles radiothérapies impliquant les NPF_e.

CHAPITRE 4

Résultats biologiques

IV- Résultats biologiques

Ce chapitre présente les résultats obtenus dans cette thèse impliquant des cellules et concernant les applications de radiothérapie.

IV.1 Interactions NPFe et cellules tumorales

IV.1.1 Modèle cellulaire tumoral

Le modèle de gliome utilisé, aussi bien pour les études *in vitro* que pour l'implantation de tumeur chez les rats est le modèle F98 de gliome de rat, du fournisseur ATCC.

Ce modèle a été obtenu après une injection intraveineuse de N-éthyl-N-nitroso-urée à une rate Fischer gestante au 20^e jour de gestation (Swenberg et al. 1972). Les tumeurs issues de ce procédé ont subi un examen anatomo-pathologique, et le modèle F98 a été classifié comme un gliome anaplasique ou indifférencié (Ko, Koestner, and Wechsler 1980).

Les tumeurs issues de cellules F98 sont très agressives et entraînent une faible réponse immunologique (Barth and Kaur 2009). Une semaine après l'injection de 1000 cellules F98 dans un cerveau de rat Fischer, la tumeur croît exponentiellement et le volume tumoral après 14 jours est estimé à 30 mm³ (Fournier et al. 2003).

In vivo, la survie des rats en fonction du nombre de cellules injectées est décrite par la formule suivante (obtenue expérimentalement)

$$S = -2,9 \ln(n) + 46j \quad (25)$$

Avec n : le nombre de cellules injectées, et j : le temps de survie des rats (en jours).

Les cellules F98 sont adhérentes et leur temps de doublement en culture est proche des 19h. Elles sont détachées de la surface par de la trypsine (voir § V.2.2, p. 158).

Résultats biologiques

Elles sont fusiformes et ont un diamètre moyen de 10 μm , comme le montrent les images suivantes (Figure IV-2).

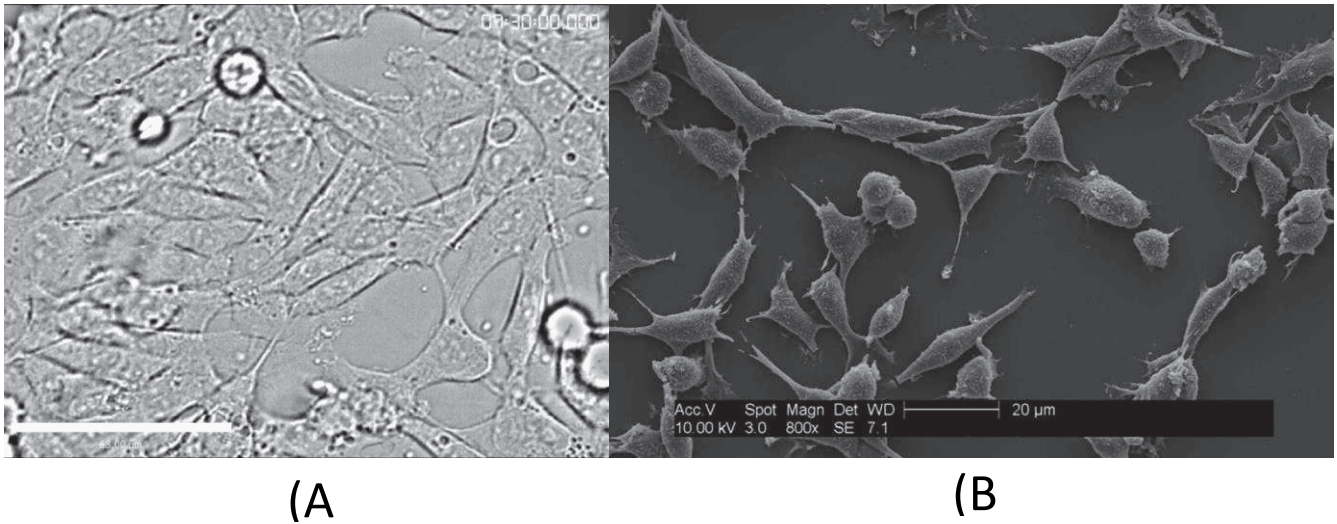


Figure IV-2 : Imagerie de Cellules F98 : (A) : Microscopie optique en culture (x400). Échelle : 63 μm (B) : Microscopie électronique à balayage (x800) effectuée par Florence Taupin. Échelle: 20 μm .

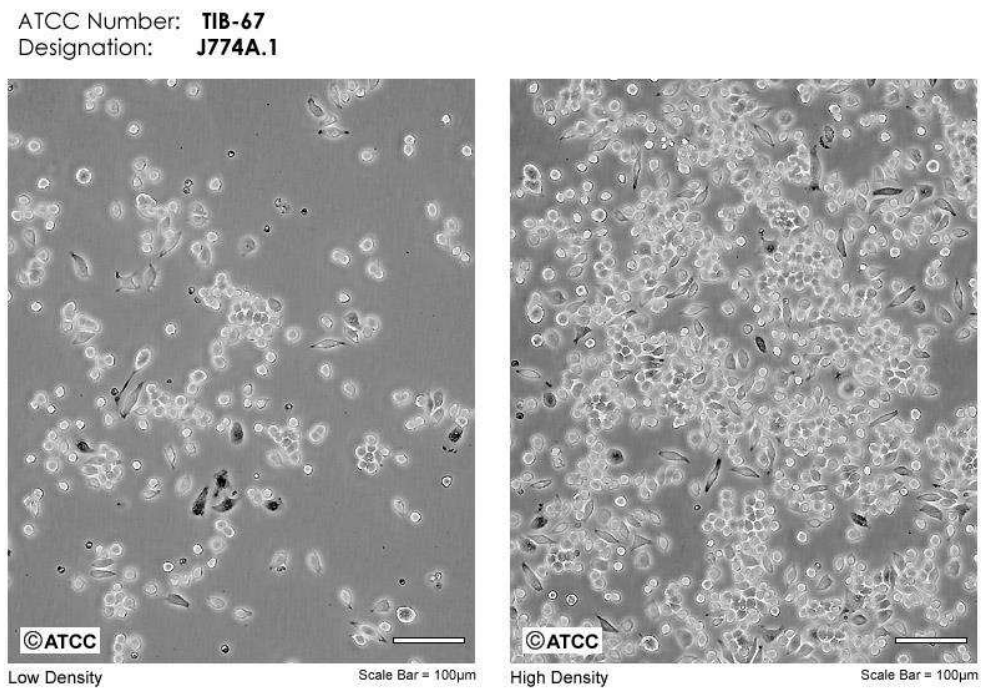


Figure IV-1 : Microscopie optique de cellules J774A.1. Images issues de ATCC.

Dans le cadre du stage de M2 de Solveig Reymond dans l'équipe 6 du GIN, qui concernait les macrophages combinés aux NPFe pour optimiser leur infiltration dans les gliomes, nous avons utilisé une souche de macrophages de souris, les J774A.1 également fournies par ATCC. Ces cellules adhérentes sont plus difficiles à cultiver que les F98. Elles se décollent avec un grattoir à cellules plutôt qu'avec de la trypsine.

IV.1.2 Mesure de la cytotoxicité des nanoparticules

Tester la cytotoxicité des nanoparticules est très important puisqu'elles peuvent modifier fortement le métabolisme des cellules (Buzea, Pacheco, and Robbie 2007). Guadagnini (Guadagnini et al. 2015) a mis en garde contre les interférences possibles entre les nanoparticules et les méthodes de mesure de cytotoxicité. Ils ont testé plusieurs types de nanoparticules (TiO_2 , SiO_2 , Fe_3O_4 avec et sans acide oléique) et plusieurs protocoles (WST-1, MTT, LDH, rouge neutre, iodure de propidium, 3H-Tymidine, etc.). Dans ce cadre, Guadagnini ne rapporte pas d'interaction entre les NPFe et les tests MTT et LDH. Guadagnini mentionne une modification du test WST-1 en ajoutant une étape d'ultracentrifugation afin de séparer les nanoparticules du surnageant afin de minimiser leurs interactions. En s'inspirant de cela nous avons adapté les protocoles de tests MTT et LDH en plaque 96-puits afin d'ajouter une étape de séparation magnétique pour faire précipiter les NPFe et prélever le surnageant nécessaire aux tests.

IV.1.2.8 Test MTT

Le test MTT (Mosmann 1983) a comme composant principal le 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tétrazolium bromide qui, lorsqu'il est dissous, a une coloration jaune. Lors de ce test, la déhydrogénase mitochondriale présente dans les cellules viables coupe l'anneau de tétrazolium,

Résultats biologiques

formant des cristaux de formazan insolubles en solution aqueuse. L'ajout de DMSO dissout les cristaux qui colorent la solution en violet. Son absorbance à 570 nm est ensuite mesurée par spectrophotométrie afin de déterminer la fraction de cellules viables dans l'échantillon. Une diminution du nombre de cellules dans les puits causée par un effet cytotoxique des nanoparticules se traduirait par une diminution du formazan formé par la réaction et donc de l'absorption à 570 nm.

Afin de s'affranchir des NPFe lors de la mesure d'absorbance, un aimant a été placé sous la plaque 96-puits juste après avoir ajouté le DMSO, puis 50 µl de surnageant a été transvasé dans une autre plaque pour la mesure au spectrophotomètre. Ce test a été effectué sur les cellules tumorales F98 au contact des NPFe. 5000 cellules sontensemencées dans chaque puits d'une plaque 96-puits. Après 48h, l'incubation de NPFe est lancée pour 24h, puis le test MTT est effectué (Figure IV-3).

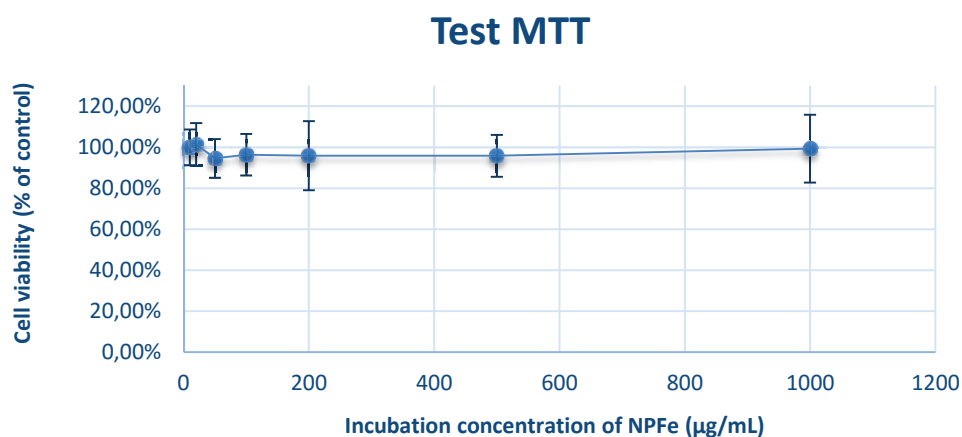


Figure IV-3 : Test de cytotoxicité MTT des NPFe en triplicat, démontrant l'absence d'effet pour des concentrations jusqu'à 1 mg/mL.

Le résultat du test est négatif, la présence de nanoparticules n'a pas d'effet cytotoxique sur les cellules F98 dans la gamme de concentrations considérée.

IV.1.2.9 Test Lactate déhydrogénase (LDH)

Le test Lactate DeHydroénase est une technique de mesure de l'intégrité membranaire d'après la quantité de LDH cytoplasmique relarguée dans le milieu de culture. La LDH réduit le NAD en NADH, qui réagit avec un colorant à base de tétrazolium. Lorsqu'on prélève le surnageant d'une plaque 96-puits préalablementensemencée avec des cellules et incubées avec des nanoparticules, la réaction de formation du colorant est proportionnelle à la quantité de NADH, et donc de LDH originellement présent dans l'échantillon. Ce test a été effectué sur les cellules tumorales F98 au contact des NPFe (Figure IV-4), à partir de la même plaque 96-puits que celle utilisée précédemment pour le test MTT.

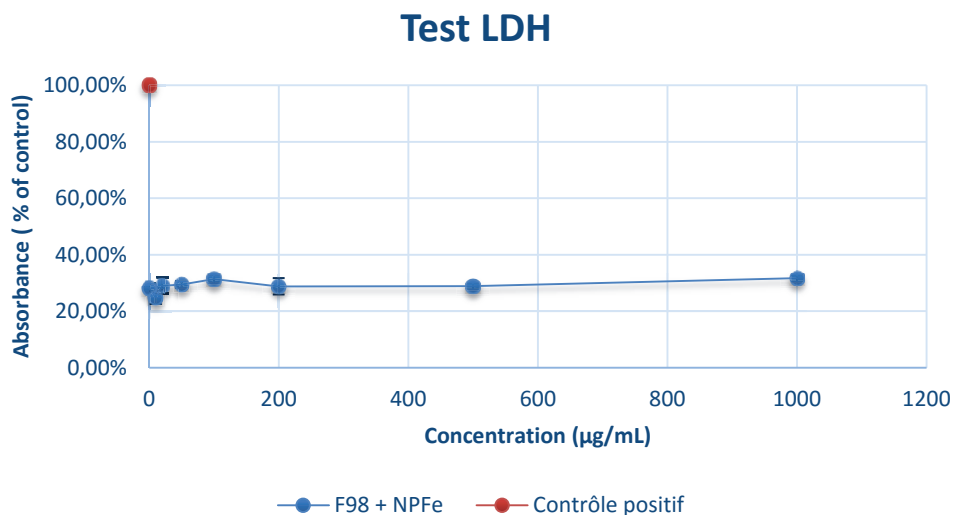


Figure IV-4 : Test de cytotoxicité LDH des NPFe en triplicat, démontrant l'absence d'effet pour des concentrations jusqu'à 1 mg/mL et un temps d'incubation de 24h.

Le test montre que la présence de nanoparticules n'induit pas une augmentation du relargage de LDH dans le milieu de culture due à la rupture des membranes des cellules tuées par les NPFe. La présence de nanoparticules n'a pas d'effet cytotoxique sur les cellules F98 dans la gamme de concentrations considérée, et pour une incubation de 24h.

Outre leur absence de toxicité, la quantité de NPFe internalisées par les cellules est importante pour déterminer leur potentiel d'augmentation de dose locale. Une grande quantité de NPFe

internalisées potentialise d'autant leur effet lors d'une irradiation. Dans la partie suivante nous nous intéressons à la mesure de cette internalisation.

IV.1.3 Mesure de l'internalisation de nanoparticules

IV.1.3.1 Mesure par ICPMS

Afin de mesurer la quantité de nanoparticules internalisées par les cellules F98, celles-ci ont été récoltées après incubation avec les nanoparticules pendant 24 heures, puis analysées par Spectrométrie par torche à plasma (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry). L'appareil (Thermo X serie II, Thermo Electron, Bremen, Germany) est situé au CHU de Grenoble dans le Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie de l'Institut de biologie et de pathologie. Il est manipulé principalement par Josiane Arnaud. Après incubation des nanoparticules avec les cellules, les flasques sont lavées trois fois au PBS (Phosphate Buffer Saline) pour enlever les nanoparticules qui n'ont pas été internalisées par les cellules. Le protocole de préparation des échantillons pour l'ICPMS est détaillé au §V.3.1, p. 161).

L'échantillon est inséré dans l'ICPMS, où il est ionisé par un plasma d'Argon, puis il traverse un quad qui sépare les ions les uns des autres en fonction de leur rapport masse/charge. Cela permet de mesurer précisément la quantité de l'élément recherché dans l'échantillon.

Afin d'obtenir des résultats significatifs l'étape de lavage est très importante puisqu'on souhaite éliminer au maximum les NPFe qui ne sont pas dans les cellules, même si celles qui sont collées sur la membrane sont difficiles à détacher avec de simples lavages. Le nombre de cellules par échantillon doit être aussi élevé que possible afin d'avoir une statistique suffisante pour être représentative. Un million de cellules par échantillon est idéal. Trois expériences d'internalisation du fer ont été effectuées pour des cellules à passage 3, 10 et 15. Les résultats ont été moyennés dans la Figure IV-5.

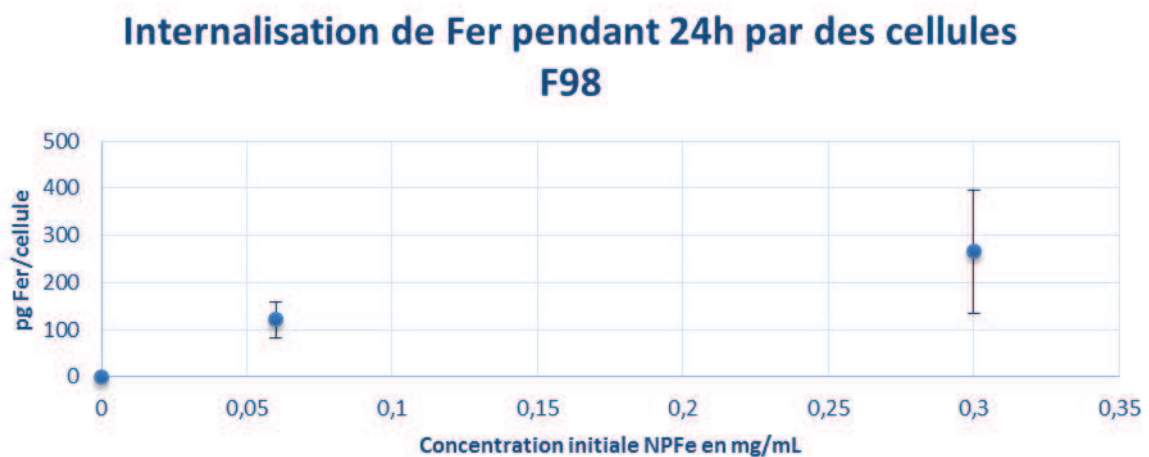


Figure IV-5 : Internalisation de NPFe pendant 24h par des cellules F98, mesuré par ICP-MS au CHU.

Les cellules concentrent fortement les nanoparticules. Pour s'en rendre compte, prenons comme exemple le deuxième point de la courbe. Une concentration de NPFe de 0,06 mg/mL dans le milieu de culture provoque une internalisation de 121 pg Fer/cellule. On peut approximer le volume d'une cellule à environ 1 pL (10 μm x 10 μm x 10 μm). La valeur finale est donc de 121 mg Fe/mL, ce qui constitue une multiplication par 2000 de la concentration en fer. La même mesure a été effectuée sur le lot de nanoparticules enrobé d'alginate fourni par Cécile Sicard Roselli, en testant outre les F98 la souche de macrophages J774A.1 (Figure IV-6):

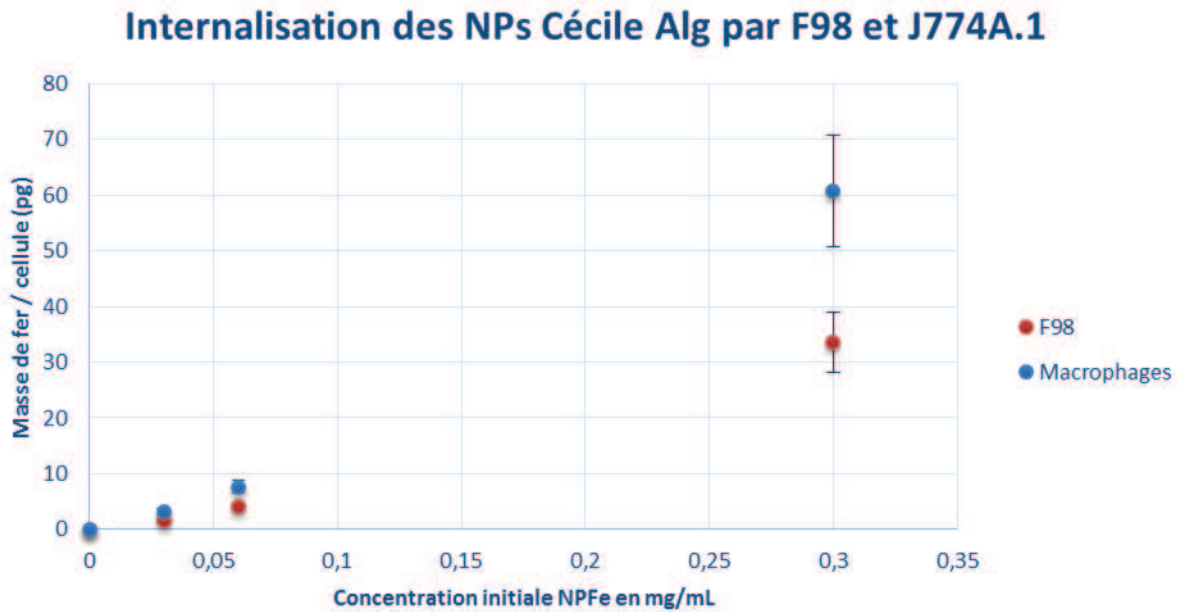


Figure IV-6 : Internalisation de NPFe pendant 24h par des cellules F98 et des macrophages J774A.1, mesuré par ICP-MS au CHU.

L'internalisation des nanoparticules produites par Cécile Sicard est bien moindre que pour les NPFe produites par Kim. De plus on observe que naturellement les macrophages qui sont des phagocytes professionnels internalisent presque deux fois plus de fer que les F98. Cette observation donne actuellement lieu à la thèse de Solveig Reymond au sein du laboratoire, qui va chercher à exploiter chez les macrophages cette forte internalisation conjuguée à leur grande invasivité pour développer des techniques de type « Cheval de Troie » et potentialiser les traitements de radiothérapie.

IV.1.4 Observation de l'internalisation de nanoparticules

IV.1.4.1 Observation au microscope optique

La difficulté d'observation de l'internalisation de nanoparticules au microscope réside dans le fait que ce processus est long. Les cellules étudiées sont cultivées dans une atmosphère à 5% de CO₂ à 37°C, en incubateur. Recréer ces conditions pendant une longue période sous un microscope nécessite un appareillage spécifique, qui va souvent de pair avec un microscope confocal.

La plateforme d'Imagerie Cellulaire M4D à l'Institut de Biologie Structurale, gérée entre autres par Jean-Philippe Kléman, possède un vidéo-microscope couplé à une chambre d'incubation à 37°C et une platine piézo-électrique qui permettent de réaliser des expériences d'imagerie cellulaire 3D résolues dans le temps, par fluorescence ou non. Ne pouvant intégrer de marqueur fluorescent sur nos NPFe sans en modifier profondément les caractéristiques (taille, physico-chimie, cytotoxicité), nous avons opté pour une imagerie optique classique en 2D sans marqueur fluorescent, ni sur la surface des cellules ni sur les NPFe.

Le protocole de préparation des cellules est détaillé au § V.3.4, p. 161.

Des images ont été prises toutes les 3 minutes pendant 12 heures pour constituer un film, l'un montrant la croissance de F98 sans NPFe (Figure IV-7), l'autre montrant l'internalisation des NPFe sur une période de 11 heures (Figure IV-8).

Résultats biologiques

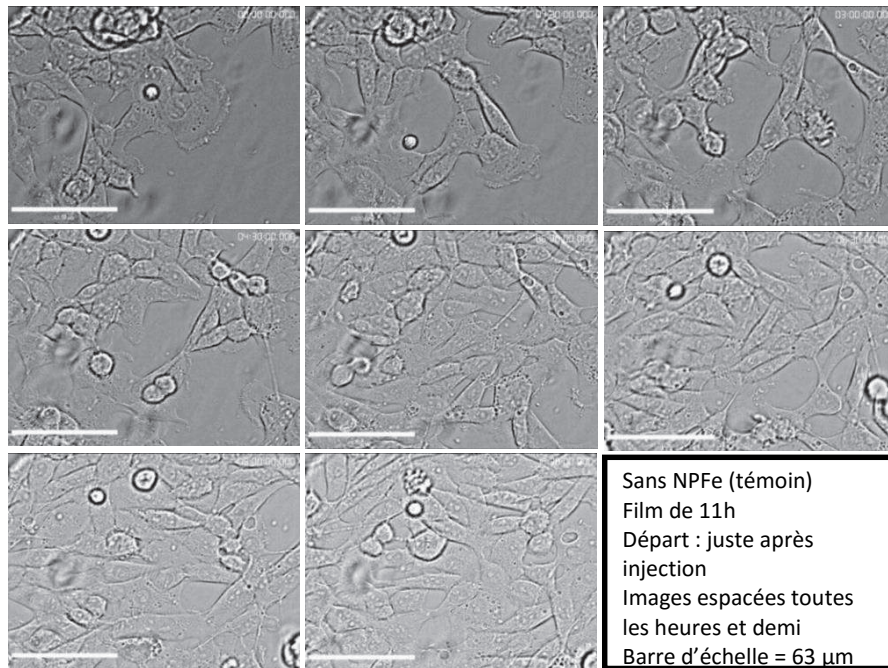


Figure IV-7 : Microscopie optique en incubateur de cellules F98 prise à l'IBS. Les cellules F98 adhérentes se multiplient jusqu'à atteindre la confluence. Quelques-unes flottent dans le milieu, restent rondes et ne s'étendent pas sur la surface.

