



HAL
open science

Modification d'acides aminés et de protéines en milieux aqueux sous faisceau d'ions

Nicolas Ludwig

► **To cite this version:**

Nicolas Ludwig. Modification d'acides aminés et de protéines en milieux aqueux sous faisceau d'ions. Autre. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAE020 . tel-02087425

HAL Id: tel-02087425

<https://theses.hal.science/tel-02087425>

Submitted on 2 Apr 2019

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DE PHYSIQUE ET CHIMIE-PHYSIQUE
Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178, CNRS

THÈSE

présentée par :

Nicolas LUDWIG

Soutenance le: **12 Octobre 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie-Physique/ Radiolyse

Modification d'acides aminés et de protéines en milieu aqueux sous faisceau d'ions

THÈSE dirigée par :

M BARILLON Rémi

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme HOUÉE-LEVIN Chantal

Professeur, Université de Paris-Sud 11

M FROMM Michel

Professeur, Université de Franche-Comté

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M BALDACCHINO Gérard

Chercheur CEA, CEA Paris-Saclay

Mme HELLWIG Petra

Professeur, Université de Strasbourg

M RAFFY Quentin

Maitre de Conférences, Université de Strasbourg

En arrivant au terme de ce travail, c'est avec beaucoup d'émotion que je rédige ces quelques mots pour remercier toutes les personnes impliquées de près ou de loin qui ont permis l'accomplissement de ce projet.

Je tiens tout d'abord à remercier Rémi Barillon, Directeur de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC) dans lequel cette thèse s'est déroulée mais aussi, pour l'avoir dirigée et rendue possible. Un grand merci pour m'avoir guidé dans la recherche depuis mon cursus universitaire et pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions scientifiques et humaines possibles. Son expérience, ses conseils et son recul sur mon travail m'ont été précieux, notamment dans la phase finale de la rédaction de ce manuscrit.

Je tiens particulièrement à remercier Quentin Raffy pour m'avoir encadré durant ces trois années de thèse. Sa rigueur, son expérience, sa persévérance et son intégrité m'