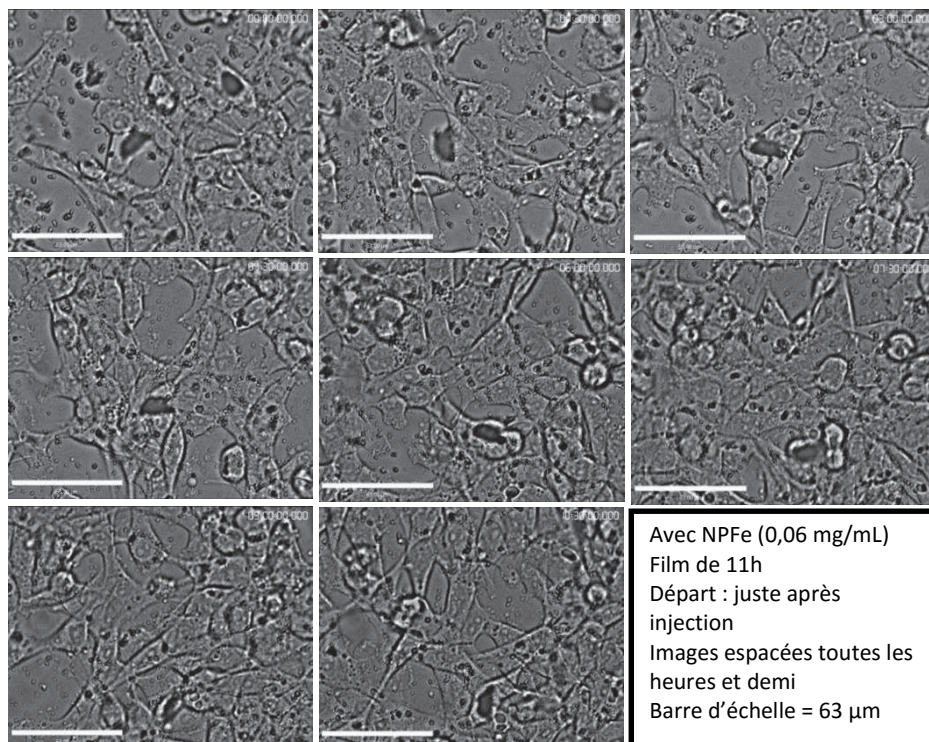


Figure IV-8 : Observation au microscope de l'internalisation de NPFe par des F98 pendant 11 heures. Les cellules continuent à se multiplier jusqu'à atteindre la confluence. Leur aspect général n'est pas modifié, ce qui montre que l'adhérence et le métabolisme des cellules ne semblent pas significativement perturbés.

Cette observation des cellules mis en présence des nanoparticules sur une période longue permet de mettre en évidence que les NPFe ne modifient pas de manière visible l'adhérence des cellules. Si c'était le cas les cellules perdraient leur capacité de s'attacher au support et deviendraient circulaires, comme ce que l'on peut observer lorsqu'on détache les cellules à l'aide de trypsine. D'autre part les cellules continuent à se multiplier à un rythme identique, ce qui confirme l'absence de cytotoxicité mesurée par MTT et LDH. Cependant durant les 10 premières minutes au contact des NPFe, les cellules montrent des signes de stress (bourgeonnement des membranes et forte activité vésiculaire). Par la suite leur comportement redevient identique aux cellules témoin.

Les NPFe sont visibles au microscope, ce qui confirme leur agrégation, telle que mesurée par DLS (§ III.1.1.2, p. 79). La résolution atteinte par ce mode d'imagerie n'est pas suffisante pour localiser précisément les NPFe à l'intérieur des cellules. Cependant, une autre méthode permet d'obtenir la résolution nécessaire.

IV.1.4.2 Observation par microfluorescence X

IV.1.4.2.1 Principe de la méthode

La microfluorescence X est une technique qui permet d'acquérir une image d'un échantillon à partir des propriétés d'émission de photons de fluorescence des matériaux lorsqu'ils sont irradiés par des rayons X. Cette technique existe avec des appareils relativement compacts pour des expériences en laboratoire. Cependant l'utilisation d'une source de rayonnement primaire fortement monochromatique permet de simplifier l'analyse des résultats. Les synchrotrons sont donc des sources de choix. La brillance du faisceau est aussi cruciale pour la rapidité de l'acquisition, avec un flux de photons très important (sur ID16B, typiquement 10^{11} photons/seconde). Une image de l'objet est acquise pixel par pixel, avec une résolution pouvant varier, mais compatible avec des temps d'acquisition raisonnables dans le cadre d'un temps de faisceau limité, donc par exemple dans notre cas 100 nm par 100 nm. Pour chaque pixel des détecteurs de fluorescence placés en configuration « backscattering » recueillent les photons de fluorescence émis par l'objet irradié (Figure IV-9).

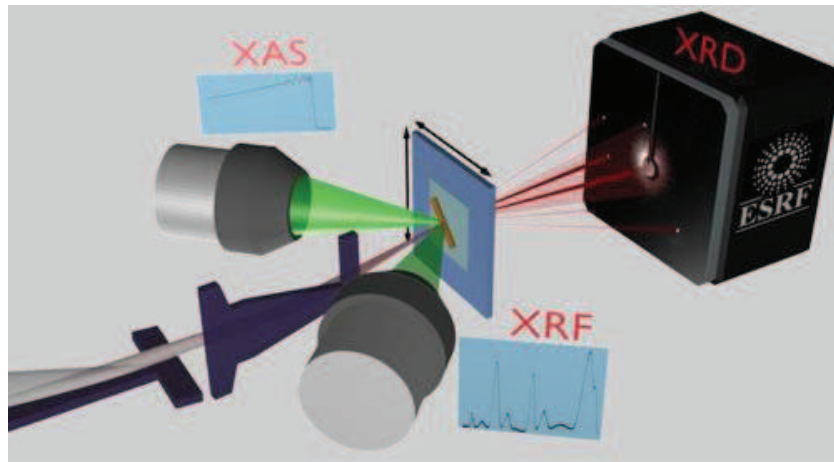


Figure IV-9 : Set-up expérimental sur ID16B. Pour la technique de microfluorescence (XRF), l'échantillon est déplacé horizontalement et verticalement durant le scan. Les détecteurs acquièrent un spectre pour chaque pixel. L'analyse de données permet de recomposer l'image de l'échantillon en 2D en séparant les contributions des différents éléments.

Un spectre en énergie est recueilli pour chaque point, qui correspond à la superposition des différents éléments présents dans l'échantillon. L'analyse de ces spectres permet de reconstruire des images de l'échantillon en sélectionnant les éléments d'intérêt, et donc par exemple de localiser des nanoparticules dans une cellule. Le spectre mesuré sera limité aux énergies inférieures à l'énergie caractéristique de la source primaire, dans notre cas inférieure à 20 keV.

La ligne ID16B est spécialisée dans l'imagerie de petits objets et nécessite une grande précision de l'instrumentation et des moteurs responsables des mouvements nécessaires pour balayer l'échantillon. Tous les détecteurs de la cabine expérimentale sont placés sur une dalle en marbre, elle-même placée sur un système pneumatique. Ce système avance et recule dans la pièce pour permettre la focalisation de l'échantillon. Une fois posée au sol, cette importante masse empêche tout

mouvement des détecteurs. Le bâtiment est climatisé afin de minimiser les effets de variation de température.

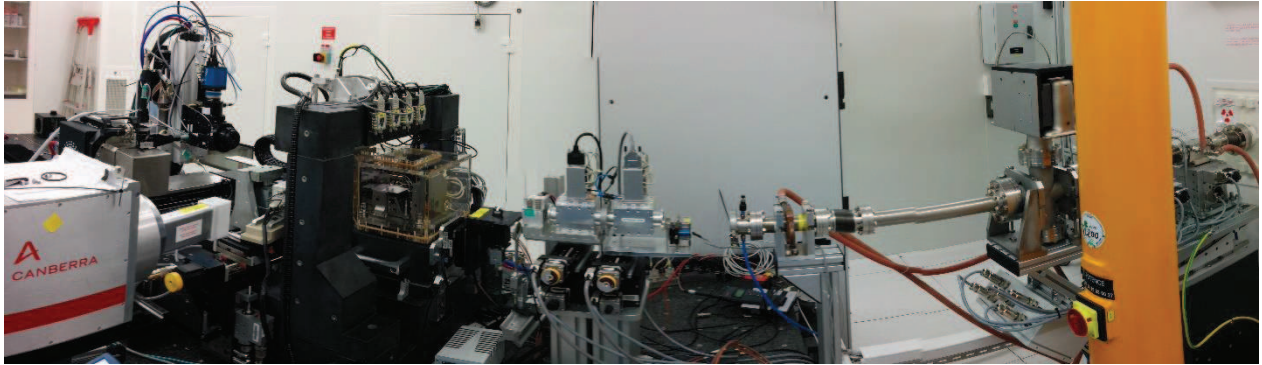


Figure IV-10 : Cabine expérimentale de ID16B. Les instruments de mesure, à gauche sont placés sur une dalle de marbre et reliés au faisceau par une pièce flexible.

Un temps de faisceau obtenu sur ID16B pour localiser les NPFe dans les cellules F98 a permis d'observer et de quantifier cette internalisation.

La préparation minutieuse des échantillons est nécessaire pour obtenir une bonne résolution. Cela nécessite de sécher et fixer pour immobiliser des cellules sur un support, en respectant un protocole détaillé au § V.3.5, p. 162).

IV.1.4.2.2 Montage

Les membranes sont montées sur un support adapté sur la ligne ID16B, comme montré sur la Figure IV-11.

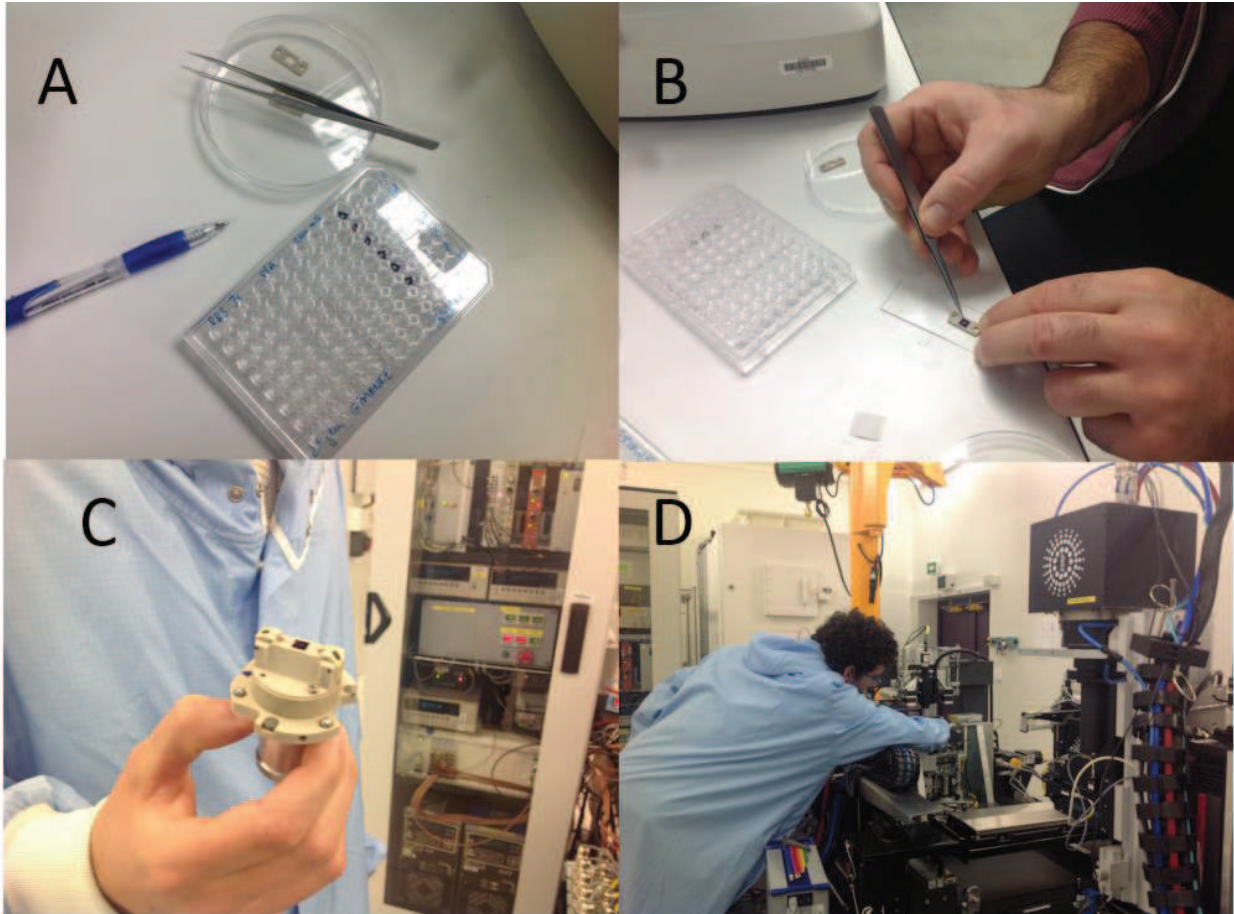


Figure IV-11 : Montage des membranes Si_3N_4 sur la ligne ID16B : La membrane séchée verticalement dans la plaque 96-puits (A) est déposée sur un support plastique (B) puis montée sur le porte-échantillon (C). Le tout est placé sur la ligne ID16B (D).

IV.1.4.2.3 Résultats

En plus des cellules F98 témoin sans aucune nanoparticule, nous avons imagé des cellules incubées pendant 24h avec 0,3 et 0,06 mg/mL de NPFe à une résolution très fine, chaque pixel de l'image en fluorescence X mesurant 90 nm par 90 nm (Figure IV-13, Figure IV-12 et Figure IV-14). Le soufre coloré en vert délimite le cytoplasme de la cellule et le fer des nanoparticules apparaît en rouge.

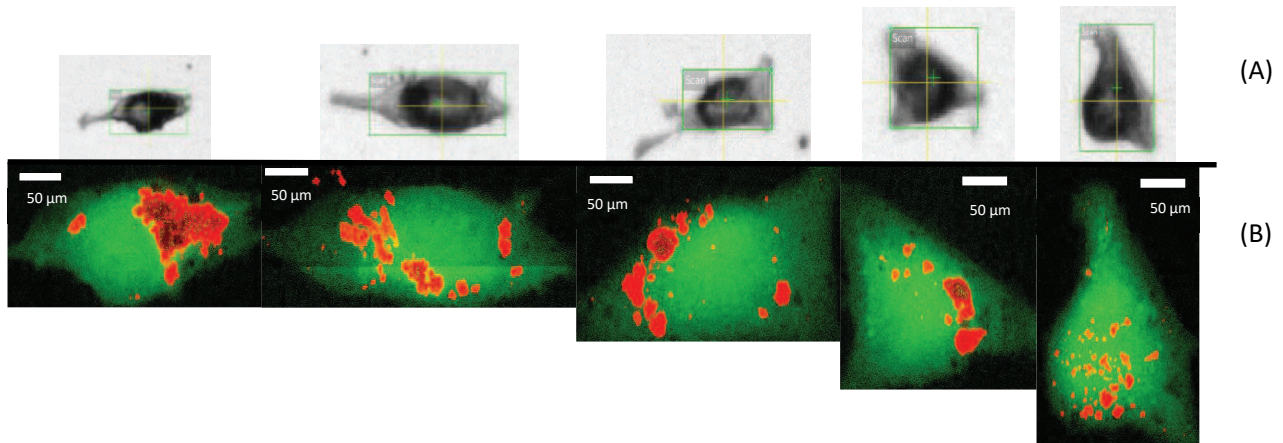


Figure IV-13 : Imagerie de 5 cellules F98 incubées pendant 24h avec des NPFe à 0,3 mg/mL :

(A) Microscopie optique. (B) Microscopie de fluorescence X (Fer coloré en rouge et Soufre en vert).

Taille de pixel : 90 nm x 90 nm. Images acquises sur ID16B.

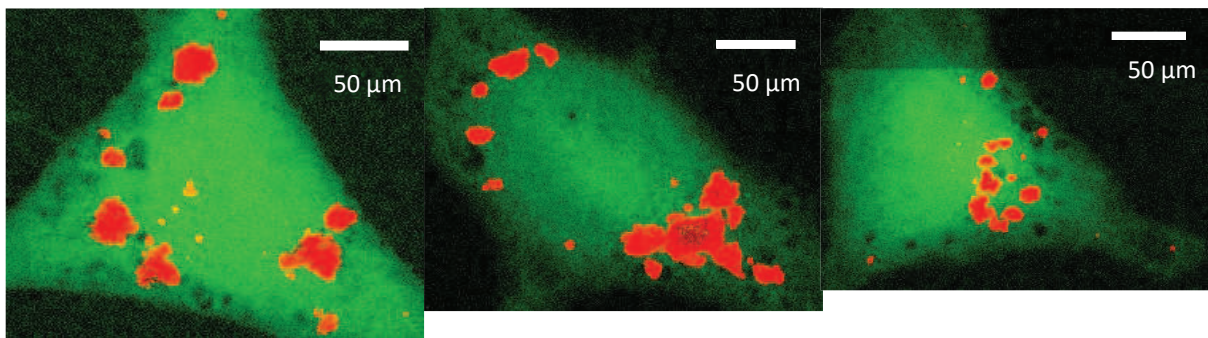


Figure IV-12 : Microscopie de fluorescence X de 3 cellules F98 incubées pendant 24h avec des NPFe à 0,06 mg/mL. Fer coloré en rouge et Soufre en vert. Taille de pixel : 90 nm x 90 nm. Images acquises sur ID16B.

Ces images montrent clairement la disposition préférentielle des NPFe autour du noyau des F98. Ce noyau est visible au centre des cellules, le soufre y étant un peu plus concentré que dans le cytoplasme. Le phosphore permet également de confirmer cette localisation du noyau. On distingue très bien les agrégats de nanoparticules.

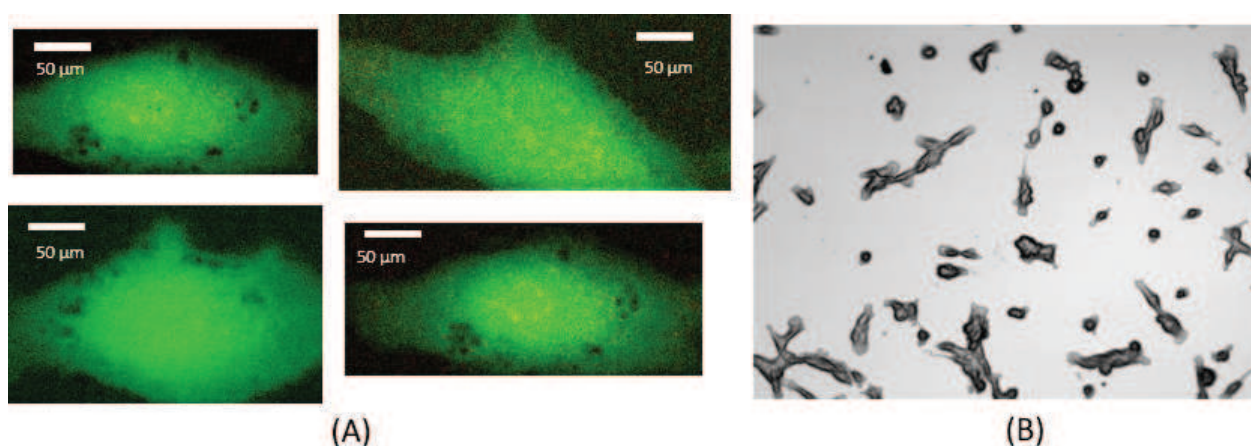


Figure IV-14 : Imagerie de 4 cellules F98 témoin, sans NPFe : (A) Microscopie de fluorescence X. Fer coloré en rouge et Soufre en vert. (B) Microscopie optique. Taille de pixel : 100 nm x 100 nm Images acquises sur ID16B.

Les cellules F98 qui n'ont pas été mises en contact avec des NPFe contiennent très peu de fer. Ce niveau basal très faible, déjà observé en ICP-MS, est confirmé par la XRF.

L'ordre de grandeur d'acquisition d'une image de cellule est d'une heure et demie. Parmi les centaines de cellules présentes sur chaque membrane, le choix s'est porté sur les cellules orientées horizontalement ou verticalement pour minimiser la zone à imager, et les cellules bien étalées, preuve de leur croissance au moment de la fixation au PFA.

Ces images montrent une très forte internalisation des NPFe par les cellules F98, sans modification de leur conformation puisqu'elles présentent le même aspect que les cellules témoin. La différence d'internalisation entre les deux concentrations, 0,06 et 0,3 mg/mL, est peu marquée. La concentration en fer est si importante qu'elle provoque la saturation de certains pixels. Les grands amas de fer absorbent la fluorescence issue des autres éléments localisés au même endroit, ce qui cause une disparition du signal sous les NPFe.

IV.1.4.3 *Observation par tomographie X*

La ligne ID16B de l'ESRF met à profit la cohérence du faisceau afin de développer un outil de tomographie de cellules par fluorescence X. Le synchrotron étant une source très intense, l'image peut être acquise rapidement. Deux articles récents permettent de se faire une idée des avancées actuelles, des limites et des perspectives du domaine [(Le Gros et al. 2012),(de Jonge, Ryan, and Jacobsen 2014)]. Le principe de l'acquisition est assez simple. Une image classique de microfluorescence est acquise à intervalles réguliers pendant la rotation de l'échantillon sur 360°. L'image est ensuite reconstruite en sommant les contributions de chaque angle d'incidence, ce qui permet de reconstituer l'image de fluorescence X en 3 dimensions.

La difficulté réside tout d'abord dans la rotation à 360° du support de la cellule à imager. Typiquement ce n'est pas possible d'utiliser les membranes Si₃N₄ car pour certains angles le rayonnement devrait traverser une grande épaisseur et toute la fluorescence X serait atténuée. L'information ne couvrant pas tous les angles elle serait incomplète et la reconstruction serait lacunaire. Il faut donc travailler avec un support de cellule le plus petit et fin possible pour permettre cette rotation de 360° autour de l'échantillon. Conseillés par R. Tucoulou et S. Bohic, notre choix s'est porté sur un PIN Micromount (Mitegen, Etats-Unis) très fragile, normalement destiné à la cristallographie. Les images acquises ont une résolution de pixels de 300 nm par 300 nm et un intervalle de 4° entre les incidences.

Quelques milliers de cellules à imager sont déposées sur un PIN Micromount. Ce PIN est stérilisé et recouvert d'une couche de PLL selon le même protocole que les membranes Si₃N₄ (voir §V.3.5, p.162). De la même manière, on laisse ensuite aux cellules le temps de s'étaler, 12h à l'incubateur puis on lave les pointes au PBS et on fixe 30 minutes au PFA 4%. Les PIN sont rincés au PBS puis à l'eau pure et séchées à l'air libre sous la PSM.

Résultats biologiques

La préparation d'échantillon n'a pas permis d'obtenir d'échantillon facile à imager et présentant une internalisation de fer représentative. Sur les 8 PIN préparés, un seul a présenté une cellule bien étalée sur la grille de kapton, et donc adapté pour une acquisition. L'imagerie d'une seule cellule prend beaucoup de temps et l'irradiation endommage l'échantillon. Entre le début et la fin de l'acquisition la cellule se contracte et sa taille réduit, compliquant le travail de reconstruction.

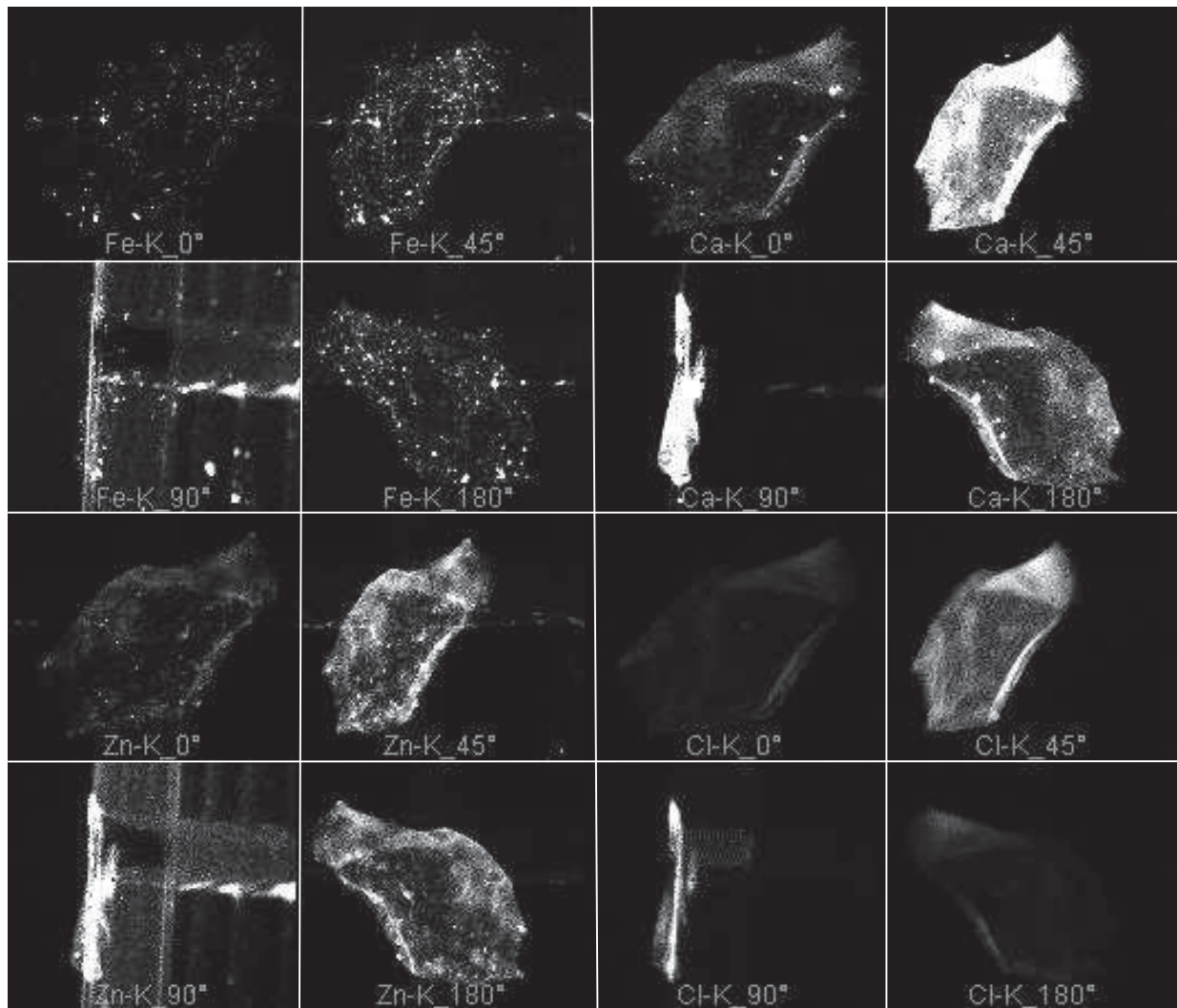


Figure IV-15 : Images XRF acquises sur ID16B du fer, calcium et zinc d'une cellule F98 pour 4 incidences (0, 45, 90 et 180°). Le contraste est adapté pour plus de visibilité.

La reconstruction des images n'est pas encore automatisée, et les données à traiter sont très volumineuses. Les images récupérées n'ont pas permis de reconstruire la cellule en 3 dimensions. Néanmoins les problèmes rencontrés lors de cette expérience ont permis de cerner les principaux verrous et contribuent au développement de l'outil Tomographique sur ID16B.

IV.1.5 Conclusion

Dans la perspective d'une radiothérapie dont les effets sont augmentés grâce à la présence de nanoparticules, plusieurs paramètres sont déterminants. La taille, la chimie de surface et l'agglomération des nanoparticules déterminent leur cytotoxicité. La quantité de NPFe et leur localisation déterminent l'efficacité de radiosensibilisation. En effet le noyau des cellules est une cible privilégiée du rayonnement ionisant, et les effets Mössbauer et photoélectriques étant d'une portée limitée, la proximité des NPFe du noyau semble donc importante.

Les NPFe forment des amas de 500 nm, une taille beaucoup plus importante que les NPFe individuelles (13 nm). Le faible potentiel Zêta (-21,7 mV) explique cette tendance. On considère généralement qu'un potentiel supérieur à ± 30 mV est nécessaire pour empêcher les interactions électrostatiques de provoquer l'agrégation et la sédimentation des nanoparticules. Pour autant cette distribution de taille n'a pas empêché les NPFe d'être internalisées et concentrées 2000 fois par les cellules F98, selon les mesures d'ICP-MS, sans que l'on mesure de cytotoxicité par MTT ou LDH. Des concentrations très importantes de NPFe ont été mesurées par ICPMS, supérieures à 100 pg par cellule. Les concentrations obtenues dans la littérature sont généralement plus faibles : 17 pg/cellule après 2h d'incubation à 0,16 mg/mL obtenus par Sun *et al* (Sun et al. 2008), ou bien 40 et 10 pg/cellule après 24h d'incubation à 0,5 mg/mL sur les lignées cellulaires VERO (épithélium rénal de singe vert) et MDCK (épithélium rénal de chien) obtenus par une autre équipe (Mojica Piscioti et al. 2014).

Choi (Choi et al. 2012) a obtenu des concentrations similaires de NPFe dans des cellules CT26 (fibroblaste de cancer du côlon de souris): 140 pg/cellule après une nuit d'incubation.

La microscopie a permis de confirmer ces résultats. En observant pendant 11h le devenir des cellules après introduction de NPFe dans le milieu de culture, on a constaté une courte période de stress de 10 minutes puis un comportement identique aux cellules témoin, indiquant l'absence de cytotoxicité. En observant par fluorescence X la distribution des NPFe à l'intérieur des cellules, leur concentration très importante a été confirmée. Le signal provenant du fer des NPFe est si fort qu'il

Résultats biologiques

provoque la disparition du signal provenant des autres éléments localisés au même endroit, et également la saturation du signal du fer à certains pixels. De plus leur disposition autour du noyau a déjà observée par l'équipe de JK Kim dans des cellules tumorales CT26 et C6 (Choi et al. 2012). Les atomes de fer se trouvent donc en grande quantité et proches du noyau cellulaire. Cela remplit toutes les conditions pour favoriser la radiosensibilisation due à l'effet photoélectrique, qui est abordé dans la partie suivante.

IV.2 Radiothérapie par Photo-activation de NPFe

Les NPFe utilisées dans ces travaux de thèses et fournies par l'équipe de recherche de JK Kim ont déjà fait l'objet d'études de radiosensibilisation par protons [(Kim et al. 2012),(Seo et al. 2013)] et par rayons X monochromatiques [(Choi et al. 2012), (Kleinauskas et al. 2012)]. Dans l'étude de Choi, ils ont utilisé les NPFe afin d'augmenter la radiosensibilité de cellules tumorales par effet photoélectrique à 7.1 keV sur la ligne IB2 du synchrotron Pohang Accelerator Laboratory en Corée du Sud, pour démontrer *in vitro* et *in vivo* la faisabilité d'un traitement des tumeurs superficielles.

Testées sur des cellules CT26 et des modèles de gliome C6, les NPFe ne sont pas cytotoxiques pour des concentrations d'incubation allant jusqu'à 2 mg/mL pendant 12h. Elles pénètrent et se concentrent dans les cellules en grande quantité, jusqu'à 170 mg/mL pour la plus forte concentration, et se localisent autour du noyau (Figure IV-16).

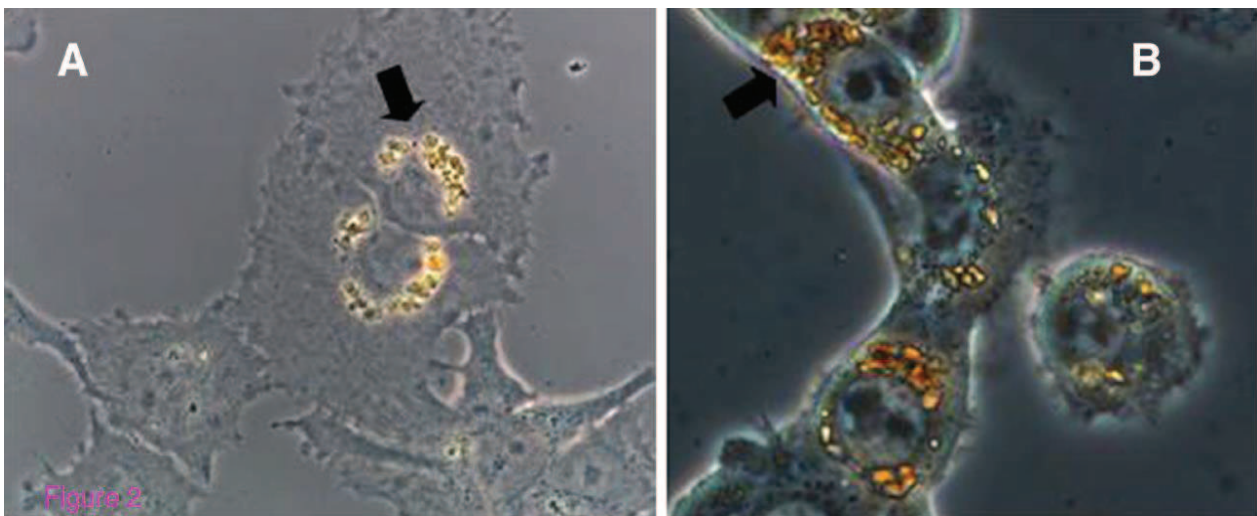


Figure IV-16 : Etude par microscopie optique de la distribution cellulaire de NPFe dans des cellules de gliome C6 (A) et des cellules de cancer du colon CT26 (B). Les NPFe sont distribuées autour du noyau pour les deux lignées cellulaires. (Choi et al. 2012)

In vitro, Choi a montré que la présence de NPFe lors d'une irradiation à 7 keV induisait une perte de viabilité des cellules augmentée de 70%.

Résultats biologiques

Pour son étude *in vivo*, des cellules CT26 ont été injectées en sous-cutané dans la patte de souris Balb/C, qui ont été irradiées 7 jours plus tard avec des doses allant de 10 ou 40 Gy à un débit de dose de 2,4 Gy/s, après injection dans la veine de la queue de 100 mg/kg de NPF_e. A cause de l'absorption rapide des photons de 7 keV lors de la traversée de la tumeur, celles mesurant plus de 5 mm de profondeur ont été exclues de l'étude.

80% des tumeurs irradiées avec 10 Gy en présence de NPF_e ont subi une régression complète après 15-35 jours sans rechute pendant 6 mois. Le groupe contrôle irradié sans NPF_e a quant à lui subi 80% de pertes pendant ces 6 mois.

L'étude de Kleinauskas (Kleinauskas et al. 2012) sur des NPF_e combinés à des cellules de gliome C6 et des cellules de cancer de la prostate (Du145 et LNCaP) a montré une absence de cytotoxicité dans la gamme 0,01-1,5 mg/ml. En irradiant ces cellules avec un faisceau monochromatique de rayons X à 7,11 keV, il a montré une diminution d'un facteur compris entre 3 et 9 de la survie des cellules avec NPF_e comparées aux cellules sans NPF_e. Lors d'une irradiation avec une source de rayons X polychromatique de 200kV, l'irradiation avec NPF_e a causé une diminution de viabilité seulement 10% supérieure à l'irradiation sans NPF_e. Fractionner le dépôt de dose pour tenter de provoquer la libération des NPF_e contenues dans les vésicules d'endocytose a permis pour les cellules LNCaP d'augmenter l'efficacité du traitement de 13%, comparé à une irradiation unique.

Pour notre étude, nous allons utiliser ces NPF_e avec un modèle de gliome pour un test de photoactivation *in vitro*.

IV.2.1 Test de clonogénicité et compteur automatique

IV.2.1.4 Test de clonogénicité et facteur d'augmentation de sensibilité

La survie cellulaire a été estimée par test de clonogénicité, qui estime la survie des cellules selon leur capacité à proliférer après un traitement quelconque (Puck et al. 1957), selon le protocole détaillé au § V.2.5.

Les colonies obtenues après le test sont comptées (voir § V.2.5, p. 159) et la survie (S) est calculée comme le rapport entre le nombre de colonies comptées et le nombre de cellules initialementensemencées :

$$S = \frac{Nb_{colonies}}{Nb_{cellules\ initiales}} \quad (26)$$

Chaque condition expérimentale a été répétée trois fois, de manière à calculer les survies moyennes brutes et normalisées par la survie de cellules non irradiées (\bar{S} et \bar{S}_{norm}).

Dans la littérature le Facteur d'augmentation de sensibilité (ou SER, pour Sensitive Enhancement Ratio) induite par la présence d'éléments lourds pendant l'irradiation est très souvent estimé comme le rapport des doses conduisant à une survie cellulaire donnée sans et avec l'élément lourd : taux de survie souvent fixé à 10 ou 50%. Pour réaliser cette mesure il est nécessaire de connaître $\bar{S}(D)$ dans une large gamme de dose, comprenant la valeur $\bar{S}(D) = 0.1$ (ou 0.5) choisie. Dans notre cas, afin d'optimiser les temps de faisceau synchrotron, une seule dose de rayonnement a été considérée pour les expériences relatives à la dépendance énergétique de l'augmentation de sensibilité. Le SER a donc été calculé à partir du rapport des survies des cellules irradiées en présence ou sans atomes lourds, pour une dose donnée (4 Gy). Cette valeur a été choisie par compromis entre une dose trop faible (1 ou 2 Gy) où les effets sont souvent variables entre les cellules car peu importants, et une dose trop forte (7 ou 8 Gy) où la survie est souvent très faible et donc peu reproductible. Le SER_{4Gy} permet de déterminer le caractère radioprotecteur ($SER < 1$) ou radiosensibilisant ($SER > 1$) des nanoparticules, selon la formule :

$$SER_{4Gy} = \frac{\bar{S}_{4Gy,[atomes\ lourds]=0}}{\bar{S}_{4Gy,[atomes\ lourds]>0}} \quad (27)$$

La problématique principale lors d'irradiations de cellules réside dans la différence fondamentale entre le temps d'irradiation des cellules, souvent court car le faisceau très intense délivre un débit de dose important, et le temps de préparation et d'analyse des cellules après irradiation. Pour remédier en partie à cela, un compteur automatique de colonies développé au laboratoire permet de différencier les boîtes de Pétri nécessaires au test clonogénique par un simple code-barres, ce qui réduit considérablement le temps de marquage des boîtes durant le temps de faisceau.

IV.2.2 Compteur automatique de colonies

Un compteur automatique de colonies a été développé sur la ligne ID17 afin de faciliter l'analyse des tests clonogéniques. Un appareil photo relié à un ordinateur permet de numériser les boîtes de Pétri colorées au crystal violet. Un lecteur de codes-barres couplé à l'appareil photo garantit l'identification des échantillons. Un script d'analyse compte le nombre de colonies et remplit un tableau de résultats.

Une vérification visuelle du comptage est possible et même recommandée, car le système est sensible aux tâches parasites de crystal violet qui peuvent apparaître lors de la coloration, indépendamment des colonies. Ces tâches peuvent entraîner une surévaluation importante du nombre de colonies en trompant la reconnaissance de formes circulaires propres aux colonies, comptant des centaines de ronds là où il n'y a qu'une seule tâche.

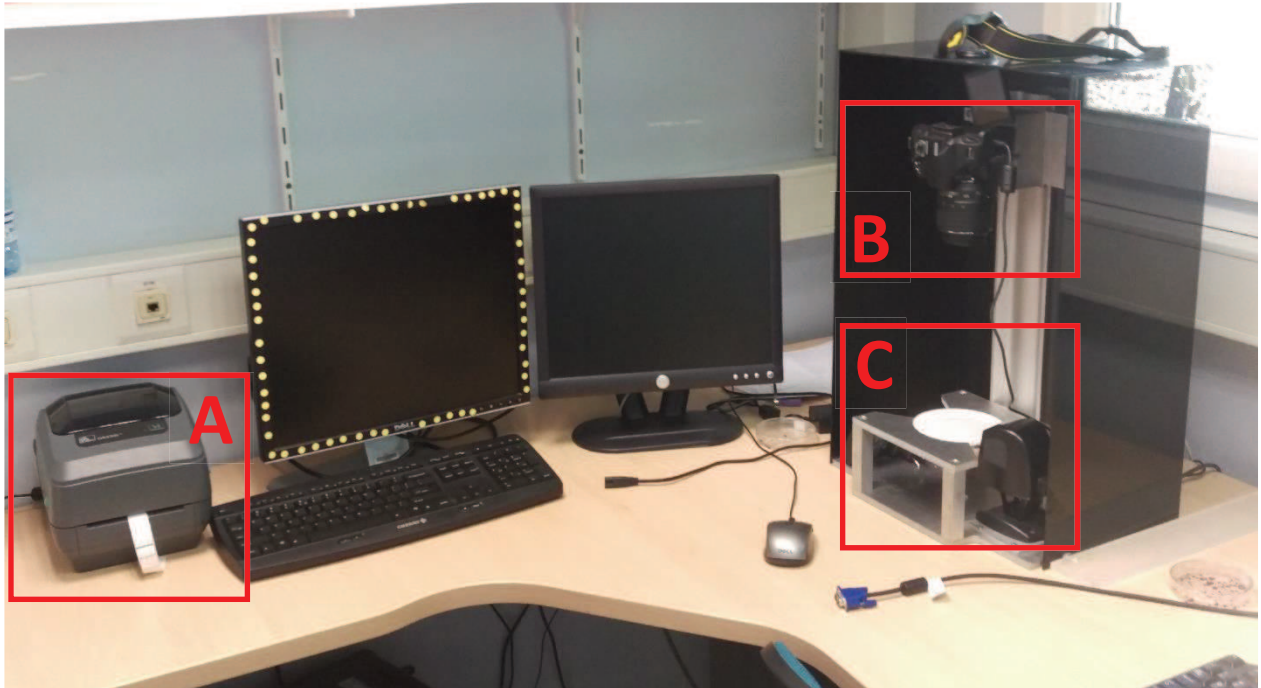
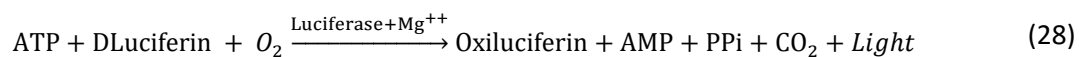


Figure IV-17 : Compteur automatique de colonies pour les tests de clonogénicité. A. Imprimante à étiquettes B. Appareil photo C. support de boîtes de Pétri et lecteur de code-barres.

Ce système permet un gain de temps substantiel et diminue les erreurs humaines de comptage lorsque le nombre de boîtes est très important. Typiquement une expérience de clonogénicité lors d'un temps de faisceau peut compter jusqu'à 200 boîtes de Pétri.

IV.2.3 Test ATPLite

Un autre test, basé sur la mesure de la production d'ATP par les cellules, a été utilisé pour confirmer les résultats des essais clonogéniques. Après irradiation les cellules sont cultivées pendant 4 jours dans une plaque 96-puits, puis lysées pour mesurer par luminescence l'ATP produit. La D-Luciferin présente dans le test ATPLite est transformée en Oxiluciferin et en émission de lumière (luminescence) par la Luciférase en présence d'oxygène et de magnésium, selon la réaction :



L'oxydation de la Luciférine provoque l'émission de lumière proportionnelle à la quantité d'ATP produite par les cellules.

Ce test est complémentaire du test clonogénique, il ne mesure pas la même chose. La production d'énergie par les cellules se traduit par la production d'ATP, ce qui donne une information sur la viabilité des cellules 4 jours après l'irradiation.

La présence de nanoparticules pourrait influencer la mesure de luminescence en obscurcissant le signal et en créant des interférences mais cela n'a pas été observé durant nos mesures. Le petit nombre de cellules initiales (seulement 500 par puits) implique une faible concentration de NPFe 4 jours plus tard, alors que les cellules ont pu se multiplier plusieurs fois. La luminescence n'est donc pas impactée par l'absorption des NPFe.

Le protocole est détaillé § V.2.6, p. 160.

Ce test est utile pour compléter les informations données par le test clonogénique. Alors que l'ATPLite considère les effets à court terme (J+4) d'une irradiation et mesure le métabolisme des cellules à travers la production d'ATP, qui est un marqueur de leur viabilité, le test clonogénique mesure la capacité des cellules à répliquer leur gènes sur plus long terme, après une dizaine de jours, et donc après 7 ou 8 réplifications.

IV.2.4 Augmentation de dose en fonction de l'énergie

Le faisceau monochromatique d'ID17 permet de comparer les réponses à des irradiations d'énergies différentes et précises. Pour des éléments lourds dont le K-edge se trouve dans la gamme d'énergie 30-90 keV des expériences d'irradiation au-dessus et en-dessous du K-edge permettent de différencier les effets provenant spécifiquement des photo-électrons produits en couche K.

Cependant dans le cas du fer, son K-edge étant à 7,11 keV, toutes les irradiations au synchrotron seront à une énergie bien supérieure.

Un temps de faisceau sur ID17 a été mis à profit pour évaluer l'effet photoélectrique issu d'une irradiation à différentes énergies de cellules F98 incubées avec deux concentrations de NPFe, 0.06 et 0.3 mg de NPFe/mL (toujours le 1^{er} lot provenant de Corée du Sud) pendant 24h. Le SER_{4Gy} a été mesuré à l'aide d'un test clonogénique (voir § V.2.5, p. 159).

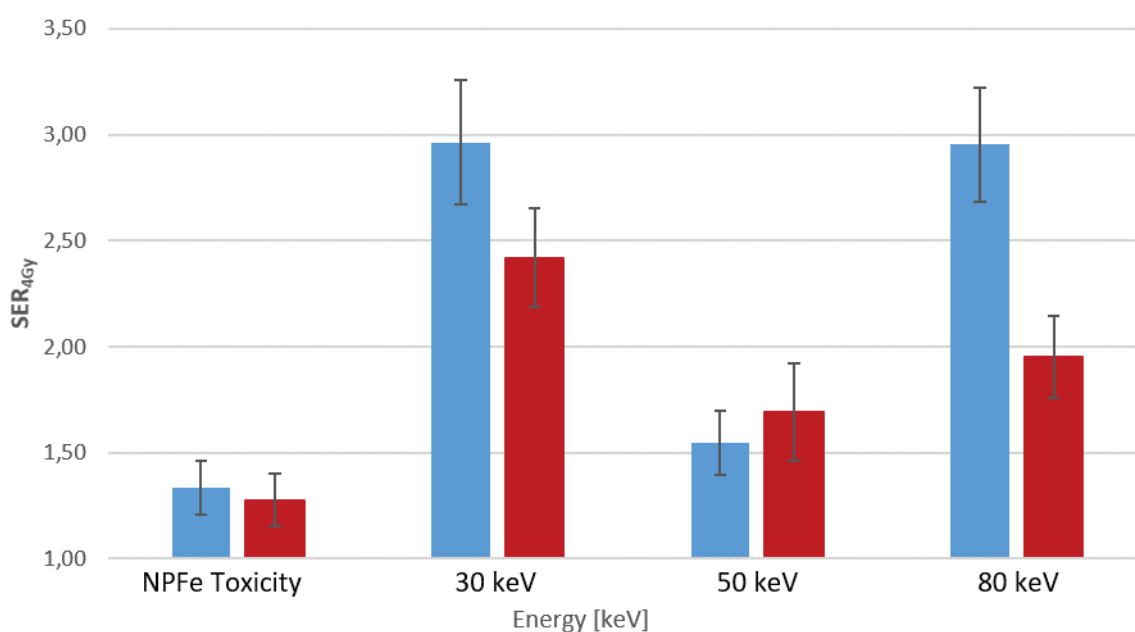


Figure IV-18 : SER_{4Gy} mesuré par test clonogénique, pour 3 énergies et 2 concentrations de NPFe (0.06 mg/mL (en rouge) et 0.3 mg/mL (en bleu)).

La toxicité des nanoparticules est évaluée selon le ratio de la survie sans irradiation avec et sans nanoparticules. Pour les deux concentrations évaluées la toxicité est faible et n'influe pas sur la valeur

Résultats biologiques

du SER_{4Gy} . Celui-ci est très élevé, dans la littérature il est souvent beaucoup plus proche de 1. Pour autant, Kleinauskas en utilisant les mêmes NPF_e a obtenu un SER de 3 à 9 avec une irradiation monochromatique de 7 keV sur des cellules de gliome C6 ou bien de cancer de la prostate, Du145 et LNCaP (Kleinauskas et al. 2012).

En parallèle de ce test de clonogénicité, un test ATPLite a permis de confirmer ces résultats (Figure IV-19).

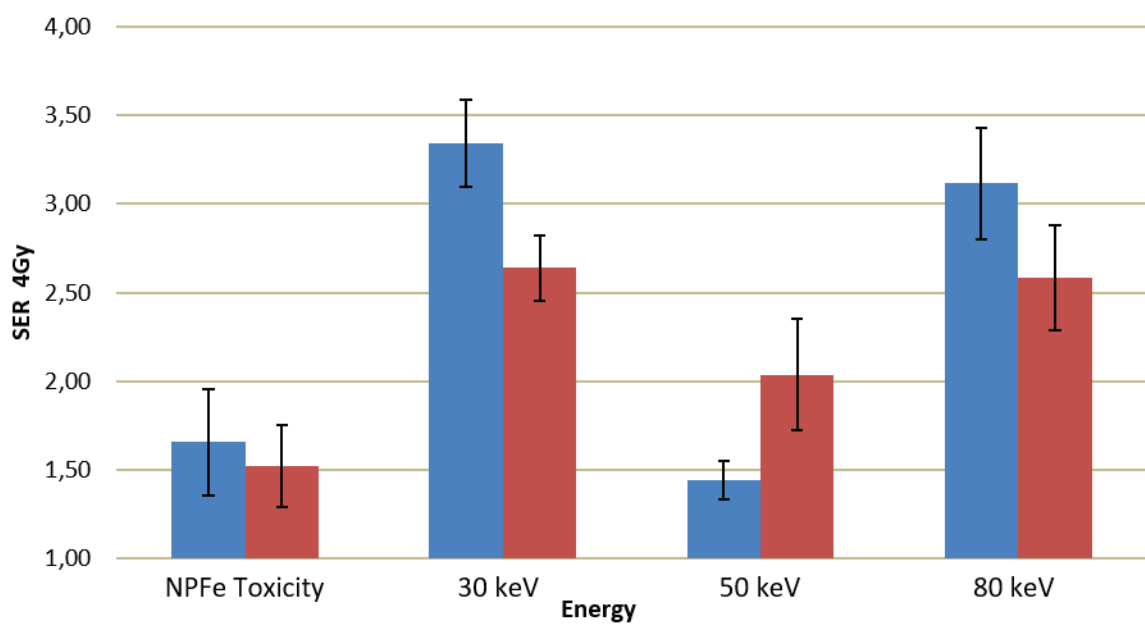


Figure IV-19 : SER 4 Gy mesuré par test ATPLite, pour 3 énergies et 2 concentrations de NPF_e (0.06 mg/mL (en rouge) et 0.3 mg/mL (en bleu)). Les résultats obtenus par ATPLite sont similaires au test de clonogénicité.

On retrouve les même SER_{4Gy} autour de 3 pour les énergies de 30 et 80 keV, la faible toxicité des NPF_e, et le même SER_{4Gy} plus faible à 50 keV.

Le différentiel entre la dose absorbée en présence ou en absence d'éléments lourds est exprimé sous forme de facteur d'augmentation de dose qui est défini comme suit :

$$DEF = \frac{\text{Dose dans les tissus contenant des atomes lourds}}{\text{dose dans les tissus}} \quad (29)$$

Ce facteur d'augmentation de dose est souvent dénommé « DEF » pour « Dose Enhancement Factor ». Il résulte d'un calcul théorique et dépend de l'énergie des photons considérés et de la quantité d'éléments lourds présents dans le milieu. En première approximation, le mélange est supposé être homogène, ce qui ne correspond pas à la réalité expérimentale lorsque l'on utilise des nanoparticules de fer.

La Figure IV-20 représente ce DEF pour plusieurs éléments lourds à une concentration de 10 mg/mL.

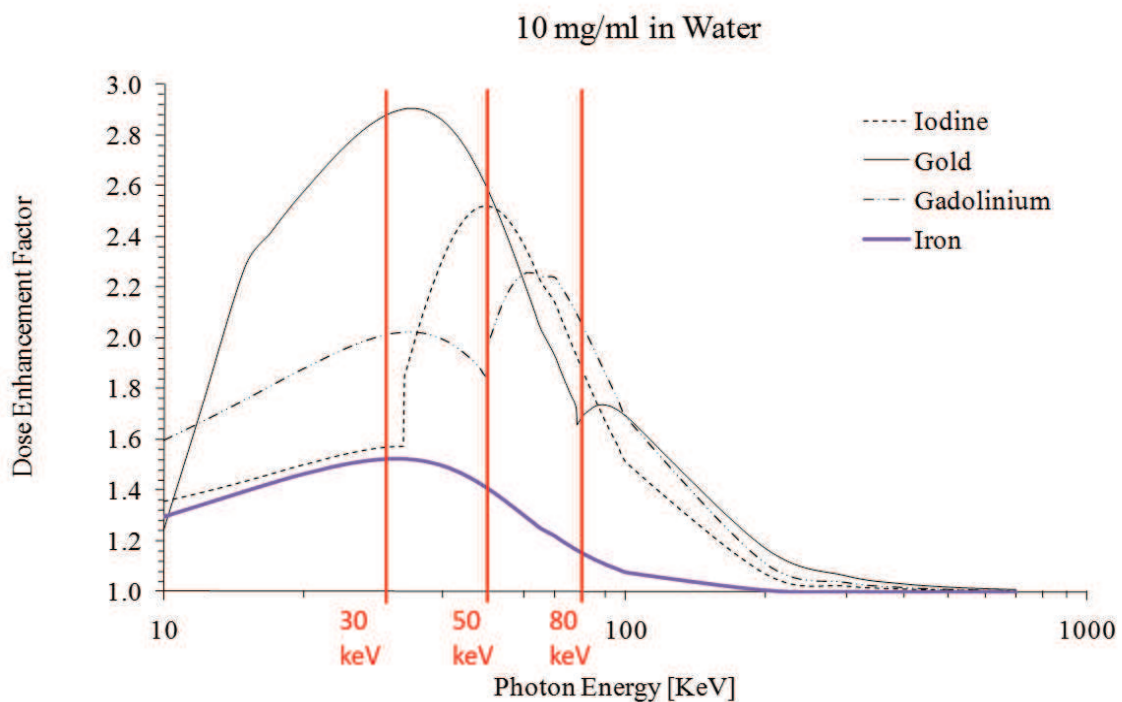


Figure IV-20 : DEF théoriques pour une concentration de Fer, Iode, Gadolinium ou Or de 10 mg/ml

Résultats biologiques

Aux énergies qui pourraient être utilisées pour une radiothérapie clinique ($E > 80$ keV), on voit sur ce graphe qu'à concentration égale, les éléments de $Z > 53$ (iode) produisent des DEF du même ordre de grandeur. Bien que présentant un DEF plus faible que les autres éléments, à concentration équivalente, si les NPF_e peuvent se concentrer plus fortement que les autres sans provoquer d'effet cytotoxique, elles pourront présenter un DEF beaucoup plus élevé.

D'autres facteurs sont à prendre en compte pour refléter les effets biologiques induits, en particulier, le parcours des photoélectrons et la localisation des atomes lourds par rapport à différentes cibles de la cellule (noyau, membrane, mitochondrie etc.) sont à considérer.

La différence observée dans notre expérience à 50 keV, avec un SER_{4Gy} presque deux fois plus faible, n'est pas en accord avec le facteur d'augmentation de dose macroscopique. En effet, si on calcule le DEF du fer pour une concentration de fer reparti de façon homogène dans de l'eau de 40 mg/ml (Figure IV-21), on voit que la dépendance en énergie ne présente pas un creux à 50 keV mais plutôt une pente descendante régulière de 30 à 80 keV.

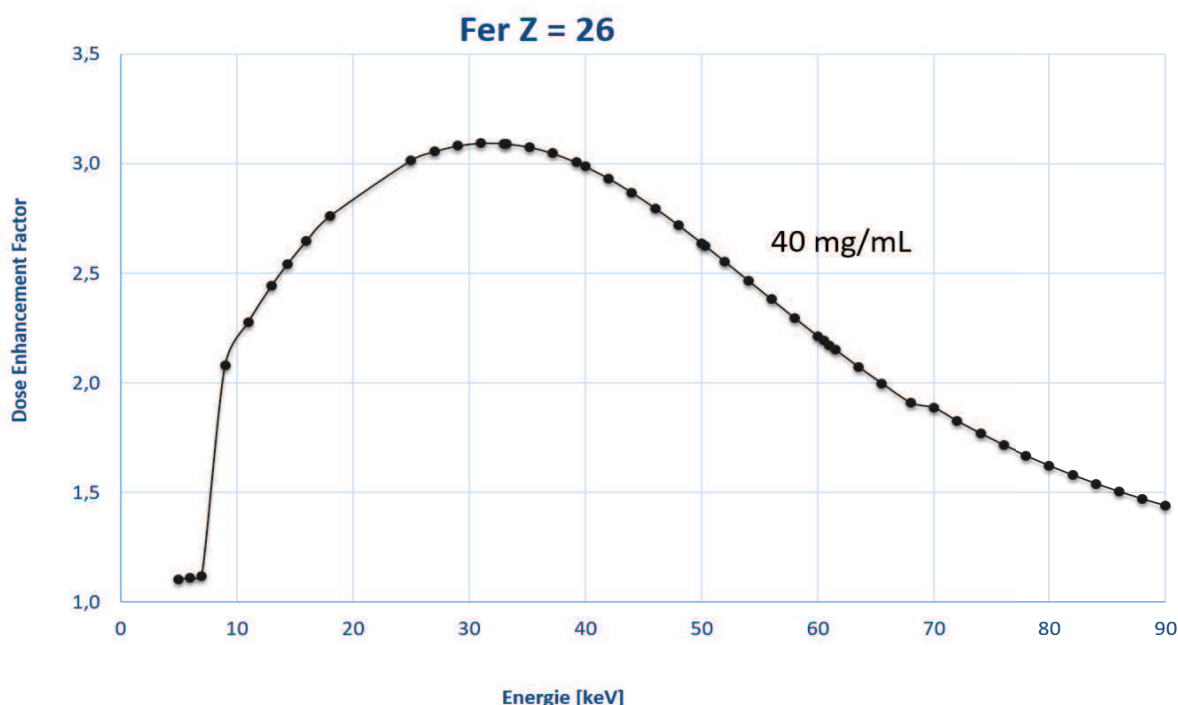


Figure IV-21 : DEF théorique du Fer pour une concentration de 40 mg/ml, compatible avec facteur d'augmentation de dose de 3.

Pour autant le DEF ne prend pas en compte tous les aspects géométriques et biologiques, et de nombreux phénomènes pourraient expliquer cet écart à la valeur attendue. Le nombre de cellules récupérées par condition n'étant pas très important, les échantillons n'ont pas été envoyés pour une mesure ICPMS afin de déterminer leur incorporation le jour de l'expérience. Une mauvaise incorporation pourrait expliquer l'écart de survie entre les énergies, par conséquent il est important pour chaque expérience de faire en parallèle la mesure d'incorporation, même si cela demande de préparer beaucoup plus de cellules et donc consomme beaucoup de NPFe.

Le calcul de DEF macroscopique ne prend pas en compte la nature des nanoparticules, ni la différence des concentrations extra versus intra cellulaires, or on a vu précédemment que les cellules concentrent jusqu'à plus de cent fois le fer.

Si l'on considère les énergies des photoélectrons produits après irradiation à 30, 50 et 80 keV, elles sont respectivement de 23, 43 et 73 keV. Cela correspond à un parcours moyen dans l'eau pure de 8, 30 et 77 microns, respectivement (NIST ESTAR) (Figure IV-22).

Pour une irradiation réalisée à 30 keV, les photoélectrons vont majoritairement déposer leur énergie dans la cellule ou ils ont été émis. A 50 et 80 keV, ils pourront déposer leur énergie dans plusieurs cellules. Une modélisation précise par calculs Monte Carlo permettrait d'affiner le facteur d'augmentation théorique en prenant en compte ces différents éléments.

WATER, LIQUID

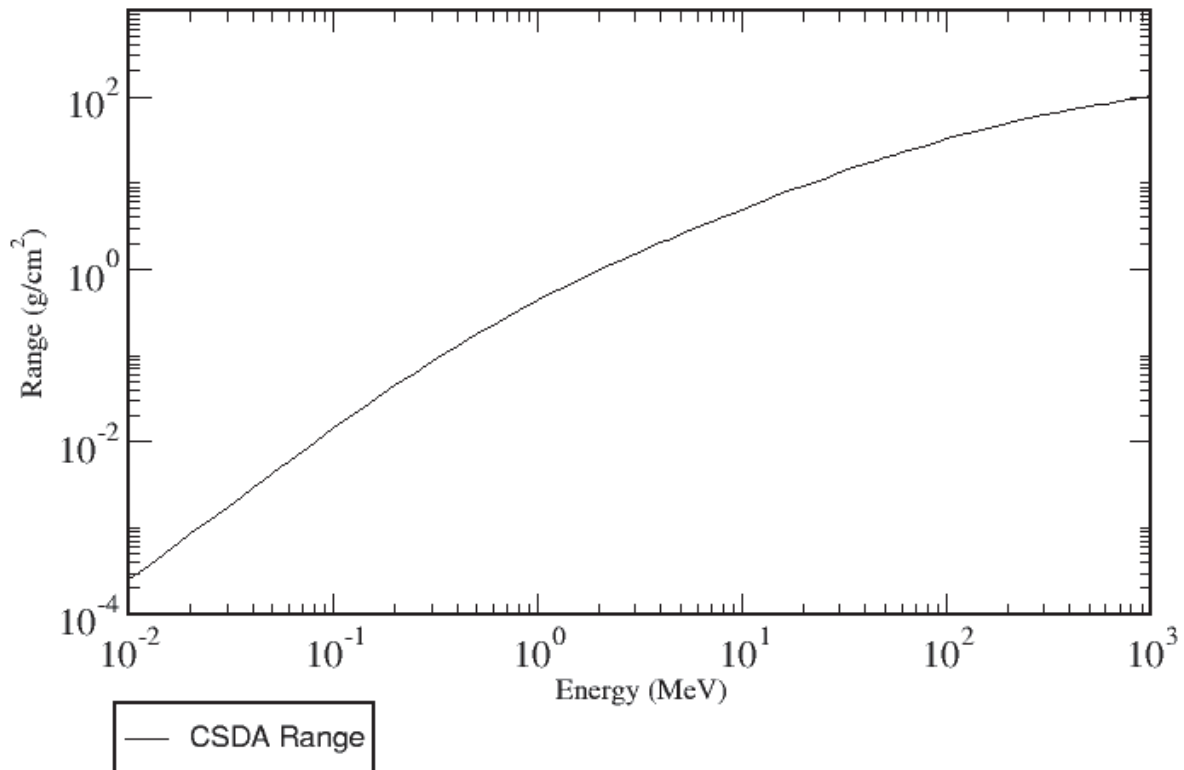


Figure IV-22 : Libres parcours moyen des électrons dans l'eau. (NIST ESAR)

Si l'on compare cette étude aux études de Kleinauskas et Choi ((Kleinauskas et al. 2012; Choi et al. 2012), plusieurs éléments ressortent. Tout d'abord malgré une irradiation à des énergies beaucoup plus élevées, on obtient la même magnitude d'augmentation de dose *in vitro*. C'est très intéressant car les rayons X de 7 keV parcourent dans les tissus une distance très faible. Un faisceau à 7 keV est atténué de moitié dans les tissus après moins d'un mm. Augmenter l'énergie d'irradiation permet d'augmenter la profondeur de pénétration du rayonnement et donc la profondeur des cibles tumorales potentielles. Cela évite de limiter les applications possibles à des tumeurs superficielles.

La localisation des NPFe autour du noyau et leur forte concentration dans les cellules (plus de 120 pg/cellule) sont des caractéristiques que l'on a retrouvées dans les mêmes proportions avec notre modèle cellulaire.

En comparaison avec ce qu'il est possible d'obtenir avec des agents de contraste iodés, les nanoparticules de fer permettraient d'atteindre des augmentations de dose beaucoup plus grandes : 3 versus 1.20 pour l'iode à des concentrations accessibles en clinique ; il reste cependant à établir qu'il est possible avec les nanoparticules de fer d'obtenir in vivo de telles concentrations intra cellulaires uniformément dans la tumeur.

IV.2.5 Conclusion

Une irradiation basse énergie d'éléments lourds maximise l'interaction photoélectrique et son utilisation en radiothérapie est développée depuis quelques années. Hainfeld a popularisé l'utilisation de nanoparticules d'or, et la majorité des études se penchent sur cet élément. Mais d'autres solutions existent et les NPFe se sont montrées prometteuses. Les caractéristiques observées en début de chapitre, c'est-à-dire une internalisation forte et une localisation autour du noyau permettent d'expliquer en partie l'effet très important observé lors de la radiothérapie par effet photoélectrique avec un SER_{4Gy} autour de 3 pour les énergies de 30 et 80 keV, observé conjointement par test clonogénique et test ATPLite. La possibilité d'irradier du fer à de telles énergies, bien au-dessus de son K-edge (7,11 keV) et d'observer malgré tout l'augmentation de radiosensibilité permet d'envisager avec le fer des cibles tumorales plus profondes que permises par la faible pénétration des photons de basse énergie (quelques mm).

Des études *in vivo* utilisant les NPFe et la photo-activation combinées avec des solutions innovantes comme l'invasivité et les propriétés infiltrantes des macrophages constitue un champ d'étude prometteur qui pourrait donner des résultats.

IV.3 Radiothérapie par Effet Mössbauer

IV.3.1 Spectre Mössbauer de nanoparticules de fer

La source à température ambiante du CEA, gérée par Martin Clémancey, nous a permis d'obtenir un spectre Mössbauer à 80K de 50 mg des nanoparticules d'oxyde de fer (NPF_e) synthétisées par Choi *et al.* La préparation de l'échantillon est détaillée au § V.3.1, p. 161 (Figure IV-23).

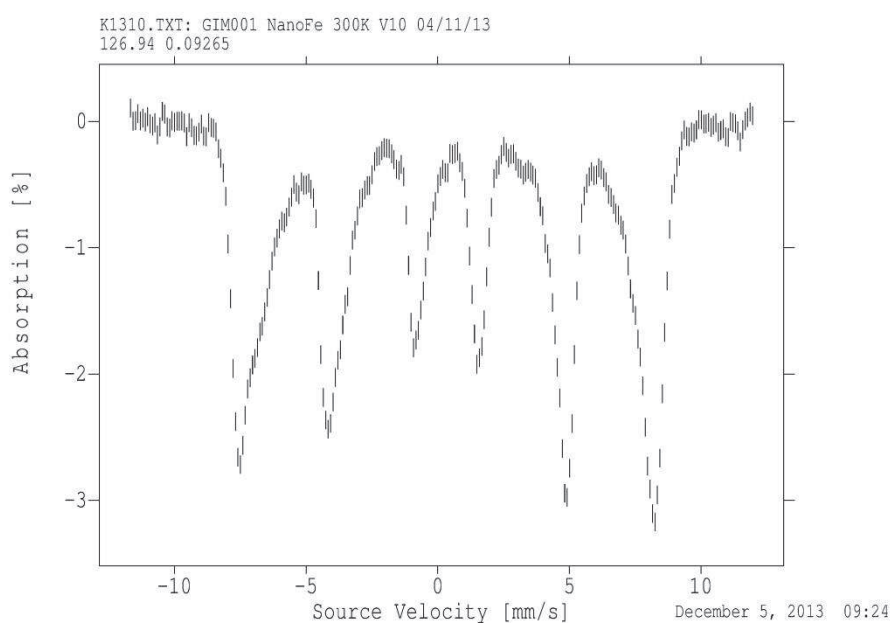
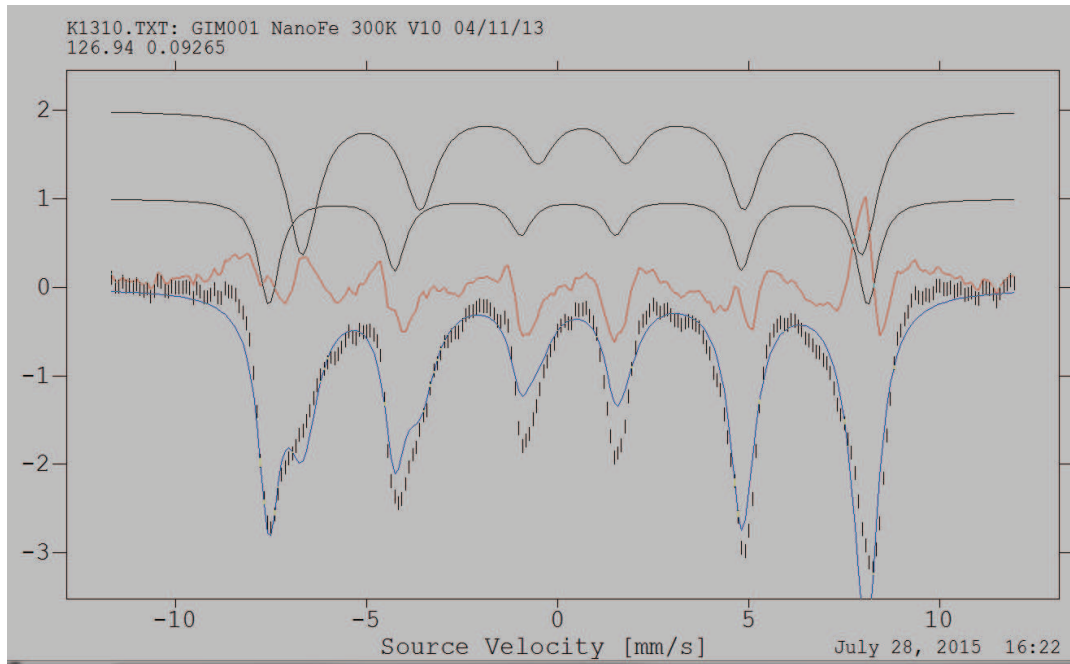


Figure IV-23 : Spectre Mössbauer à 300K de 50mg de nanoparticules de magnétite acquis au CEA Grenoble.

Ce spectre permet de mettre en évidence le sextuplé caractéristique du fer. Le spectre peut être fitté avec des lorentziennes selon les paramètres connus pour le Fe₃O₄, qui possède deux sites cristallographiques distincts.

Résultats biologiques



Les paramètres extraits sont les suivants : deux sites cristallographiques pour le Fer dans un rapport 1 pour 2 : Site 1 : $\delta=0.28$ mm/s et $H_{\text{eff}} = 488$ kG. Site 2 : $\delta=0.64$ mm/s et $H_{\text{eff}}= 456$ kG, ce qui correspond bien aux paramètres de la magnétite.

Afin d'observer si l'effet MB a toujours lieu dans un milieu non rigide et donc plus proche d'un milieu vivant, les NPFe ont été dispersées dans un gel d'agarose à 4%, à une concentration plus importante de 200mg/ml, selon la procédure suivante : de la poudre d'agarose (Low melting point) est versée dans un bécher contenant de l'eau, chauffée à 80°C. Pendant son refroidissement l'agarose est mélangée à la quantité nécessaire de NPFe afin d'obtenir la concentration finale désirée, ici 200 mg/ml. Puis l'échantillon est laissé à température ambiante pour gélification, et enfin inséré dans le spectromètre.

Un spectre à 80K a été acquis (Figure IV-24).

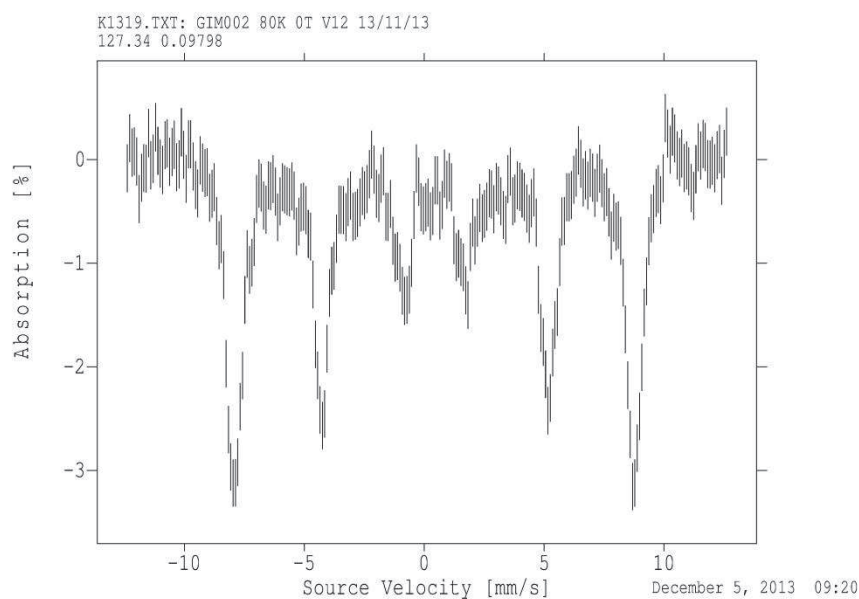


Figure IV-24 : Spectre Mössbauer à 80K de nanoparticules de magnétite acquis au CEA Grenoble.

Les raies Mössbauer sont moins intenses car il y a une trop grande quantité de fer, la transmission dans l'échantillon est trop faible pour être détectable à température ambiante, d'où une mesure à basse température.

Après avoir obtenu ces spectres Mössbauer au CEA nous avons considéré la possibilité d'analyser ces échantillons sur la ligne synchrotron ID18.

IV.3.2 Expérience sur ID18 : NIS et DOS

Après concertation avec Rudolf Ruffer, responsable de la ligne ID18, et Alexander Chumakov, scientifique de la ligne, nous avons décidé de ne pas effectuer une irradiation de cellules sur la ligne sans avoir testé l'effet MB dans des conditions proches de l'expérience. En effet, le faisceau sur ID18 étant très focalisé (0,5 mm x 1,2 mm), le débit de dose est important et l'irradiation de cellules est donc rendue très difficile. D'un commun accord, nous avons préparé un échantillon pour une mesure de DOS (densité des phonons) par NIS (diffusion nucléaire inélastique).

Avant d'effectuer l'expérience, nous avons scanné une chambre d'irradiation (PTW 31010, Freiburg, Allemagne) devant le faisceau et intégré la dose sur toute la hauteur de la chambre d'ionisation pour mesurer un débit de dose de 2,39 Gy/s, pour un courant dans l'anneau de stockage de 192.455 mA.

Ensuite, un capillaire en quartz (GLAS, W. Müller, Schönwalde, Allemagne) de 10 μm d'épaisseur et de 2 mm de diamètre a été rempli avec 100 μl de gel d'agarose à 4% contenant 200 mg/ml de NPFe (comme décrit ci-dessus). Ce capillaire, monté sur le support d'irradiation et disposé au-dessus d'un détecteur de fluorescence X a été aligné puis irradié pendant 12h (Figure IV-25).

NPF_e + agarose

Détecteur de fluorescence

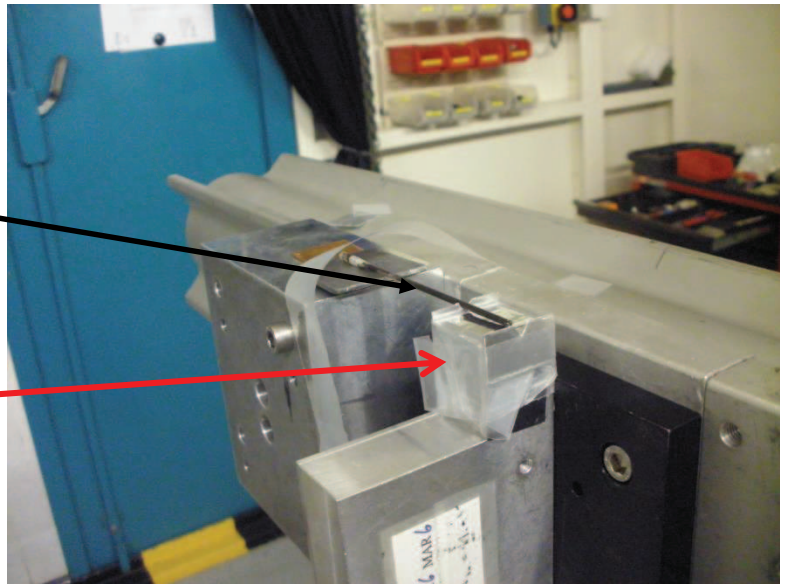


Figure IV-25 : Expérience de NIS sur ID18. 200mg/ml de NPF_e dans de l'agarose à 4% sont irradiés afin de déterminer si l'effet Mössbauer a lieu dans des NPF_e à température ambiante dans un milieu semi-rigide. Le détecteur de fluorescence placé sous le capillaire permet de récolter les rayons x de fluorescence K_α à 6.4 keV provenant de la conversion interne au sein des noyaux de fer, donc apparaissant avec un délai par rapport à la fluorescence due à l'effet photoélectrique.

Cette expérience a permis d'acquérir le spectre de NIS suivant (Figure IV-26).

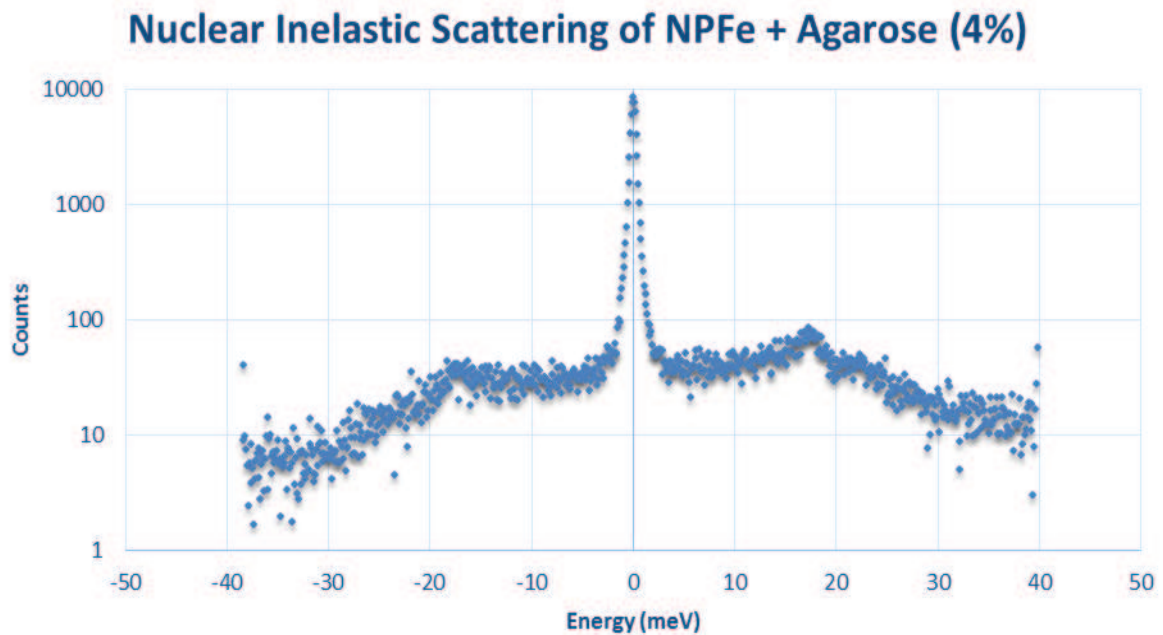


Figure IV-26 : NIS à température ambiante de NPF_e dans de l'agarose à 4%.

Résultats biologiques

La largeur à mi-hauteur calculée du pic (FWHM) est de 0,684 meV. Cette faible valeur est surprenante pour un échantillon dans un milieu non rigide. Elle correspond à la largeur à mi-hauteur de la fonction instrumentale mesurée pour l'expérience (données non montrées). En pratique cela signifie que la résolution du pic de résonance est trop petite pour être mesurée sur la ligne ID18.

Cela prouve que la mesure dans un milieu non-rigide et à température ambiante ne provoque pas un élargissement de la résonance trop important pour supprimer l'effet MB. On a donc la preuve indirecte que l'effet MB a bien lieu en présence de nanoparticules dispersées dans un gel d'agarose et à température ambiante. Pourtant d'autres informations peuvent être retirées de cette mesure.

Zhang (X. Zhang et al. 1995) a utilisé le formalisme de (Singwi and Sjölander 1960) pour déterminer le coefficient de diffusion d'atomes de ^{57}Fe en solution dans de l'acide chlorhydrique. En utilisant la même formule, la largeur du pic de résonance est reliée à la diffusion des atomes de fer selon la relation :

$$\Delta E = 2\hbar\kappa^2 D = \frac{2E_\gamma^2 D}{\hbar c^2} \quad (30)$$

Avec E_γ l'énergie de résonance, d'où :

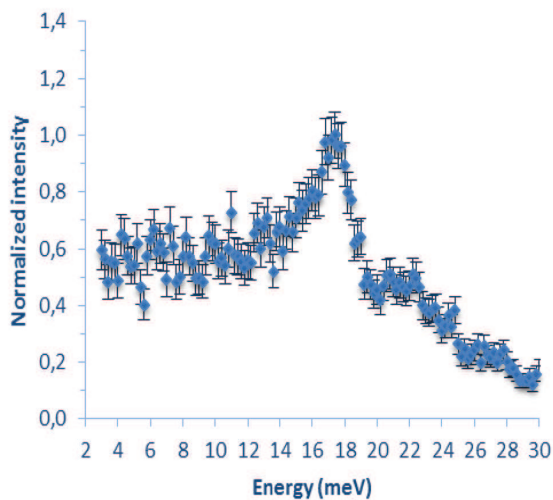
$$D = \frac{\Delta E \hbar c^2}{2E_\gamma^2} \quad (31)$$

Comme vu précédemment, la largeur du pic dans notre expérience équivaut à la fonction instrumentale. Il faut donc la considérer comme la limite supérieure de la largeur réelle. On obtiendra donc par le calcul la limite supérieure du coefficient de diffusion.

Le calcul donne $D \approx 1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, donc le coefficient de diffusion du ^{57}Fe dans des NPFe à 200 mg/ml dans un gel d'agarose à 4% est au maximum de $1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Du spectre NIS (Figure IV-26) et grâce à l'aide de A. Chumakov, nous avons extrait le DOS. Une comparaison avec le DOS de la magnétite tel que mesuré par (Handke *et al.* 2005) permet de voir (Figure IV-27) la grande similitude entre les deux mesures (pic à 17 meV, plateau à 0,6 entre 4 et 14 meV).

Reduced DOS NPF_e + Agarose (4%)



Reduced DOS bulk Magnetite

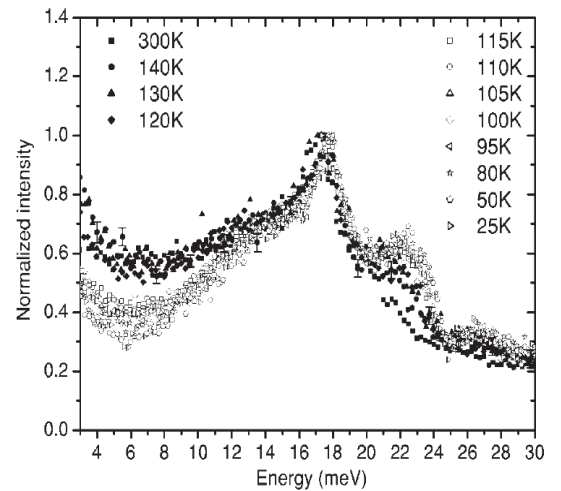


Figure IV-27 : Comparaison de DOS de NPF_e + Agarose 4% à température ambiante (gauche) et de DOS de magnétite à différentes température (droite). Chaque courbe est normalisée avec le pic à 17 meV.

Cette similitude permet d'affirmer que la dynamique cristalline, c'est-à-dire la distribution de phonons entre d'une part, la magnétite et d'autre part, des nanoparticules de magnétite dans de l'agarose, est similaire. L'interaction Mössbauer est donc confirmée, même dans des conditions très différentes d'une feuille de magnétite. La température ambiante, le milieu semi-rigide et le fer sous forme de nanoparticules n'ont que peu d'influence sur le comportement dynamique du réseau d'atomes de fer et donc du ⁵⁷Fe présent. Cela montre que l'on puisse obtenir de l'effet MB à température ambiante dans un milieu biologique, en utilisant des nanoparticules de Fe.

IV.3.3 Thérapie Mössbauer expérimentale

IV.3.3.5 Choix de l'expérience

Afin d'observer l'effet d'une irradiation Mössbauer sur des cellules ayant internalisé des nanoparticules de fer, nous avons cherché la source la plus adaptée pour notre expérience.

La majorité des spectromètres Mössbauer conventionnels sont dits à « accélération constante » car la source est accélérée de -10 à +10 mm/s tout au long de la mesure. Or nous avons vu dans la littérature que Mills a utilisé un spectromètre à vitesse constante. Certains spectromètres proposent ces deux modes de fonctionnement, mais le mode « accélération constante » étant le plus utilisé, l'autre mode est tombé en désuétude. Pourtant pour notre utilisation particulière où nous cherchons à irradier avec une énergie précise plutôt qu'à balayer un spectre en énergie, le mode « vitesse constante » serait idéal. Nous pourrions alors irradier à deux énergies (2 vitesses différentes), une à la résonance Mössbauer (*on resonance*), et une autre en dehors du pic de résonance Mössbauer (*off resonance*), pour bien différencier les effets dus à l'effet Mössbauer et ceux dus à l'effet photoélectrique. Après quelques recherches, nous n'avons trouvé des spectromètres fonctionnant en mode « vitesse constante » que très loin, notamment auprès de Valentin Filippov au National Research Nuclear University « MEPhI » à Moscou. Voyant que les spectromètres disponibles de manière raisonnable fonctionnent tous en mode « accélération constante », nous avons décidé de comparer une irradiation de cellules incubées avec des NPFe enrichies ou non en ^{57}Fe plutôt qu'une irradiation *on* et *off-resonance*.

Grâce à cet enrichissement on obtient environ 50 fois plus de ^{57}Fe et donc 50 fois plus d'effet MB pour une des conditions de l'expérience, ce qui permet de mettre en évidence l'efficacité de l'effet MB par une simple expérience de survie cellulaire. Après quelques calculs pour déterminer la source de rayonnement MB la plus intense en fonction de la distance à la source, de l'énergie des photons et de l'aire irradiée, nous nous sommes tournés vers l'irradiateur Mössbauer à température ambiante du CEA (voir § I.1.1, p. 20).

Les cellules tumorales utilisées sont un modèle de gliome de rat, F98, dont la culture cellulaire (détaillée dans le § V.2, p. 157) est bien maîtrisée au laboratoire. Leur interaction avec les NPFe est détaillée au Chapitre 4. La technique du test de clonogénicité effectué dans le paragraphe suivant est expliquée en détail dans le § V.2.5, p. 159.

IV.3.3.6 Dosimétrie et irradiation

Une chambre d'ionisation PTW 31010, reliée à un électromètre PTW UNIDOS et placée sur le porte-échantillon et tout contre le collimateur a permis de mesurer un débit de dose de 2,45 mGy/h. C'est proche de la valeur théorique calculée : 2,7 mGy/h.

Les échantillons sont préparés selon le protocole décrit au § V.2.7.8, p. 160. Chaque échantillon est irradié 2h, ce qui correspond à une dose de 4,9 mGy par effet photoélectrique. Si on prend en compte l'effet MB en revanche, cette dose doit être multipliée par 450, ce qui correspond au maximum à 2,2 Gy, une dose dont l'effet serait mesurable par un test de survie cellulaire.

Les cellulesensemencées à une concentration très faible après irradiation sont colorées 13 jours plus tard au cristal violet et les colonies formées dans l'intervalle sont dénombrées.

IV.3.3.7 Résultats et discussion

Afin de mesurer l'effet des NPFe sur la survie cellulaire, le ratio de radiosensibilisation (Sensitivity Enhancement Ratio, SER) est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{SER} = \frac{\text{Survie sans nanoparticules}}{\text{Survie avec nanoparticules}} \quad (32)$$

Un $\text{SER} > 1$ signifie que les cellules sont plus radiosensibles en présence de NPFe. Les NPFe augmentent l'effet de la radiothérapie. Au contraire un $\text{SER} < 1$ signifie que les NPFe ont un effet radioprotecteur. Elles diminuent l'effet du traitement de radiothérapie.

Les erreurs statistiques ont été calculées en tenant compte de la propagation des erreurs, selon la formule :

Résultats biologiques

$$\sigma_{SER} = \left| \frac{S_{Control}}{S_{NPFe}} \right| \times \sqrt{\left(\frac{\sigma_{S_{Control}}}{S_{Control}} \right)^2 + \left(\frac{\sigma_{S_{NPFe}}}{S_{NPFe}} \right)^2} \quad (33)$$

La toxicité des nanoparticules est évaluée dans ce cas par le ratio entre survie cellulaire sans irradiation en présence et en absence de NPFe.

La significativité des résultats a été évaluée avec un t-test de Student bilatéral, et considérée suffisante lorsque $p \leq 0,05$.

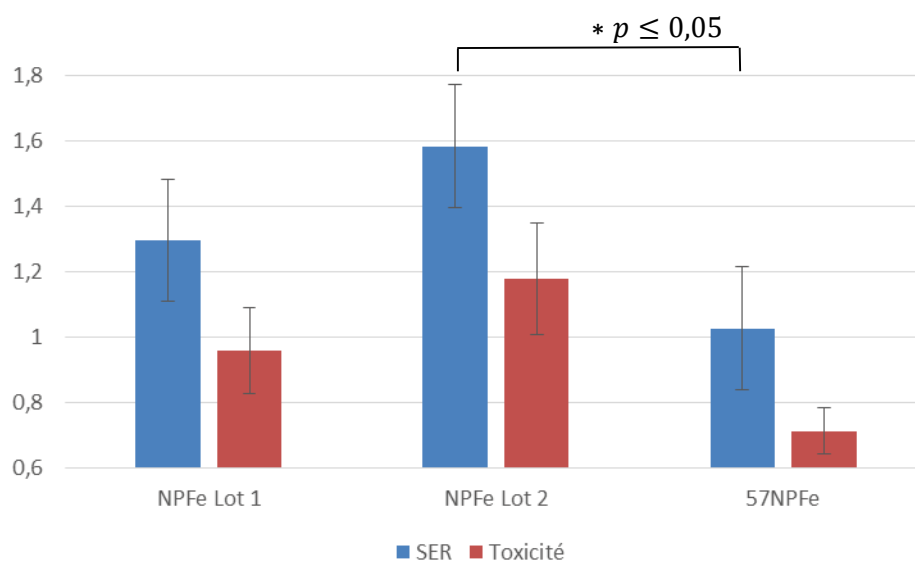


Figure IV-28 : SER_{4Gy} et Toxicité de trois lots de NPFe irradiés par une source Mössbauer à température ambiante. Le lot Roux57 est constitué de nanoparticules de magnétite enrichie en ⁵⁷Fe dans une proportion de 2/3.

Le SER des ⁵⁷NPFe est très proche de 1, alors qu'il est plus élevé pour les autres lots, malgré leur faible proportion en ⁵⁷Fe. La différence entre les lots 1 et 2 n'est pas significative. En revanche elle l'est entre le Lot 2 et les ⁵⁷NPFe. La toxicité des ⁵⁷NPFe est étonnamment basse, et sûrement issue d'un problème de croissance des cellules témoin utilisées avec le lot ⁵⁷NPFe.

L'internalisation des NPFe n'a pas été mesurée lors de cette expérience car la méthode d'ICP-MS nécessite un grand nombre de cellules, autour d'un million par condition afin d'obtenir une statistique convenable. Ce nombre de cellules n'est pas atteignable lorsque les cellules sont cultivées sur une surface de 1 cm², comme c'est le cas ici.

De plus, alors que l'internalisation des NPFe est bien connue grâce aux expériences décrites dans le chapitre 2, elles n'ont pas été menées pour les ⁵⁷NPFe. Pour autant l'observation au microscope des cellules en culture juste avant l'irradiation a permis de déterminer que les ⁵⁷NPFe sont internalisées différemment. Elles ne se concentrent pas autour du noyau et ne forment pas des amas visibles au microscope. Leur taille et leur agglomération différentes impliquent une internalisation différente, qu'il faudrait prendre en compte pour évaluer la quantité de ⁵⁷Fe présent dans les cellules F98 irradiées.

La dose déposée est très faible, de l'ordre de 4,9 mGy. En conséquence, les cellules ne devraient pas subir de modification de leur capacité à se multiplier. Pourtant un effet est observé pour les cellules contenant les 2 lots de NPFe. La première explication possible vient des conditions d'irradiation : pendant les 2h d'irradiation les cellules sont laissées à température ambiante, dans une atmosphère non enrichie en CO₂. Si cela cause une mortalité accrue des cellules ayant endocyté des NPFe, alors on peut observer une radiosensibilisation, qui est seulement un artefact. Les contrôles qui n'ont pas été irradiés mais qui ont été sortis de l'incubateur et transporté sur les lieux de l'irradiation ont en effet montré une mortalité élevée. Afin de pouvoir tirer des conclusions plus solides l'expérience doit être recommencée en reproduisant les conditions de l'incubateur : un système de régulation de température ainsi qu'une atmosphère à 5% de CO₂. Cela permettra de s'affranchir de la toxicité liée à une extraction trop longue de l'incubateur.

Une alternative consisterait à augmenter radicalement l'activité de la source, la contrainte forte provenant du prix d'une telle source. Une source Mössbauer 1000 fois plus active permettrait de délivrer un débit de dose (DdD) de 2,7 Gy/h. Pourtant relativement faible, il permettrait de mettre en

évidence très rapidement la présence ou l'absence de l'effet Mössbauer. Un temps d'irradiation raisonnable de 10 minutes permettrait de négliger les effets d'une sortie de l'incubateur. Pas besoin de mettre en place un régulateur de température et une atmosphère contrôlée au niveau de l'irradiateur Mössbauer, ce qui est très compliqué car l'enceinte d'irradiation est de dimension très réduite.

L'activité de la source utilisée était de 8,8 MBq (Mega Becquerels) le jour de l'irradiation. Au CEA, les sources neuves sont de 1,85 GBq. Espérer une source 1000 fois plus intense est donc illusoire pour des questions de sécurité. Mais une source 200 fois plus intense est tout à fait possible si elle est installée en priorité sur l'irradiateur à température ambiante. Or le laboratoire de JM Latour possède d'autres irradiateurs reliés à des systèmes cryogéniques qui permettent de travailler autour de 4K et sont donc les sources les plus utilisées. Toute nouvelle source arrivant au laboratoire sera mise en priorité sur ces équipements, plutôt que sur l'irradiateur à température ambiante.

Enfin une autre possibilité expliquant l'absence d'effet observé réside dans la source elle-même. Nous avons choisi de la laisser immobile en espérant que les raies Mössbauer de la magnétite recoupent la ligne à 0 mm/s (Figure IV-24). Un irradiateur Mössbauer à vitesse constante permettrait, moyennant un grand nombre de tests, de comparer des irradiations à différentes vitesses et de maximiser l'effet Mössbauer.

L'information principale à retirer de cette expérience consiste en l'absence criante de radiosensibilisation des $^{57}\text{NPF}_{\text{e}}$ malgré une irradiation sur une source Mössbauer avec une installation simplifiée au maximum. Le perfectionnement de l'expérience pourra apporter la réponse à la faisabilité de la thérapie Mössbauer.

IV.4 Conclusion

Malgré nos efforts et les résultats encourageants obtenus dans ces travaux pour montrer la présence d'un effet Mössbauer dans les NPFe à température ambiante et dans un milieu semi-rigide, cela n'a pas pu se concrétiser lors de l'expérience d'irradiation *in vitro*.

Une étude plus poussée prenant en compte tous les aspects mis en avant dans ce chapitre permettrait d'évaluer précisément l'étendue de l'effet Mössbauer dans un contexte de radiothérapie. Dans notre cas nous avons seulement pu mettre en exergue sa difficulté de mise en œuvre si l'on veut prendre en compte tous les paramètres. Contrairement à notre idée initiale, la source Mössbauer sur la ligne synchrotron ne nous apporte pas l'intensité désirée, car la focalisation du faisceau ne permet pas d'irradier une zone suffisante pour des tests *in vitro*. Néanmoins les échanges fructueux avec l'équipe présente sur ID18 nous ont permis de nous poser les bonnes questions et de répondre à des questions théoriques liées à notre problème. La distribution des phonons dans les NPFe au sein de l'agarose qui se révèle être similaire à celle présente dans le fer a été une découverte intéressante, car en conséquence la largeur du pic Mössbauer est peu augmentée malgré la semi-rigidité et la température ambiante.

Pour conclure d'autres études sont nécessaires pour confirmer ou discréditer totalement la thérapie Mössbauer.

IV.5 Résumé de Chapitre

Dans ce chapitre nous avons observé l'interaction des NPFe avec les cellules tumorales (pas de cytotoxicité, grande internalisation et localisation dans la cellule autour du noyau). Puis nous avons détaillé les méthodes utilisées pour mesurer les effets d'une irradiation monochromatique basse énergie propice à la photo-activation des NPFe, les tests de clonogénicité et ATPLite. Les résultats très intéressants d'une expérience *in vitro* sur ID17 ont ensuite été détaillés puis interprétés, montrant un SER_{4Gy} autour de 3 pour des irradiations monochromatiques de 30 et 80 keV, mesurés par des tests de clonogénicité et de production d'ATP. Ils confirment les résultats obtenus sur d'autres modèles tumoraux par Choi (Choi et al. 2012) et Kleinauskas (Kleinauskas et al. 2012) concernant aussi bien l'internalisation que la localisation et la radiosensibilisation des NPFe.

Nous avons ensuite acquis des spectres Mössbauer des NPFe puis effectué une expérience de NIS au synchrotron qui nous a permis de déterminer que la température ambiante, le milieu semi-rigide et le fer sous forme de nanoparticules n'ont que peu d'influence sur le comportement dynamique du réseau d'atomes de fer et donc du ^{57}Fe présent. Cela suggère que l'on puisse obtenir de l'effet MB à température ambiante dans un milieu biologique, en utilisant des nanoparticules de Fe. Un test clonogénique après irradiation avec une source Mössbauer de cellules incubées avec des NPFe enrichies ou non avec un isotope Mössbauer ^{57}Fe n'a pas permis de mettre en évidence une radiosensibilisation particulière. Des pistes pour améliorer l'irradiation ont été listées : préserver les cellules dans les conditions de l'incubateur pendant l'irradiation, ou bien augmenter drastiquement le DdD sur la source Mössbauer, et enfin se procurer une source Mössbauer à vitesse constante. Finalement la question initiale n'est pas tranchée, et la thérapie Mössbauer conserve sa part de mystère.

CHAPITRE 5

Matériels et Méthodes

V- Matériels et méthodes.

V.1 Préparation des nanoparticules

Le protocole peut être détaillé en quelques lignes [(Vijayakumar et al. 2000), (Park et al. 2007)]:

1,72 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et 4,70 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (8,65 mmol Fe^{2+} /17,30 mmol Fe^{3+}) sont dissous dans 80 ml d'eau distillée. Un précipité magnétique noir est obtenu en chauffant la solution à 80°C sous atmosphère d'argon, tout en augmentant le pH à 10 en ajoutant de l'hydroxyde d'ammonium à 30% dans l'eau, et en soumettant le tout à des ultrasons pendant une heure (20 kHz, 140 W).

L'alginate utilisé pour tapisser la surface des nanoparticules est ajouté dans un deuxième temps : 2g des nanoparticules précédemment obtenues sont diluées dans 60 ml d'eau salée et 25 ml d'acide alginique par chauffage de la solution à 80°C, mélange continu avec un barreau magnétique et sonication à 50W pendant 30 minutes sous atmosphère d'azote. Les NPFe sont ensuite purifiées par lavage avec de l'eau salée alors qu'elles sont attirées par un aimant intense en néodyme (densité de champ magnétique $B_r = 11000$ Gauss). Finalement on obtient un ferrofluide contenant 25 mg/ml de NPFe.

Les nanoparticules fabriquées ont ensuite été analysées par TEM (Microscopie Electronique en Transmission). Une goutte de la solution a été déposée sur une grille de cuivre recouverte de carbone, séchée à température ambiante avant d'être observée avec un TEM Zeiss 902 (Carl Zeiss Pte., Ltd., Oberkochen, Germany) avec une tension de 80 kV.

V.2 Culture cellulaire

V.2.1 Matériels

Matériels et méthodes.

Le milieu de culture : DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium (1X), liquid (high glucose), with GlutaMAX™ I, 4500 mg/L D-Glucose, Sodium Pyruvate), le sérum de veau fœtal (SVF), la pénicilline streptomycine (PS) et le PBS 1X (sans CaCl₂ et MgCl₂) proviennent d'Invitrogen, France. Le DMSO pour la congélation provient de Sigma-Aldrich. La trypsine-EDTA à 0,05% provient de chez Gibco. Les différentes flasques de culture, boîtes de Pétri, pipettes et tubes proviennent de chez Dutscher. La lignée cellulaire F98 vient de chez ATCC.

V.2.2 Repiquage des cellules

Les cellules F98 sont cultivées en flasques dans du milieu de culture auquel on ajoute 10% de SVF et 1% de PS et qu'on appelle par la suite « milieu complet ». La croissance de ces cellules adhérentes se fait dans une atmosphère à 5% de CO₂ à 37°C (incubateur). Leur temps de doublement *in vitro* est d'environ 19 heures.

Ces cellules sont rincées avec du PBS puis de la trypsine-EDTA est ajoutée dans la flasque, et une période de 5 min à 37°C permet le décollement des cellules de leur support. Ensuite du milieu de culture complet est ajouté arrêtant ainsi l'action de la trypsine. Cette solution cellulaire est ensuite centrifugée à 1500 g pendant 5 min à température ambiante. Enfin le culot cellulaire est repris dans du milieu complet afin de réensemencer les cellules à une concentration plus faible, dilution au 10^e généralement.

V.2.3 Congélation des cellules

Les cellules sont décollées grâce à la trypsine comme décrit § V.2.2, puis le culot cellulaire est repris dans 1 ml de milieu contenant 10% de DMSO que l'on transfère dans un cryotube. Les cryotubes sont ensuite placés dans une boîte de congélation, contenant de l'isopropanol qui permet une diminution lente de la température des cellules (1°C/min), cette boîte est placée dans un congélateur à -80°C. Le lendemain, les cryotubes sont placés dans un Dewar d'azote liquide (-196°C). Ce processus permet une conservation longue durée des cellules.

V.2.4 Décongélation des cellules

Le cryotube contenant les cellules est extrait du Dewar d'azote liquide et plongé dans un bain-marie à 37°C. 1 mL de milieu complet est ajouté au cryotube, puis les 2 mL sont transférés dans un Falcon de 15 mL et centrifugés à 1500 g pendant 5 min à température ambiante. Le culot cellulaire est repris dans 10 mL de milieu et réensemencé dans une flasque pour être cultivé en incubateur. Il faut ensuite repiquer les cellules quelques jours plus tard lorsqu'elles sont confluentes à 80%, puis vérifier leur croissance le lendemain pour s'assurer de leur viabilité.

V.2.5 Test de clonogénicité

Après avoir subi le traitement, les cellules sont centrifugées et le culot cellulaire est homogénéisé dans du milieu complet (généralement 5 mL). Les cellules sont comptées au microscope, après avoir placé 10 µL de la solution dans une cellule de Neubauer. La solution est ensuite diluée de sorte à obtenir la quantité de cellules à ensemercer dans un volume variant entre 5 et 500 µL. Ce volume est ensemercé dans trois boîtes de Pétri différentes, de 10 cm de diamètre, identifiées par un code-barres pour le compteur automatique, et contenant chacune 8 mL de milieu complet. Le nombre de cellules à ensemercer est estimé à partir d'expériences préliminaires, de manière à obtenir entre 50 et 150 colonies cellulaires⁴ au final. Pour mesurer la survie après une exposition aux NPs sans irradiation, 2 quantités de cellules différentes sont considérées : 100 et 200 cellules. Le *Plating Efficiency*⁵ (PE) des cellules F98 est de l'ordre de 60 à 70%. Sans traitement particulier, l'ensemencement de 100 cellules permet donc de compter environ 65 colonies après 12 jours d'incubation.

Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont placées à l'incubateur. 11 ou 12 jours après, le milieu de culture est retiré des boîtes, qui sont rincées au PBS 1X. Environ 1 mL de Crystal violet (25% crystal violet, 75% éthanol absolu), qui a pour propriété de colorer les noyaux des cellules, est ajouté dans chaque et laissé pendant 30 à 60 s. Les boîtes sont ensuite rincées à l'eau et séchées à l'air libre.

⁴ Une colonie cellulaire consiste en un foyer d'au moins 50 cellules.

⁵ Le *Plating Efficiency* correspond au pourcentage de survie des cellules sans traitement.

V.2.6 Test ATPLite

500 cellules par puits d'une plaque 96-puits sontensemencées juste après irradiation (J0). À J+4, les réactifs (solution de lyse et solution de substrat) sont tempérés. Le milieu de culture est retiré de toute la plaque 96-puits. 100 µl de milieu de culture est rajouté par puits. Trois puits témoins ne contenant pas de cellules se voient rajouter du milieu de culture également, pour servir de puits témoin. 50 µl de la solution de lyse sont ajoutées aux puits afin de lyser toutes les cellules. Après 5 minutes d'agitation, 50 µl de la solution de substrat sont ajoutées. Après 5 nouvelles minutes d'agitation, la plaque est laissée à l'abri de la lumière pendant une minute puis la luminescence est mesurée.

V.2.7 Irradiation des cellules

V.2.7.8 Sur ID18

Les cellules sontensemencées dans les puits d'une plaque 8-puits Lab-tek (Nunc, ThermoFisher) en Permanox, un plastique traité, et non en verre pour éviter les phénomènes de diffusion des rayons gamma dans le verre, qui peuvent modifier l'énergie déposée dans les cellules tumorales. Le premier puits est irradié car placé face au collimateur, et les deux derniers puits servant aux contrôles sont non irradiés, avec et sans NPF_e. Chaque puits mesure 1 cm², ce qui correspond à l'angle solide d'irradiation de la source MB au CEA à la sortie du collimateur de sécurité en plomb. En plaçant la plaque 8-puits verticalement, bien scellée pour éviter la fuite de milieu de culture, tout près de la source on obtient l'irradiation la plus efficace possible.

V.2.7.9 Sur ID17

Les cellules sont décollées de leur support comme décrit § V.2.2, puis le culot cellulaire est repris dans du milieu de culture et placé dans un tube Eppendorf de 2 mL, emmené du laboratoire à la cabine expérimentale dans un conteneur spécifique pour éviter toute contamination de l'échantillon.

V.3 Préparation d'échantillon

V.3.1 Spectres Mössbauer de nanoparticules de magnétite

La préparation de l'échantillon a consisté à verser 500 μ l de la solution de NPFe dans le porte-échantillon, puis de placer un aimant sous le contenant afin d'attirer les NPFe au fond. En retirant le surnageant et en répétant l'opération quatre fois il est possible d'augmenter la quantité de fer présente dans le porte-échantillon jusqu'à 50 mg. L'échantillon est ensuite maintenu à température ambiante pour laisser l'humidité résiduelle s'évaporer, avant d'être inséré dans le spectromètre.

V.3.2 Spectres Mössbauer de NPFe dans l'agarose

Pour préparer l'échantillon dans l'agarose, de la poudre d'agarose (Low melting point) est versée dans un bécher contenant de l'eau, chauffée à 80°C. Pendant son refroidissement l'agarose est mélangée à la quantité nécessaire de NPFe afin d'obtenir la concentration finale désirée, ici 200 mg/ml. Puis l'échantillon est laissé à température ambiante pour gélification, et enfin inséré dans le spectromètre.

V.3.3 ICP-MS

Après trois lavages des flasques au PBS, les cellules sont décollées avec de la trypsine, puis centrifugées. Le culot de cellules est repris dans du tampon Tris (0.2M et pH 7,3). Les échantillons sont ensuite minéralisés en présence d'acide nitrique et d'acide chlorhydrique (3.5 ml - 10.5 ml).

V.3.4 Films *in vivo* par microscopie optique

Les cellules F98 sontensemencées dans des petites boîtes de Pétri divisées en quadrants (Cellview, Glass bottom, 1,9 cm² contenant 500 μ l de milieu de culture par cadran), permettant d'imager simultanément plusieurs conditions de culture avec le minimum de mouvements du microscope. Les NPFe ont été incubées à une concentration de 0,06 mg/mL, lorsque les cellules ont atteint 80% de confluence.

V.3.5 Membranes de Si_3N_4

La préparation minutieuse des échantillons est nécessaire pour obtenir une bonne résolution. Cela nécessite de sécher et fixer pour immobiliser des cellules sur un support, en respectant le protocole suivant :

Des membranes de Si_3N_4 (Silson ltd, Northampton, Angleterre) de 1.5x1.5mm, et de 500 nm d'épaisseur manipulées en environnement stérile avec des pinces passées au stérilisateur à chaleur sèche sont déposées dans une plaque 24-puits. Après 15 minutes de lampe UV pour stériliser la surface, 10 μ L de Poly-L-Lysine à 0.1% vol./vol. (donc 0.1 μ g/mL) sont déposés sur la membrane pendant 2h sous la hotte à température ambiante, afin de faciliter l'adhérence des cellules. La membrane est rincée 3 fois à l'eau ultrapure par immersions successives dans une plaque 96-puits puis séchée à température ambiante pendant la nuit.

Les cellules F98 sont cultivées en flasques T25 puis incubées pendant 24h avec les NPFe. Les flasques sont rincées au PBS puis les cellules sont détachées avec de la trypsine. Dans une plaque 24-puits, chaque membrane estensemencée avec 3000 cellules/membrane dans 10 μ l de milieu de culture, placée 15 minutes à l'incubateur, après lesquels chaque puits est complété avec 1,5 mL de milieu et mis à l'incubateur pour 24h. Les membranes sont ensuite rincées 3 fois au PBS par bains successifs dans les puits d'une plaque 96-puits, avant d'être plongées dans du PFA à 4% pendant 20 minutes dans l'incubateur. Elles sont ensuite lavées 3 fois à l'eau ultrapure, puis séchées à l'air, sous une PSM.

CONCLUSION GENERALE

VI- *Conclusion générale*

Afin d'augmenter l'efficacité des traitements de radiothérapie nous nous sommes penchés sur l'utilisation de nanoparticules de fer combinées à une irradiation de photons de basse énergie. Deux types d'interactions produisent des électrons capables de déposer leur énergie préférentiellement à proximité de leur point source, dans notre cas, la tumeur chargée en nanoparticules de fer. L'effet Mössbauer, qui nécessite une énergie très précise, dirigée sur des atomes ne pouvant pas subir de recul, et l'effet photoélectrique, déjà amplement décrit pour potentialiser la radiothérapie de basse énergie.

L'environnement scientifique de Grenoble, combinant l'ESRF qui offre une source monochromatique de rayons X, et le CEA possédant des sources d'irradiation Gamma propices aux études cellulaires et aux expériences Mössbauer, offre une opportunité unique d'exploration du potentiel des nanoparticules de Fer, plus précisément de magnétite (Fe_3O_4). Des NPFe nous ont été envoyées gracieusement par l'équipe sud-coréenne du Professeur Jong-Ki Kim ainsi que par Cécile Sicard-Roselli et Stéphane Roux. Les NPFe se sont révélées très efficaces pour pénétrer dans les cellules F98, se concentrer dans le cytoplasme et se localiser autour du noyau, sans provoquer de réaction cytotoxique.

Concentrer ces NPFe dans un gel d'agarose et mesurer sa diffusion nucléaire inélastique à température ambiante a permis de confirmer la possibilité d'interactions Mössbauer dans les NPFe dans un milieu semi-rigide proche des tissus. L'expérience préliminaire d'irradiation avec une source Mössbauer de cellules ayant internalisé des NPFe n'a pas montré l'efficacité attendue, mais de nombreux éléments clés ont pu être identifiés. Améliorer le système d'irradiation en recréant sur place les conditions de l'incubateur pourrait contribuer à la réussite des essais *in vitro*. L'acquisition d'un spectre des NPFe en milieu aqueux à l'intérieur des cellules serait idéale pour déterminer l'énergie

optimale d'irradiation afin de s'assurer de maximiser les interactions MB, mais il est presque impossible d'obtenir les spectres MB de nanoparticules dans des cellules en culture.

D'autre part, l'effet MB nécessite une bande d'énergie très étroite qui s'obtient au détriment du flux de photons. Toute solution pour augmenter ce flux, avec une source plus intense ou plus proche des cellules pourrait ouvrir des possibilités plus prometteuses. Il pourrait être envisagé d'utiliser un système MB à vitesse constante pour irradier des cellules chargées en nanoparticules de Fe enrichies en ^{57}Fe et vérifier *in vitro* l'efficacité MB, même si cela nécessite un long voyage, en Russie par exemple. Cela souligne encore une fois la difficulté expérimentale d'adapter des méthodes de physique à des échantillons biologiques. Une solution du type curiethérapie MB, utilisant des nanoparticules combinant source MB et absorbeur en ^{57}Fe pourrait théoriquement convenir pour augmenter drastiquement le nombre d'interactions MB au sein de cellules tumorales (Enger et al. 2012). D'autres études seront nécessaires pour confirmer ou discréditer totalement la thérapie Mössbauer.

Les études sur l'effet photoélectrique ont rencontré plus de succès et confirmé les résultats d'autres équipes. Ces NPFe peuvent entraîner une différence importante lors d'une radiothérapie en multipliant les électrons émis dans les cellules tumorales.

La transposition de *in vitro* vers *in vivo* demande encore des étapes supplémentaires (biodistribution, protocole d'injection, tumeur adaptée, toxicité).

La mesure de dose en présence de nanoparticules n'est pas un problème simple et les travaux présentés permettent d'envisager ses différents aspects, de la réactivité chimique des NPFe à leur perturbation des systèmes d'analyse. Résoudre chacun d'entre eux demandera d'autres travaux.

Pour conclure, ces travaux ont montré l'intérêt des nanoparticules de fer pour la radiothérapie, grâce à leur distribution intra-cellulaire et leur radiosensibilisation, ainsi que les limites de l'effet Mössbauer et les difficultés de mesure de dose *in situ*.

VII- *Table des illustrations*

| | |
|---|----|
| <i>Figure I-1 : Principe de l'absorption résonante. L'énergie E_0 émise par un atome peut exciter l'atome voisin si l'énergie de recul E_R est suffisamment faible et si l'énergie d'excitation est très proche de l'énergie d'émission.</i> | 16 |
| <i>Figure I-2 : Détail de l'interaction photoélectrique (A) et Mössbauer (B) sur un atome de ^{57}Fe. Le photon incident excite le cortège électronique (A) ou le noyau (B), et provoque l'émission d'un photo-électron (A) ou d'un électron de conversion (B). La vacance électronique cause ensuite une cascade d'électrons Auger ainsi que l'émission de photons de fluorescence.</i> | 18 |
| <i>Figure I-3 : Comparaison de la fluence d'un générateur de rayons X médical conventionnel et de la ligne ID17 de l'ESRF. La fluence très importante permet de sélectionner un rayonnement monochromatique (i.e. 50 keV) tout en conservant un flux de photons important, typiquement de l'ordre de 10^{11} photons/sec.</i> | 21 |
| <i>Figure I-4 : Les électrons sont créés dans le Linac et accélérés à 200 MeV puis accélérés graduellement jusqu'à 6 GeV dans le Booster synchrotron, et enfin injectés dans l'anneau de stockage de 844m de circonférence. À chaque déviation par des aimants de courbure ou par des wiglers, des rayons X sont émis tangentiellement à la trajectoire et sont guidés dans la ligne de lumière correspondante.</i> | 22 |
| <i>Figure I-5 : L'alternance des aimants permet de créer des rayons X dans une section droite de l'anneau de stockage et d'augmenter la création de rayons X.</i> | 22 |
| <i>Figure I-6 : Les cabines successives forment une ligne de lumière et permettent de réaliser une expérience avec les rayons X de la source synchrotron, depuis la calibration du faisceau jusqu'à l'analyse des données obtenues sur l'échantillon.</i> | 23 |
| <i>Figure I-7 : Disposition de la ligne médicale ID17. La cabine expérimentale se trouve en dehors de l'anneau central, dans un bâtiment satellite.</i> | 24 |
| <i>Figure I-8 : Set-up expérimental de radiothérapie clinique et d'imagerie médicale sur ID17. Le faisceau blanc tape sur un cristal monochromateur qui sélectionne une énergie précise ($\Delta E/E = 10^{-3}$). Le patient est positionné sur une chaise motorisée afin d'assurer les rotations et translations nécessaires au traitement.</i> | 24 |
| <i>Figure I-9 : Dispositif d'irradiation d'ARC-Nucléart. Position 1 : Hors utilisation. Les sources sont stockées au fond de la piscine. Position 2 : En utilisation. Les sources sont introduites dans la cellule d'irradiation via les rails de transfert. La gamme de débit de dose dans cette configuration est d'environ 100 Gy/h à 2 kGy/h.</i> | 26 |

| | |
|--|----|
| <i>Figure I-10 : Décroissance radioactive de la source de ^{60}Co du dispositif "Anémone" au CEA. 3 positions permettent de varier le débit de dose d'un facteur 20.</i> | 27 |
| <i>Figure II-1 : Effet Compton.</i> | 30 |
| <i>Figure II-2 : Effet de production de paires.</i> | 31 |
| <i>Figure II-3 : Zones de prédominance des interactions en fonction de l'énergie des photons et du numéro atomique de l'élément. Les lignes d'isoprobabilités d'apparition des effets sont représentées. Figure adaptée de (Abdel-Rahman and Podgorsak 2010).</i> | 32 |
| <i>Figure II-4 : Rendement en profondeur dans un cerveau obtenu pour une irradiation à 60 keV contenant une tumeur perfusée avec 4 mg/ml et comparaison avec le rendement en profondeur obtenu à 1,25 MeV, d'après Mello et al. (Santos Mello et al. 1983)</i> | 34 |
| <i>Figure II-5 : Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie de souris porteuses d'une tumeur sous-cutanée et traitées par une injection i.v. de NPs, suivie d'une radiothérapie Externe. Hainfeld 2004, cell. EMT-6, RT : RX 250 kVp, 26 Gy, AuNPs 1.9 nm. (Hainfeld, Slatkin, and Smilowitz 2004)</i> | 36 |
| <i>Figure II-6 : Courbe de Kaplan-Meier de souris. Tumeur sous-cutanée CT26, injection i.v. de NPFe et protonthérapie à 40 MeV. (Kim et al. 2012)</i> | 37 |
| <i>Figure II-7 : Les paramètres principaux des interactions hyperfines, Le déplacement isomérique δ et l'interaction dipolaire Δ, sont directement visibles sur le spectre MB. ("Nomenclature and Conventions for Reporting Mossbauer Spectroscopic Data" 1976)</i> | 40 |
| <i>Figure II-8 : La présence d'un champ magnétique peut induire une séparation des niveaux d'énergie, et donc l'apparition de raies supplémentaires. (Spectre obtenu durant cette thèse)</i> | 40 |
| <i>Figure II-9 : Dépendance entre l'énergie de l'électron émis E_1 et l'épaisseur de l'absorbeur (Bonchev, Jordanov, and Minkova 1969).</i> | 42 |
| <i>Figure II-10 : Probabilité d'émergence $T K(x)$ à la surface d'un électron de conversion K du fer en fonction de la profondeur x de son origine (Liljequist, Ekdahl, and Bäverstam 1978). Après 170 nm plus aucun électron émis au cœur du matériau n'est transmis à l'extérieur.</i> | 42 |
| <i>Figure II-11 : Exemples de modes de remplissage des paquets d'électrons dans l'anneau de stockage de l'ESRF, parmi les modes disponibles : 4 ou 16-bunch filling mode ; Uniform filling mode (992 paquets uniformément répartis) ; $2 \times 1/3$ filling mode ; Hybrid mode $24 \times 8 + 1$ filling mode ; $7/8 + 1$ filling mode ; 4×10 filling mode. (Thèse T. Roth).</i> | |
| <i>Figure II-12 : Exemples de modes de remplissage des paquets d'électrons dans l'anneau de</i> | |

Table des illustrations

| | |
|---|----|
| <i>stockage de l'ESRF, parmi les modes disponibles : 4 ou 16-bunch filling mode ; Uniform filling mode (992 paquets uniformément répartis) ; 2*1/3 filling mode ; Hybrid mode 24*8 + 1 filling mode ; 7/8 + 1 filling mode ; 4*10 filling mode. (Thèse T. Roth).</i> | 43 |
| <i>Figure II-13 : Montage expérimental d'une expérience de diffusion nucléaire inélastique (NIS). Le détecteur #1 récupère les photons de fluorescence émis par l'échantillon. Le détecteur #2 permet de récupérer la fonction instrumentale, la distribution en énergie du faisceau incident. Figure issue de (A. I. Chumakov and Sturhahn 1999).</i> | 47 |
| <i>Figure II-14 : (Gauche) Données brutes de NIS pour différentes températures (points) et après soustraction du pic central (ligne). (Droite) Densité d'état des phonons extraite des données brutes. Issu de (Handke et al. 2005).</i> | 48 |
| <i>Figure II-15 : Comparaison des données de densité d'état des phonons dans l'α-iron, obtenus par NIS [T.S. Toellner et al., Argonne National Laboratory (1997) non publié] (cercles) et par diffusion inélastique des neutrons [(Schober and Dederichs 1981)] p. 56] (ligne). Les données issues des neutrons ont été convoluées avec une fonction instrumentale Gaussienne de 0.66 meV de largeur.</i> | 49 |
| Figure II-16 : <i>Bléomycine. Très grande molécule (1,5 kDa), cet intercalant de l'ADN peut catalyser la formation de Cassures Double Brin et Simple Brin en présence d'un métal de transition (Fe(II) ou Cu(I)), de l'oxygène et d'un réducteur à un électron.</i> | 50 |
| Figure II-17 : <i>Hématine, candidat pour la thérapie Mössbauer.</i> | 52 |
| Figure II-18 : <i>Complexe alternatif de liaison ^{57}Fe-ADN (MacDonnell 1995).</i> | 52 |
| Figure II-19 : <i>Ferritine, molécule présente dans l'organisme servant à stocker et transporter le fer, en moyenne 450 atomes de fer sont stockés dans cette structure circulaire, soit 10% de sa capacité totale (Hempstead et al. 1997).</i> | 54 |
| <i>Figure II-20 : Modèle du complexe Fer-Bléomycine-ADN utilisé par Terrissol pour simuler l'effet sur l'ADN d'une thérapie Mössbauer postulée par Mills. Les molécules d'eau formant la couche d'hydratation autour de l'ADN et de la Bléomycine sont prises en compte dans la modélisation.</i> | 55 |
| <i>Figure II-21 : Spectre en énergie des électrons Auger émis par désexcitation du ^{57}Fe.</i> | 56 |
| <i>Figure II-22 : Résumé des probabilités de cassure simple brin et double brin après désexcitation Mössbauer du ^{57}Fe à proximité de l'ADN.</i> | 56 |

| | |
|--|----|
| <i>Figure II-23 : Nombre de publications concernant les nanoparticules de fer sur la période 1986-2014 d'après PubMed.</i> | 60 |
| <i>Figure II-24 : Des nanoparticules injectées dans le sang peuvent naturellement traverser la Barrière Hémato-Encéphalique poreuse au niveau de la tumeur et s'y accumuler. Schéma illustratif.</i> | 62 |
| <i>Figure II-25 : Facteurs d'augmentation de dose en présence de 10 mg/ml d'iode dans un dosimètre nPAG à différentes énergies. Comparaison du DEF théorique avec les données expérimentales. Issu de (Gastaldo et al. 2008).</i> | 68 |
| <i>Figure II-26 : Acide téréphtalique, $C_8H_6O_4$, aussi appelé acide paraphtalique, il entre dans la composition du PET.</i> | 70 |
| <i>Figure II-27 : Acide benzoïque, de formule $C_7H_6O_2$.</i> | 70 |
| <i>Figure II-28 : Rhodamine B, de formule $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$. Composé fluorescent émettant à 610 nm.</i> | 71 |
| <i>Figure II-29 : Principe de fonctionnement du dosimètre à base de coumarine. A) Molécule de coumarine, $C_9H_6O_2$. B) Cette modification de la molécule n'est pas fluorescente et peut être oxydée par les OH^\bullet produits lors d'une irradiation. C) L'ombelliférone (7-hydroxy coumarine) se forme par hydroxylation en présence de OH^\bullet. Elle est fluorescente.</i> | 71 |
| <i>Figure II-30 : Principe de fonctionnement du dosimètre à base de dAdO. Réaction d'oxydation de la dAdO en présence d'OH^\bullet.</i> | 73 |
| <i>Figure II-31 : Détection de 8-oxodAdo par HPLC-MS/MS après irradiation de dAdO à 10^{-4} M avec différents doses de rayonnement (Thèse Florence Taupin).</i> | 74 |
| <i>Figure II-32 : Mesurée par HPLC-MS/MS, la pente de formation de 8oxo-dAdO varie en fonction de la concentration de sels de Gadolinium et de l'énergie d'irradiation, en-dessous (-) et au-dessus (+) du K-Edge du Gadolinium. (Thèse Florence Taupin).</i> | 74 |
| Figure III-1 : Appareil de DLS Zetasizer Nano-ZS de Malvern au CEA. | 80 |
| <i>Figure III-2 : La fonction d'auto-corrélation issue de la mesure de DLS permet de déterminer par modèle mathématique la répartition granulométrique de l'échantillon. (Zetasizer Nano-ZS, CEA)</i> | 81 |
| <i>Figure III-3 : Le Fluodrop permet de mesurer rapidement la fluorescence de petits volumes. A gauche, le dépôt de l'échantillon est extrêmement simple. A droite, le volume complet de l'échantillon est mesuré instantanément.</i> | 85 |

Table des illustrations

| | |
|---|----|
| <i>Figure III-4 : Lecture au Fluodrop de solutions de 3CC (10⁻⁴ M). Irradiation gamma à 1,25 MeV. Débit de dose : 2,25 Gy/min. Mesure juste après irradiation (en bleu) et après 24h (en rouge).</i> | 85 |
| <i>Figure III-5 : Irradiation de 3CC (10⁻⁴ mM) avec un faisceau monochromatique de photons à 80 keV sur ID17. Lecture en triplicat au Fluodrop, 24h après irradiation. On observe une forte valeur basale dont on n'a pas l'explication, qui écrase la dynamique observée dans la Figure III-4.</i> | 86 |
| <i>Figure III-6 : Mesure au HPLC-Fluo de la fluorescence émise 24h après irradiation par le 7OHC après purification.</i> | 87 |
| <i>Figure III-7 : Sensibilité de la mesure au HPLC. La grande différence entre 1 Gy et 0 Gy démontre la sensibilité de la technique.</i> | 88 |
| <i>Figure III-8 : Irradiation de 3CCO (10⁻⁴ mM) avec un faisceau monochromatique de photons à 80 keV sur ID17. Lecture en triplicat de la 7OHC au HPLC-Fluo, 48h après irradiation.</i> | 89 |
| <i>Figure III-9 : Pentas de formation de 7OHC en fonction de l'énergie d'irradiation, mesurée au HPLC-Fluo. Erreur fixée à 5%</i> | 90 |
| <i>Figure III-10 : Evolution du signal de fluorescence mesuré par Fluodrop, après introduction de deux concentrations de NPF_e. En rouge : 2 mg/mL, en bleu : 1 mg/mL.</i> | 91 |
| <i>Figure III-11 : Fluorescence de la coumarine après irradiation en présence de nanoparticules. Mesure au HPLC-Fluo.</i> | 92 |
| <i>Figure III-12 : Mesure au HPLC-Fluo de la formation de 7OHC sous irradiation en présence de 10⁻⁴ M de 3CC, de NPF_e et de NaCl 4 M. Même en absence de NPF_e la mesure est détruite. La présence de NaCl empêche d'observer la formation de 7OHC en présence de OH°.</i> | 93 |
| <i>Figure III-13 : Concentration en 7OHC en fonction de la dose après irradiation à 20 keV à 2 Gy·s⁻¹. Issu de (Sicard-Roselli et al. 2014).</i> | 93 |
| <i>Figure III-14 : Spectre d'absorption d'une solution aqueuse saturée en Argon de 5·10⁻⁵ M RNO en présence de tert-butanol, 10⁻² M, irradié avec des rayons Gamma. Débit de Dose : 6 Gy·min⁻¹, chemin optique : 1 cm. Les spectres de fluorescence normalisés de RNO et RN sont donnés en bas à droite pour information (Balcerzyk and Baldacchino 2014).</i> | 95 |
| <i>Figure III-15 : Spectres de Fluorescence d'une solution de RNO (5x10⁻⁴ M) en fonction de la dose reçue à 80 keV. La solution de résazurine (RNO) contient initialement une impureté de résorufin (RN). (Baldacchino et al., non publié)</i> | 96 |

| | |
|--|-----|
| <i>Figure III-16 : Maximum de fluorescence de RN formé sous irradiation monochromatique à 80 keV en fonction de la dose. Solution initiale de RNO de concentration 5×10^{-4} M. (Baldacchino et al., non publié)</i> | 97 |
| <i>Figure III-17 : Effet du Débit de dose sur la formation de resorufin (RNO) irradiée par rayons X en fonction de la dose absorbée. Concentration de resazurin (RNO) : $5 \cdot 10^{-4}$ M, Energie : 80 keV. (Baldacchino et al, non publié)</i> | 98 |
| <i>Figure III-18 : Composition du film EBT3. Une couche centrale sensible est entourée de deux couches symétriques en polyester de 125 μm. La différence de coloration la plus forte après irradiation se trouve à 636 nm.</i> | 99 |
| <i>Figure III-19 : Irradiation Gamma à 1,25 MeV de films EBT3.</i> | 100 |
| <i>Figure III-20 : Irradiation à plusieurs énergies de films EBT3. La réponse générale du film est remarquablement similaire pour une gamme d'énergie très étendue.</i> | 101 |
| <i>Figure IV-1 : Microscopie optique de cellules J774A.1. Images issues de ATTC.</i> | 108 |
| <i>Figure IV-2 : Imagerie de Cellules F98 : (A) : Microscopie optique en culture (x400). Échelle : 63 μm (B) : Microscopie électronique à balayage (x800) effectuée par Florence Taupin. Échelle: 20 μm.</i> | 108 |
| Figure IV-3 : Test de cytotoxicité MTT des NPFe en triplicat, démontrant l'absence d'effet pour des concentrations jusqu'à 1 mg/mL. | 110 |
| Figure IV-4 : Test de cytotoxicité LDH des NPFe en triplicat, démontrant l'absence d'effet pour des concentrations jusqu'à 1 mg/mL et un temps d'incubation de 24h. | 111 |
| <i>Figure IV-5 : Internalisation de NPFe pendant 24h par des cellules F98, mesuré par ICP-MS au CHU.</i> | 113 |
| <i>Figure IV-6 : Internalisation de NPFe pendant 24h par des cellules F98 et des macrophages J774A.1, mesuré par ICP-MS au CHU.</i> | 114 |
| <i>Figure IV-7 : Microscopie optique en incubateur de cellules F98 prise à l'IBS. Les cellules F98 adhérentes se multiplient jusqu'à atteindre la confluence. Quelques-unes flottent dans le milieu, restent rondes et ne s'étendent pas sur la surface.</i> | 116 |
| <i>Figure IV-8 : Observation au microscope de l'internalisation de NPFe par des F98 pendant 11 heures. Les cellules continuent à se multiplier jusqu'à atteindre la confluence. Leur aspect général n'est pas modifié, ce qui montre que l'adhérence et le métabolisme des cellules ne semblent pas significativement perturbés.</i> | 116 |
| <i>Figure IV-9 : Set-up expérimental sur ID16B. Pour la technique de microfluorescence (XRF), l'échantillon est déplacé horizontalement et verticalement durant le scan. Les détecteurs acquièrent un spectre pour chaque</i> | |

Table des illustrations

| | |
|---|-----|
| <i>pixel. L'analyse de données permet de recomposer l'image de l'échantillon en 2D en séparant les contributions des différents éléments.</i> | 118 |
| <i>Figure IV-10 : Cabine expérimentale de ID16B. Les instruments de mesure, à gauche sont placés sur une dalle de marbre et reliés au faisceau par une pièce flexible.</i> | 119 |
| <i>Figure IV-11 : Montage des membranes Si₃N₄ sur la ligne ID16B : La membrane séchée verticalement dans la plaque 96-puits (A) est déposée sur un support plastique (B) puis monté sur le porte-échantillon (C). Le tout est placé sur la ligne ID16B (D).</i> | 120 |
| <i>Figure IV-12 : Microscopie de fluorescence X de 3 cellules F98 incubées pendant 24h avec des NPFe à 0,06 mg/mL. Fer coloré en rouge et Soufre en vert. Taille de pixel : 90 nm x 90 nm. Images acquises sur ID16B.</i> | 121 |
| <i>Figure IV-13 : Imagerie de 5 cellules F98 incubées pendant 24h avec des NPFe à 0,3 mg/mL :</i> | 121 |
| <i>Figure IV-14 : Imagerie de 4 cellules F98 témoin, sans NPFe : (A) Microscopie de fluorescence X. Fer coloré en rouge et Soufre en vert. (B) Microscopie optique. Taille de pixel : 100 nm x 100 nm Images acquises sur ID16B.</i> | 122 |
| <i>Figure IV-15 : Images XRF acquises sur ID16B du fer, calcium et zinc d'une cellule F98 pour 4 incidences (0, 45, 90 et 180°). Le contraste est adapté pour plus de visibilité.</i> | 124 |
| <i>Figure IV-16 : Etude par microscopie optique de la distribution cellulaire de NPFe dans des cellules de gliome C6 (A) et des cellules de cancer du colon CT26 (B). Les NPFe sont distribuées autour du noyau pour les deux lignées cellulaires. (Choi et al. 2012)</i> | 127 |
| <i>Figure IV-17 : Compteur automatique de colonies pour les tests de clonogénicité. A. Imprimante à étiquettes B. Appareil photo C. support de boîtes de Pétri et lecteur de code-barres.</i> | 131 |
| <i>Figure IV-18 : SER_{4Gy} mesuré par test clonogénique, pour 3 énergies et 2 concentrations de NPFe (0.06 mg/mL (en rouge) et 0.3 mg/mL (en bleu)).</i> | 133 |
| <i>Figure IV-19 : SER 4 Gy mesuré par test ATPLite, pour 3 énergies et 2 concentrations de NPFe (0.06 mg/mL (en rouge) et 0.3 mg/mL (en bleu). Les résultats obtenus par ATPLite sont similaires au test de clonogénicité.</i> | 134 |
| <i>Figure IV-20 : DEF théoriques pour une concentration de Fer, Iode, Gadolinium ou Or de 10 mg/ml</i> | 135 |
| <i>Figure IV-21 : DEF théorique du Fer pour une concentration de 40 mg/ml, compatible avec facteur d'augmentation de dose de 3.</i> | 136 |
| <i>Figure IV-22 : Libres parcours moyen des électrons dans l'eau. (NIST ESAR)</i> | 138 |
| <i>Figure IV-23 : Spectre Mössbauer à 300K de 50mg de nanoparticules de magnétite acquis au CEA Grenoble.</i> | 141 |

- Figure IV-24 : Spectre Mössbauer à 80K de nanoparticules de magnétite acquis au CEA Grenoble. _____ 143
- Figure IV-25 : Expérience de NIS sur ID18. 200mg/ml de NPFe dans de l'agarose à 4% sont irradiés afin de déterminer si l'effet Mössbauer a lieu dans des NPFe à température ambiante dans un milieu semi-rigide. Le détecteur de fluorescence placé sous le capillaire permet de récolter les rayons x de fluorescence K_{α} à 6.4 keV provenant de la conversion interne au sein des noyaux de fer, donc apparaissant avec un délai par rapport à la fluorescence due à l'effet photoélectrique. _____ 145
- Figure IV-26 : NIS à température ambiante de NPFe dans de l'agarose à 4%. _____ 145
- Figure IV-27 : Comparaison de DOS de NPFe + Agarose 4% à température ambiante (gauche) et de DOS de magnétite à différentes température (droite). Chaque courbe est normalisée avec le pic à 17 meV. _____ 147
- Figure IV-28 : SER_{4Gy} et Toxicité de trois lots de NPFe irradiés par une source Mössbauer à température ambiante. Le lot Roux57 est constitué de nanoparticules de magnétite enrichie en ^{57}Fe dans une proportion de 2/3. _____ 150

VIII- *Références Bibliographiques*

- Adam, Jean François, Hélène Elleaume, Aurélie Joubert, Marie Claude Biston, Anne Marie Charvet, Jacques Balosso, Jean François Le Bas, and François Estève. 2003. "Synchrotron Radiation Therapy of Malignant Brain Glioma Loaded with an Iodinated Contrast Agent: First Trial on Rats Bearing F98 Gliomas." *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 57 (5): 1413–26.
- Adam, Jean-François, Aurélie Joubert, Marie-Claude Biston, Anne-Marie Charvet, Michel Peoc'h, Jean-François Le Bas, Jacques Balosso, François Estève, and Hélène Elleaume. 2006. "Prolonged Survival of Fischer Rats Bearing F98 Glioma after Iodine-Enhanced Synchrotron Stereotactic Radiotherapy." *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 64 (2): 603–11. doi:10.1016/j.ijrobp.2005.09.004.
- Adams, F. H., A. Norman, R. S. Mello, and D. Bass. 1977. "Effect of Radiation and Contrast Media on Chromosomes. Preliminary Report." *Radiology* 124 (3): 823–26. doi:10.1148/124.3.823.
- Adams, Forrest H., Amos Norman, Doris Bass, and George Oku. 1978. "Chromosome Damage in Infants and Children After Cardiac Catheterization and Angiocardigraphy." *Pediatrics* 62 (3): 312–16.
- Araújo, Rui, Ana C. Meira Castro, and António Fiúza. 2015. "The Use of Nanoparticles in Soil and Water Remediation Processes." *Materials Today: Proceedings*, ANM2014: 5th International conference on Advanced Nanomaterials, 2 (1): 315–20. doi:10.1016/j.matpr.2015.04.055.
- Armstrong, W. A., R. A. Facey, D. W. Grant, and W. G. Humphreys. 1963. "A Tissue-Equivalent Chemical Dosimeter Sensitive to 1 Rad." *Canadian Journal of Chemistry* 41 (6): 1575–77. doi:10.1139/v63-215.
- Armstrong, William A., Barbara A. Black, and Douglas W. Grant. 1960. "THE RADIOLYSIS OF AQUEOUS CALCIUM BENZOATE AND BENZOIC ACID SOLUTIONS1." *The Journal of Physical Chemistry* 64 (10): 1415–19. doi:10.1021/j100839a013.
- Aruoma, O. I. 1994. "DEOXYRIBOSE ASSAY FOR DETECTING HYDROXYL RADICALS." *Methods in Enzymology* 233: 57–66.
- Ashawa, S. C., U. R. Kini, and U. Madhvanath. 1979. "The Aqueous Coumarin System as a Low Range Chemical Dosimeter." *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes* 30 (1): 7–10. doi:10.1016/0020-708X(79)90089-9.
- Balcerzyk, A., and G. Baldacchino. 2014. "Implementation of Laser Induced Fluorescence in a Pulse Radiolysis Experiment--a New Way to Analyze Resazurin-like Reduction Mechanisms." *The Analyst* 139 (7): 1707–12. doi:10.1039/c3an02000b.
- Bansal, Anil K., Manoj K. Semwal, Deepak Arora, D.N. Sharma, P.K. Julka, and G.K. Rath. 2013. "A Phantom Study on Bladder and Rectum Dose Measurements in Brachytherapy of Cervix Cancer Using FBX Aqueous Chemical Dosimeter." *Physica Medica* 29 (4): 368–73. doi:10.1016/j.ejmp.2012.05.005.
- Barbieri, A., B. F. Matzanke, S. Gießelmann, W. Jelkmann, V. Schünemann, and A. X. Trautwein. 1998. "In the Quest of the Mirage Effect: The Interaction of Fe(III) with DNA and the Role of Ferritin." *Hyperfine Interactions* 112 (1-4): 129–32. doi:10.1023/A:1011005214862.
- Barth, Rolf F., and Balveen Kaur. 2009. "Rat Brain Tumor Models in Experimental Neuro-Oncology: The C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 Gliomas." *Journal of Neuro-Oncology* 94 (3): 299–312. doi:10.1007/s11060-009-9875-7.
- Battle, Xavier, and Amílcar Labarta. 2002. "Finite-Size Effects in Fine Particles: Magnetic and Transport Properties." *Journal of Physics D: Applied Physics* 35 (6): R15. doi:10.1088/0022-3727/35/6/201.
- Bauminger, E. R., S. G. Cohen, E. Giberman, I. Nowik, S. Ofer, J. Yariv, M. M. Werber, and M. Mevarech. 1976. "IRON IN THE WHOLE BACTERIAL CELL. EXPLORATORY INVESTIGATIONS." *Le Journal de Physique Colloques* 37 (C6): C6–227 – C6–232. doi:10.1051/jphyscol:1976647.
- Bertrand, Bernard, François Estève, Hélène Elleaume, Christian Nemoz, Stefan Fiedler, Alberto Bravin, Gilles Berruyer, et al. 2005. "Comparison of Synchrotron Radiation Angiography with

- Conventional Angiography for the Diagnosis of in-Stent Restenosis after Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty.” *European Heart Journal* 26 (13): 1284–91. doi:10.1093/eurheartj/ehi165.
- Beshir, W. B., S. Eid, S. M. Gafar, and S. Ebraheem. 2014. “Application of Solutions of Rhodamine B in Dosimetry.” *Applied Radiation and Isotopes: Including Data, Instrumentation and Methods for Use in Agriculture, Industry and Medicine* 89 (July): 13–17. doi:10.1016/j.apradiso.2013.11.030.
- Biston, Marie-Claude, Aurélie Joubert, Jean-François Adam, Hélène Elleaume, Sylvain Bohic, Anne-Marie Charvet, François Estève, Nicolas Foray, and Jacques Balosso. 2004. “Cure of Fisher Rats Bearing Radioresistant F98 Glioma Treated with Cis-Platinum and Irradiated with Monochromatic Synchrotron X-Rays.” *Cancer Research* 64 (7): 2317–23.
- Bonchev, ZW., A. Jordanov, and A. Minkova. 1969. “Method of Analysis of Thin Surface Layers by the Mössbauer Effect.” *Nuclear Instruments and Methods* 70 (1): 36–40. doi:10.1016/0029-554X(69)90176-1.
- Boudou, Caroline. 2006. “Dosimétrie Pour La Radiothérapie Stéréotaxique En Rayonnement Synchrotron: Calculs Monte-Carlo et Gels Radiosensibles.” PhD thesis, UJF. <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-00119516/document>.
- Boudou, Caroline, Jacques Balosso, François Estève, and Hélène Elleaume. 2005. “Monte Carlo Dosimetry for Synchrotron Stereotactic Radiotherapy of Brain Tumours.” *Physics in Medicine and Biology* 50 (20): 4841–51. doi:10.1088/0031-9155/50/20/007.
- Brenner, D. J., C. R. Geard, and E. J. Hall. 1989. “Mössbauer Cancer Therapy Doubts.” *Nature* 339 (6221): 185–86. doi:10.1038/339185b0.
- Brockhouse, B. N., and A. T. Stewart. 1955. “Scattering of Neutrons by Phonons in an Aluminum Single Crystal.” *Physical Review* 100 (2): 756–57. doi:10.1103/PhysRev.100.756.
- Bunbury, D.St.P., J.A. Elliott, H.E. Hall, and J.M. Williams. 1963. “Study of Diffusion in Glycerol by the Mössbauer Effect of Fe57.” *Physics Letters* 6 (1): 34–36. doi:10.1016/0031-9163(63)90210-5.
- Buzea, Cristina, Ivan I. Pacheco, and Kevin Robbie. 2007. “Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity.” *Biointerphases* 2 (4): MR17–71. doi:10.1116/1.2815690.
- Callisen, H. H., A. Norman, and F. H. Adams. 1979. “Absorbed Dose in the Presence of Contrast Agents during Pediatric Cardiac Catheterization.” *Medical Physics* 6 (6): 504–9.
- Canton, Irene, and Giuseppe Battaglia. 2012. “Endocytosis at the Nanoscale.” *Chemical Society Reviews* 41 (7): 2718–39. doi:10.1039/c2cs15309b.
- Carter, Joshua D., Neal N. Cheng, Yongquan Qu, George D. Suarez, and Ting Guo. 2007. “Nanoscale Energy Deposition by X-Ray Absorbing Nanostructures.” *The Journal of Physical Chemistry B* 111 (40): 11622–25. doi:10.1021/jp075253u.
- Chakrabarti, S., A. I. Kassis, H. S. Slayter, E. A. Bump, S. K. Sahu, and G. M. Makrigiorgos. 1998. “Continuous Detection of Radiation or Metal Generated Hydroxyl Radicals within Core Chromatin Particles.” *International Journal of Radiation Biology* 73 (1): 53–63.
- Chakrabarti, Subrata, G. Mike Makrigiorgos, Kathryn O’Brien, Edward Bump, and Amin I. Kassis. 1996. “Measurement of Hydroxyl Radicals Catalyzed in the Immediate Vicinity of DNA by Metal-Bleomycin Complexes.” *Free Radical Biology and Medicine* 20 (6): 777–83. doi:10.1016/0891-5849(95)02160-4.
- Champeny, D. C., G. R. Isaak, and A. M. Khan. 1963. “Measurement of Relativistic Time Dilatation Using the Mössbauer Effect.” *Nature* 198 (4886): 1186–87. doi:10.1038/1981186b0.
- Choi, Gi-Hwan, Seung-Jun Seo, Ki-Hong Kim, Hong-Tae Kim, Sung-Hwan Park, Jae-Hong Lim, and Jong-Ki Kim. 2012. “Photon Activated Therapy (PAT) Using Monochromatic Synchrotron X-Rays and Iron Oxide Nanoparticles in a Mouse Tumor Model: Feasibility Study of PAT for the Treatment of Superficial Malignancy.” *Radiation Oncology* 7 (1): 184. doi:10.1186/1748-717X-7-184.
- Chumakov, A. I., and W. Sturhahn. 1999. “Experimental Aspects of Inelastic Nuclear Resonance Scattering.” *Hyperfine Interactions* 123-124 (1-4): 781–808. doi:10.1023/A:1017052730094.
- Chumakov, Aleksandr, and Rudolf Rüffer. 1998. “Nuclear Inelastic Scattering.” *Hyperfine Interactions* 113 (1-4): 59–79. doi:10.1023/A:1012659229533.

Références Bibliographiques

- Clémancey, Martin, Geneviève Blondin, Jean-Marc Latour, and Ricardo Garcia-Serres. 2014. "Mössbauer Spectroscopy." *Methods in Molecular Biology -Clifton Then Totowa-* 1122: 153–70. doi:10.1007/978-1-62703-794-5_11.
- Cochran, S. T., A. Khodadoust, and A. Norman. 1980. "Cytogenetic Effects of Contrast Material in Patients Undergoing Excretory Urography." *Radiology* 136 (1): 43–46. doi:10.1148/radiology.136.1.7384520.
- Cochran, S. T., and A. Norman. 1982. "Cytogenetic Effects of Contrast Material: Diatrizoate versus Iothalamate." *Investigative Radiology* 17 (2): 178–82.
- Collins, A. K. 1994. "Coumarin Chemical Dosimeter for Radiation Therapy." *Medical Physics* 21 (11): 1741. doi:10.1118/1.597275.
- Corde, S., A. Joubert, J. F. Adam, A. M. Charvet, J. F. Le Bas, F. Estève, H. Elleaume, and J. Balosso. 2004. "Synchrotron Radiation-Based Experimental Determination of the Optimal Energy for Cell Radiotoxicity Enhancement Following Photoelectric Effect on Stable Iodinated Compounds." *British Journal of Cancer* 91 (3): 544–51. doi:10.1038/sj.bjc.6601951.
- Cortajarena, Aitziber L., Daniel Ortega, Sandra M. Ocampo, Alberto Gonzalez-García, Pierre Couleaud, Rodolfo Miranda, Cristobal Belda-Iniesta, and Angel Ayuso-Sacido. 2014. "Engineering Iron Oxide Nanoparticles for Clinical Settings." *Nanobiomedicine*, 1. doi:10.5772/58841.
- Dawson, P., M. Penhaligon, E. Smith, and J. Saunders. 1988. "Synergistic Cytotoxicity of Iodinated Contrast Agents and X-Radiation." *Investigative Radiology* 23 Suppl 1 (September): S110–13.
- de Jonge, Martin D., Christopher G. Ryan, and Chris J. Jacobsen. 2014. "X-Ray Nanoprobes and Diffraction-Limited Storage Rings: Opportunities and Challenges of Fluorescence Tomography of Biological Specimens." *Journal of Synchrotron Radiation* 21 (5): 1031–47. doi:10.1107/S160057751401621X.
- Dennis, Cindi L., Kathryn L. Krycka, Julie A. Borchers, Ryan D. Desautels, Johan van Lierop, Natalie F. Huls, Andrew J. Jackson, Cordula Gruettner, and Robert Ivkov. 2015. "Internal Magnetic Structure of Nanoparticles Dominates Time-Dependent Relaxation Processes in a Magnetic Field." *Advanced Functional Materials* 25 (27): 4300–4311. doi:10.1002/adfm.201500405.
- Devic, Slobodan, Jan Seuntjens, Edwin Sham, Ervin B. Podgorsak, C. Ross Schmidlein, Assen S. Kirov, and Christopher G. Soares. 2005. "Precise Radiochromic Film Dosimetry Using a Flat-Bed Document Scanner." *Medical Physics* 32 (7): 2245. doi:10.1118/1.1929253.
- Do, Duc, D'Souza, Enriquez, and Rizvi. 2013. "Formulation and Evaluation of Drug-Loaded Targeted Magnetic Microspheres for Cancer Therapy." *International Journal of Nanomedicine*, April, 1393. doi:10.2147/IJN.S43479.
- Edouard, M., D. Broggio, Y. Prezado, F. Estève, H. Elleaume, and J. F. Adam. 2010. "Treatment Plans Optimization for Contrast-Enhanced Synchrotron Stereotactic Radiotherapy." *Medical Physics* 37 (6): 2445–56.
- Enger, Shirin A., Hans Lundqvist, Michel D'Amours, and Luc Beaulieu. 2012. "Exploring ⁵⁷Co as a New Isotope for Brachytherapy Applications." *Medical Physics* 39 (5): 2342. doi:10.1118/1.3700171.
- Fong, P. M., D. C. Keil, M. D. Does, and J. C. Gore. 2001. "Polymer Gels for Magnetic Resonance Imaging of Radiation Dose Distributions at Normal Room Atmosphere." *Physics in Medicine and Biology* 46 (12): 3105–13.
- Fournier, Elvire, Catherine Passirani, Claudia Montero-Menei, Nathalie Colin, Pascal Breton, Serge Sagodira, Philippe Menei, and Jean-Pierre Benoit. 2003. "Therapeutic Effectiveness of Novel 5-fluorouracil-loaded Poly(methylidene Malonate 2.1.2)-based Microspheres on F98 Glioma-bearing Rats." *Cancer* 97 (11): 2822–29. doi:10.1002/cncr.11388.
- Frelon, Sandrine, Thierry Douki, Jean-Luc Ravanat, Jean-Pierre Pouget, Calogero Tornabene, and Jean Cadet. 2000. "High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Measurement of Radiation-Induced Base Damage to Isolated and Cellular DNA." *Chemical Research in Toxicology* 13 (10): 1002–10. doi:10.1021/tx000085h.
- Fricke, Hugo, and Edwin J Hart. 1966. "Chemical Dosimetry." *Radiation Dosimetry* 2: 167–239.

- Fulford, J., H. Nikjoo, D. T. Goodhead, and P. O'Neill. 2001. "Yields of SSB and DSB Induced in DNA by Al K Ultrasoft X-Rays and α -Particles: Comparison of Experimental and Simulated Yields." *International Journal of Radiation Biology* 77 (10): 1053–66. doi:10.1080/09553000110069308.
- Gaci, Mohammed. 2002. *Radiothérapie Interne (électrons Auger) Par Stimulation Gamma Résonante Mössbauer : Chimère Ou Réalité ? : Etudes Physico-Chimiques, Cellulaires et Biomoléculaires*. Poitiers. <http://www.theses.fr/2002POIT2328>.
- Gastaldo, Jerome, Caroline Boudou, Laurent Lamalle, Irene Tropres, stephanie corde, Alberic Sollier, Gunther Rucka, and Helene Elleaume. 2008. "Normoxic Polyacrylamide Gel Doped with Iodine: Response versus X-Ray Energy." *Faculty of Engineering and Information Sciences - Papers*, January. <http://ro.uow.edu.au/eispapers/676>.
- Geppert, Mark, Charlotte Petters, Karsten Thiel, and Ralf Dringen. 2012. "The Presence of Serum Alters the Properties of Iron Oxide Nanoparticles and Lowers Their Accumulation by Cultured Brain Astrocytes." *Journal of Nanoparticle Research* 15 (1): 1–15. doi:10.1007/s11051-012-1349-8.
- Golovko, Daniel M., Tobias Henning, Jan S. Bauer, Marcus Settles, Thomas Frenzel, Artur Mayerhofer, Ernst J. Rummeny, and Heike E. Daldrup-Link. 2010. "Accelerated Stem Cell Labeling with Ferucarbotran and Protamine." *European Radiology* 20 (3): 640–48. doi:10.1007/s00330-009-1585-1.
- Gonser, U., R. W. Grant, and J. Kregzde. 1964. "Mössbauer Effect in Hemoglobin with Different Ligands." *Science* 143 (3607): 680–81. doi:10.1126/science.143.3607.680.
- Gopakumar, K., U. R. Kini, S. C. Ashawa, N. S. Bhandari, G. U. Krishnan, and D. Krishnan. 1977. "Gamma Irradiation of Coumarin in Aqueous Solution." *Radiation Effects* 32 (3-4): 199–203. doi:10.1080/00337577708233075.
- Gore, J. C., Y. S. Kang, and R. J. Schulz. 1984. "Measurement of Radiation Dose Distributions by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Imaging." *Physics in Medicine and Biology* 29 (10): 1189–97.
- Guadagnini, Rina, Blanka Halamoda Kenzaoui, Laura Walker, Giulio Pojana, Zuzana Magdolenova, Dagmar Bilanicova, Margaret Saunders, et al. 2015. "Toxicity Screenings of Nanomaterials: Challenges due to Interference with Assay Processes and Components of Classic in Vitro Tests." *Nanotoxicology* 9 Suppl 1 (May): 13–24. doi:10.3109/17435390.2013.829590.
- Gutteridge, John M.C. 1981. "Thiobarbituric Acid-Reactivity Following Iron-Dependent Free-Radical Damage to Amino Acids and Carbohydrates." *FEBS Letters* 128 (2): 343–46. doi:10.1016/0014-5793(81)80113-5.
- Gu, Yan-Juan, Jinping Cheng, Chun-Chi Lin, Yun Wah Lam, Shuk Han Cheng, and Wing-Tak Wong. 2009. "Nuclear Penetration of Surface Functionalized Gold Nanoparticles." *Toxicology and Applied Pharmacology* 237 (2): 196–204. doi:10.1016/j.taap.2009.03.009.
- Hainfeld, James F., Daniel N. Slatkin, and Henry M. Smilowitz. 2004. "The Use of Gold Nanoparticles to Enhance Radiotherapy in Mice." *Physics in Medicine and Biology* 49 (18): N309–15.
- Hainfeld, James F., Henry M. Smilowitz, Michael J. O'Connor, Farrokh Avraham Dilmanian, and Daniel N. Slatkin. 2013. "Gold Nanoparticle Imaging and Radiotherapy of Brain Tumors in Mice." *Nanomedicine (London, England)* 8 (10): 1601–9. doi:10.2217/nnm.12.165.
- Halliwell, Barry, and John M.C. Gutteridge. 1981. "Formation of a Thiobarbituric-Acid-Reactive Substance from Deoxyribose in the Presence of Iron Salts." *FEBS Letters* 128 (2): 347–52. doi:10.1016/0014-5793(81)80114-7.
- Hanaor, Dorian, Marco Michelazzi, Cristina Leonelli, and Charles C. Sorrell. 2012. "The Effects of Carboxylic Acids on the Aqueous Dispersion and Electrophoretic Deposition of ZrO₂." *Journal of the European Ceramic Society* 32 (1): 235–44. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2011.08.015.
- Handke, B., A. Kozłowski, K. Parliński, J. Przewoźnik, T. Ślęzak, A. I. Chumakov, L. Niesen, Z. Kąkol, and J. Korecki. 2005. "Experimental and Theoretical Studies of Vibrational Density of States in Fe₃O₄ Single-Crystalline Thin Films." *Physical Review B* 71 (14). doi:10.1103/PhysRevB.71.144301.
- Hempstead, Paul D, Stephen J Yewdall, Alisdair R Fernie, David M Lawson, Peter J Artymiuk, David W Rice, Geoffrey C Ford, and Pauline M Harrison. 1997. "Comparison of the Three-Dimensional

- Structures of Recombinant Human H and Horse L Ferritins at High Resolution." *Journal of Molecular Biology* 268 (2): 424–48. doi:10.1006/jmbi.1997.0970.
- Holmes-Hampton, Gregory P., Mrinmoy Chakrabarti, Allison L. Cockrell, Sean P. McCormick, Louise C. Abbott, Lora S. Lindahl, and Paul A. Lindahl. 2012. "Changing Iron Content of the Mouse Brain during Development." *Metallomics: Integrated Biometal Science* 4 (8): 761–70. doi:10.1039/c2mt20086d.
- Humm, J. 1988. "Cancer. Therapy by Photon Activation?" *Nature* 336 (6201): 710–11. doi:10.1038/336710a0.
- Iwamoto, K. S., S. T. Cochran, J. Winter, E. Holburt, R. T. Higashida, and A. Norman. 1987. "Radiation Dose Enhancement Therapy with Iodine in Rabbit VX-2 Brain Tumors." *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 8 (2): 161–70.
- Iwamoto, K. S., A. Norman, D. B. Freshwater, M. Ingram, and R. G. Skillen. 1993. "Diagnosis and Treatment of Spontaneous Canine Brain Tumors with a CT Scanner." *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 26 (1): 76–78.
- Iwamoto, K. S., A. Norman, A. R. Kagan, M. Wollin, A. Olch, J. Bellotti, M. Ingram, and R. G. Skillen. 1990. "The CT Scanner as a Therapy Machine." *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 19 (4): 337–43.
- Kim, Jong-Ki, Seung-Jun Seo, Hong-Tae Kim, Ki-Hong Kim, Myung-Hwan Chung, Kye-Ryung Kim, and Sung-Jun Ye. 2012. "Enhanced Proton Treatment in Mouse Tumors through Proton Irradiated Nanoradiator Effects on Metallic Nanoparticles." *Physics in Medicine and Biology* 57 (24): 8309–23. doi:10.1088/0031-9155/57/24/8309.
- Kleinauskas, Andrius, Jong-Ki Kim, Gi-Hwan Choi, Hong-Tae Kim, Kathrine Røe, and Petras Juzenas. 2012. "Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles for Cancer Theranostics." *Reviews in Nanoscience and Nanotechnology* 1 (4): 271–83. doi:10.1166/rnn.2012.1018.
- Klingelhöfer, G., R. V. Morris, B. Bernhardt, D. Rodionov, P. A. de Souza, S. W. Squyres, J. Foh, et al. 2003. "Athena MIMOS II Mössbauer Spectrometer Investigation." *Journal of Geophysical Research: Planets* 108 (E12): 8067. doi:10.1029/2003JE002138.
- Ko, L., A. Koestner, and W. Wechsler. 1980. "Morphological Characterization of Nitrosourea-Induced Glioma Cell Lines and Clones." *Acta Neuropathologica* 51 (1): 23–31. doi:10.1007/BF00688846.
- Le Gros, M.A., C.G. Knoechel, M. Uchida, D.Y. Parkinson, G. McDermott, and C.A. Larabell. 2012. "2.6 Visualizing Sub-Cellular Organization Using Soft X-Ray Tomography." In *Comprehensive Biophysics*, 90–110. Elsevier. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123749208002125>.
- Leung, Michael K. K., James C. L. Chow, B. Devika Chithrani, Martin J. G. Lee, Barbara Oms, and David A. Jaffray. 2011. "Irradiation of Gold Nanoparticles by X-Rays: Monte Carlo Simulation of Dose Enhancements and the Spatial Properties of the Secondary Electrons Production." *Medical Physics* 38 (2): 624–31.
- Liljequist, D., T. Ekdahl, and U. Bäverstam. 1978. "Analysis of the Electron Transport in Conversion Electron Mössbauer Spectroscopy (CEMS)." *Nuclear Instruments and Methods* 155 (3): 529–38. doi:10.1016/0029-554X(78)90539-6.
- Louit, Guillaume, Sarah Foley, Julie Cabillic, Hervé Coffigny, Frédéric Taran, Alain Valleix, Jean Philippe Renault, and Serge Pin. 2005. "The Reaction of Coumarin with the OH Radical Revisited: Hydroxylation Product Analysis Determined by Fluorescence and Chromatography." *Radiation Physics and Chemistry* 72 (2-3): 119–24. doi:10.1016/j.radphyschem.2004.09.007.
- MacDonnell, Frederick M. 1995. "Reexamining the Mössbauer Effect as a Means to Cleave DNA." *Biochemistry* 34 (39): 12871–76.
- Maeyama, Takuya, Shinichi Yamashita, Gérard Baldacchino, Mitsumasa Taguchi, Atsushi Kimura, Takeshi Murakami, and Yosuke Katsumura. 2011. "Production of a Fluorescence Probe in Ion-Beam Radiolysis of Aqueous Coumarin-3-Carboxylic Acid solution—1: Beam Quality and

- Concentration Dependences." *Radiation Physics and Chemistry* 80 (4): 535–39. doi:10.1016/j.radphyschem.2010.11.013.
- Makrigiorgos, G. M., J. Baranowska-Kortylewicz, E. Bump, S. K. Sahu, R. M. Berman, and A. I. Kassis. 1993. "A Method for Detection of Hydroxyl Radicals in the Vicinity of Biomolecules Using Radiation-Induced Fluorescence of Coumarin." *International Journal of Radiation Biology* 63 (4): 445–58.
- Manevich, Y., K. D. Held, and J. E. Biaglow. 1997. "Coumarin-3-Carboxylic Acid as a Detector for Hydroxyl Radicals Generated Chemically and by Gamma Radiation." *Radiation Research* 148 (6): 580–91.
- Maryanski, M. J., J. C. Gore, R. P. Kennan, and R. J. Schulz. 1993. "NMR Relaxation Enhancement in Gels Polymerized and Cross-Linked by Ionizing Radiation: A New Approach to 3D Dosimetry by MRI." *Magnetic Resonance Imaging* 11 (2): 253–58.
- Matsumura, Y., and H. Maeda. 1986. "A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs." *Cancer Research* 46 (12 Pt 1): 6387–92.
- Matthews, R. W. 1980. "The Radiation Chemistry of the Terephthalate Dosimeter." *Radiation Research* 83 (1): 27–41. doi:10.2307/3575256.
- Mills, R. L., C. W. Walter, L. Venkataraman, K. Pang, and J. J. Farrell. 1988. "A Novel Cancer Therapy Using a Mössbauer-Isotope Compound." *Nature* 336 (6201): 787–89. doi:10.1038/336787a0.
- Mojica Piscioti, M. L., E. Lima, M. Vasquez Mansilla, V. E. Tognoli, H. E. Troiani, A. A. Pasa, T. B. Crezynski-Pasa, et al. 2014. "In Vitro and in Vivo Experiments with Iron Oxide Nanoparticles Functionalized with DEXTRAN or Polyethylene Glycol for Medical Applications: Magnetic Targeting: In Vitro and in Vivo Experiments with Functionalized Spions." *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 102 (4): 860–68. doi:10.1002/jbm.b.33068.
- Monroy-Guzman, F., M. González-Neri, R. C. González-Díaz, G. Ortiz-Arcivar, I. J. Corona-Pérez, N. Nava, A. Cabral-Prieto, and L. Escobar-Alarcón. 2015. "Mössbauer and Raman Spectroscopy Characterization of Concretes Used in the Conditioning of Spent Radioactive Sources." *Hyperfine Interactions* 232 (1-3): 41–50. doi:10.1007/s10751-015-1160-x.
- Morris, R. V., G. Klingelhöfer, C. Schröder, D. S. Rodionov, A. Yen, D. W. Ming, P. A. de Souza, et al. 2006. "Mössbauer Mineralogy of Rock, Soil, and Dust at Gusev Crater, Mars: Spirit's Journey through Weakly Altered Olivine Basalt on the Plains and Pervasively Altered Basalt in the Columbia Hills." *Journal of Geophysical Research: Planets* 111 (E2): E02S13. doi:10.1029/2005JE002584.
- Mosmann, T. 1983. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *Journal of Immunological Methods* 65 (1-2): 55–63.
- Mössbauer, Rudolf L. 1958. "Kernresonanzfluoreszenz von Gammastrahlung in Ir191." *Zeitschrift für Physik* 151 (2): 124–43. doi:10.1007/BF01344210.
- "Nomenclature and Conventions for Reporting Mossbauer Spectroscopic Data." 1976. *Pure and Applied Chemistry* 45 (3): 211–16. doi:10.1351/pac197645030211.
- Norman, A., F. H. Adams, and R. F. Riley. 1978. "Cytogenetic Effects of Contrast Media and Triiodobenzoic Acid Derivatives in Human Lymphocytes." *Radiology* 129 (1): 199–203. doi:10.1148/129.1.199.
- Norman, A., M. Ingram, R. G. Skillen, D. B. Freshwater, K. S. Iwamoto, and T. Solberg. 1997. "X-Ray Phototherapy for Canine Brain Masses." *Radiation Oncology Investigations* 5 (1): 8–14. doi:10.1002/(SICI)1520-6823(1997)5:1<8::AID-ROI2>3.0.CO;2-1.
- Obaidat, Ihab, Bashar Issa, and Yousef Haik. 2015. "Magnetic Properties of Magnetic Nanoparticles for Efficient Hyperthermia." *Nanomaterials* 5 (1): 63–89. doi:10.3390/nano5010063.
- Obeid, Layal, Pierre Deman, Alexandre Tessier, Jacques Balosso, François Estève, and Jean-François Adam. 2014. "Absolute Perfusion Measurements and Associated Iodinated Contrast Agent Time Course in Brain Metastasis: A Study for Contrast-Enhanced Radiotherapy." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34 (4): 638–45. doi:10.1038/jcbfm.2013.239.

- Ortalli, I., G. Pedrazzi, K. Jiang, X. Zhang, C. Carlo-Stella, and V. Rizzoli. 1992. "Gamma-Rays from Mössbauer Sources: A Low-Dose Approach to Cancer Therapy." *Il Nuovo Cimento D* 14 (4): 351–58.
- Park, S. I., J. H. Lim, Y. H. Hwang, K. H. Kim, S. M. Kim, J. H. Kim, C. G. Kim, and C. O. Kim. 2007. "In Vivo and in Vitro Antitumor Activity of Doxorubicin-Loaded Magnetic Fluids." *Physica Status Solidi (c)* 4 (12): 4345–51. doi:10.1002/pssc.200777126.
- Porkka, Kimmo, Pirjo Laakkonen, Jason A. Hoffman, Michele Bernasconi, and Erkki Ruoslahti. 2002. "A Fragment of the HMGN2 Protein Homes to the Nuclei of Tumor Cells and Tumor Endothelial Cells in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (11): 7444–49.
- Potapkin, Vasily, Aleksandr I. Chumakov, Gennadii V. Smirnov, Jean-Philippe Celse, Rudolf Ruffer, Catherine McCammon, and Leonid Dubrovinsky. 2012. "The ⁵⁷ Fe Synchrotron Mössbauer Source at the ESRF." *Journal of Synchrotron Radiation* 19 (4): 559–69. doi:10.1107/S0909049512015579.
- Prezado, Y., M. Vautrin, I. Martínez-Rovira, A. Bravin, F. Estève, H. Elleaume, P. Berkvens, and J. F. Adam. 2011. "Dosimetry Protocol for the Forthcoming Clinical Trials in Synchrotron Stereotactic Radiation Therapy (SSRT)." *Medical Physics* 38 (3): 1709–17.
- Puck, Theodore T., Dimitry Morkovin, Philip I. Marcus, and Steven J. Cieciora. 1957. "ACTION OF X-RAYS ON MAMMALIAN CELLS." *The Journal of Experimental Medicine* 106 (4): 485–500.
- Rado, G. T. 1966. *Magnetism: Volume IIB*. Academic Press.
- Reddy, G. R., M. S. Bhojani, P. McConville, J. Moody, B. A. Moffat, D. E. Hall, G. Kim, et al. 2006. "Vascular Targeted Nanoparticles for Imaging and Treatment of Brain Tumors." *Clinical Cancer Research* 12 (22): 6677–86. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0946.
- Reiff, W. M., R. L. Mills, and J. J. Farrell. 1990. "On the Potentialities of Nuclear Gamma Resonance (Mössbauer Effect) Spectroscopy as a New, Low Dose Approach to Cancer Radiation Therapy." *Hyperfine Interactions* 58 (1-4): 2525–33. doi:10.1007/BF02398372.
- Röhlsberger, R. 2000. "Resonant X-Ray Scattering from a Rotating Medium: The Nuclear Lighthouse Effect." *Hyperfine Interactions* 126 (July): 425–29. doi:10.1023/A:1012602208229.
- Rose, J. H., A. Norman, M. Ingram, C. Aoki, T. Solberg, and A. Mesa. 1999. "First Radiotherapy of Human Metastatic Brain Tumors Delivered by a Computerized Tomography Scanner (CTRx)." *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 45 (5): 1127–32.
- Roth, T., O. Leupold, H.-C. Wille, R. Ruffer, K. W. Quast, R. Röhlsberger, and E. Burkel. 2005. "Coherent Nuclear Resonant Scattering by Ni 61 Using the Nuclear Lighthouse Effect." *Physical Review B* 71 (14). doi:10.1103/PhysRevB.71.140401.
- Rousseau, Julia, Rolf F. Barth, Manuel Fernandez, Jean-François Adam, Jacques Balosso, François Estève, and Hélène Elleaume. 2010. "Efficacy of Intracerebral Delivery of Cisplatin in Combination with Photon Irradiation for Treatment of Brain Tumors." *Journal of Neuro-Oncology* 98 (3): 287–95. doi:10.1007/s11060-009-0074-3.
- "Rudolf Mössbauer - Nobel Lecture: Recoilless Nuclear Resonance Absorption of Gamma Radiation." 2015. Accessed July 21. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1961/mossbauer-lecture.html.
- Saharan, Priya, Ganga Ram Chaudhary, S. K. Mehta, and Ahmad Umar. 2014. "Removal of Water Contaminants by Iron Oxide Nanomaterials." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 14 (1): 627–43.
- Santos Mello, R., H. Callisen, J. Winter, A. R. Kagan, and A. Norman. 1983. "Radiation Dose Enhancement in Tumors with Iodine." *Medical Physics* 10 (1): 75–78.
- Schober, H. R., and P. H. Dederichs. 1981. "Fe." In *Phonon States of Elements. Electron States and Fermi Surfaces of Alloys*, edited by K.-H. Hellwege and J. L. Olsen, 53–56. Landolt-Börnstein - Group III Condensed Matter 13a. Springer Berlin Heidelberg. http://link.springer.com/chapter/10.1007/10201666_17.
- Schreiner, L. J. 2004. "Review of Fricke Gel Dosimeters." *Journal of Physics: Conference Series* 3 (1): 9. doi:10.1088/1742-6596/3/1/003.

- Seibert, J. Anthony, and John M. Boone. 2005. "X-Ray Imaging Physics for Nuclear Medicine Technologists. Part 2: X-Ray Interactions and Image Formation." *Journal of Nuclear Medicine Technology* 33 (1): 3–18.
- Seo, Seung-Jun, Jae-Kun Jeon, Eun-Ju Jeong, Won-Seok Chang, Gi-Hwan Choi, and Jong-Ki Kim. 2013. "Enhancement of Tumor Regression by Coulomb Nanoradiator Effect in Proton Treatment of Iron-Oxide Nanoparticle-Loaded Orthotopic Rat Glioma Model: Implication of Novel Particle Induced Radiation Therapy." *Journal of Cancer Therapy* 04 (11): 25. doi:10.4236/jct.2013.411A004.
- Sharma, Virendra Nath. 1965. "The G Factor of Polycrystalline Magnetite at Low Temperatures." *Journal of Applied Physics* 36 (4): 1450–52. doi:10.1063/1.1714328.
- Sicard-Roselli, Cécile, Emilie Brun, Manon Gilles, Gérard Baldacchino, Colin Kelsey, Harold McQuaid, Chris Polin, Nathan Wardlow, and Frederick Currell. 2014. "A New Mechanism for Hydroxyl Radical Production in Irradiated Nanoparticle Solutions." *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 10 (16): 3338–46. doi:10.1002/smll.201400110.
- Singwi, K. S., and A. Sjölander. 1960. "Resonance Absorption of Nuclear Gamma Rays and the Dynamics of Atomic Motions." *Physical Review* 120 (4): 1093.
- "Spectrométrie Mössbauer | Techniques de l'Ingénieur." 2015. Accessed July 22. <http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/methodes-nucleaires-d-analyse-42389210/spectrometrie-mossbauer-p2600/>.
- Sturhahn, W., and V. G. Kohn. 1999. "Theoretical Aspects of Incoherent Nuclear Resonant Scattering." *Hyperfine Interactions* 123-124 (1-4): 367–99. doi:10.1023/A:1017071806895.
- Sun, Conroy, Omid Veisheh, Jonathan Gunn, Chen Fang, Stacey Hansen, Donghoon Lee, Raymond Sze, Richard G. Ellenbogen, Jim Olson, and Miqin Zhang. 2008. "In Vivo MRI Detection of Gliomas by Chlorotoxin-Conjugated Superparamagnetic Nanoparticles." *Small* 4 (3): 372–79. doi:10.1002/smll.200700784.
- Swenberg, James A., Adalbert Koestner, Wolfgang Wechsler, and Robert H. Denlinger. 1972. "Quantitative Aspects of Transplacental Tumor Induction with Ethylnitrosourea in Rats." *Cancer Research* 32 (12): 2656–60.
- Tablet, Cristina, Luigi Dumitrache, Liliana Minea, and Mihaela Hillebrand. 2012. "Inclusion Complexes of 3-Carboxy- and 7-Diethylamino-3-Carboxy-Coumarin with Alpha-Cyclodextrin: Spectral Study and Molecular Modeling." *Rev. Roum. Chim* 57 (7-8): 665–73.
- Terrissol, M., E. Pomplun, and C. Martin. 2002. "Computer Simulation of ^{57}Fe Bleomycin Auger Effects in DNA." *Radiation Protection Dosimetry* 99 (1-4): 69–72.
- Theil, E. C. 1987. "Ferritin: Structure, Gene Regulation, and Cellular Function in Animals, Plants, and Microorganisms." *Annual Review of Biochemistry* 56: 289–315. doi:10.1146/annurev.bi.56.070187.001445.
- Thiel, R. C., C. B. van den Berg, and G. Stevens. 1968. "Mössbauer Spectrometry by Means of Tape Recorders." *Journal of Physics E: Scientific Instruments* 1 (11): 1069. doi:10.1088/0022-3735/1/11/304.
- van Bürck, U., D. P. Siddons, J. B. Hastings, U. Bergmann, and R. Hollatz. 1992. "Nuclear Forward Scattering of Synchrotron Radiation." *Physical Review B* 46 (10): 6207–11. doi:10.1103/PhysRevB.46.6207.
- Vergote, Koen. 2005. "Development of Polymer Gel Dosimetry for Applications in Intensity-Modulated Radiotherapy." *Department of Radiotherapy and Nuclear Medicine, Faculty of Medicine and Health Sciences, Gent, Belgium*. http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/000/906/021/RUG01-000906021_2010_0001_AC.pdf.
- Vijayakumar, R., Yu. Koltypin, I. Felner, and A. Gedanken. 2000. "Sonochemical Synthesis and Characterization of Pure Nanometer-Sized Fe_3O_4 Particles." *Materials Science and Engineering: A* 286 (1): 101–5. doi:10.1016/S0921-5093(00)00647-X.
- Villaraza, Aaron Joseph L., Ambika Bumb, and Martin W. Brechbiel. 2010. "Macromolecules, Dendrimers, and Nanomaterials in Magnetic Resonance Imaging: The Interplay between Size, Function, and Pharmacokinetics." *Chemical Reviews* 110 (5): 2921–59. doi:10.1021/cr900232t.

Références Bibliographiques

- Wälzlein, C, E Scifoni, M Krämer, and M Durante. 2014. "Simulations of Dose Enhancement for Heavy Atom Nanoparticles Irradiated by Protons." *Physics in Medicine and Biology* 59 (6): 1441–58. doi:10.1088/0031-9155/59/6/1441.
- Wang, Y. X., S. M. Hussain, and G. P. Krestin. 2001. "Superparamagnetic Iron Oxide Contrast Agents: Physicochemical Characteristics and Applications in MR Imaging." *European Radiology* 11 (11): 2319–31. doi:10.1007/s003300100908.
- Wen, Patrick Y., and Santosh Kesari. 2008. "Malignant Gliomas in Adults." *New England Journal of Medicine* 359 (5): 492–507. doi:10.1056/NEJMra0708126.
- Wu, Wei, Dana E. Vanderwall, Christopher J. Turner, John W. Kozarich, and JoAnne Stubbe. 1996. "Solution Structure of Co-Bleomycin A2 Green Complexed with d(CCAGGCCTGG)." *Journal of the American Chemical Society* 118 (6): 1281–94. doi:10.1021/ja952497w.
- Yamashita, Shinichi, Gérard Baldacchino, Takuya Maeyama, Mitsumasa Taguchi, Yusa Muroya, Mingzhang Lin, Atsushi Kimura, Takeshi Murakami, and Yosuke Katsumura. 2012. "Mechanism of Radiation-Induced Reactions in Aqueous Solution of Coumarin-3-Carboxylic Acid: Effects of Concentration, Gas and Additive on Fluorescent Product Yield." *Free Radical Research* 46 (7): 861–71. doi:10.3109/10715762.2012.684879.
- Zhang, Sean X., Junfang Gao, Thomas A. Buchholz, Zhonglu Wang, Mohammad R. Salehpour, Rebekah A. Drezek, and Tse-Kuan Yu. 2009. "Quantifying Tumor-Selective Radiation Dose Enhancements Using Gold Nanoparticles: A Monte Carlo Simulation Study." *Biomedical Microdevices* 11 (4): 925–33. doi:10.1007/s10544-009-9309-5.
- Zhang, Xiaowei, Yoshitaka Yoda, Makoto Seto, Yutaka Maeda, Masami Ando, and Seishi Kikuta. 1995. "Nuclear Excitation of ^{57}Fe Ions in Hydrochloric Acid Solution Using Synchrotron Radiation." *Japanese Journal of Applied Physics* 34 (3A): L330. doi:10.1143/JJAP.34.L330.

Radiothérapie par photoactivation de nanoparticules et effet Mössbauer

Une radiothérapie efficace nécessite un dépôt de dose localisé à la tumeur, et donc un contraste entre le tissu tumoral et les tissus sains environnants. Une irradiation de basse énergie monochromatique au synchrotron d'une tumeur chargée en éléments lourds permet de maximiser l'interaction photoélectrique dans la tumeur et d'épargner les tissus sains, car les photoélectrons et les électrons Auger produits ont un TEL très élevé et déposent leur énergie autour des éléments lourds, augmentant fortement le dépôt de dose. Ils peuvent induire des dommages à l'ADN (cassures double brin) fortement létaux. Un autre phénomène permet également de promouvoir l'émission d'électrons Auger et d'augmenter ainsi la dose, l'effet Mössbauer. Cette interaction résonante et sans recul spécifique à certains isotopes dont le ^{57}Fe présente une section efficace 450 fois plus importante que celle de l'effet photoélectrique. Ce travail de doctorat a évalué l'utilisation *in vitro* de nanoparticules de magnétite combinées à ces deux effets physiques. Les nanoparticules présentent une internalisation et une distribution dans les cellules F98 qui sont très propices à la radiosensibilisation : de grandes concentrations proches du noyau des cellules, et peu de toxicité ont été obtenues. Ceci a permis d'obtenir par photoactivation des NPFe un facteur d'augmentation de 3 ce qui est considérable. Ce travail multidisciplinaire rassemble des expériences de physique, de biologie et de chimie, pour évaluer les applications de nanoparticules de fer à la radiothérapie.

Mots-clés : Nanoparticules, effet Mössbauer, radiothérapie, rayonnement synchrotron, effet photoélectrique

Radiotherapy by photoactivation of iron nanoparticles and Mössbauer effect

An efficient radiotherapy needs a localized dose to the tumour, which means a high contrast between tumorous and healthy tissues. A synchrotron low energy monochromatic irradiation of a tumour charged in high-Z elements allows maximizing photoelectric interactions in the tumour and spare the healthy tissues. Photoelectrons and high LET Auger electrons thus produced deposit their energy locally, enhancing radiation dose to tumor cells. Another interaction allows to enhance the dose by Auger electrons: the Mössbauer effect. This resonant and recoilless interaction specific to some isotopes like ^{57}Fe has a cross section 450 times bigger than photoelectric effect. This thesis evaluates the *in vitro* use of magnetite nanoparticles combined with those 2 types of interactions. The nanoparticles evaluated present a high internalisation and a perinuclear distribution inside F98 cells. A dose-enhancement factor of 3 was obtained by photo activation of the iron Nps, this represents a huge increase. This multidisciplinary work encompasses experiments in chemistry, physics and biology in order to evaluate the applications of magnetite nanoparticles to radiotherapy.

Key-words: Nanoparticles, Mössbauer effect, radiotherapy, synchrotron radiation, photoelectric effect.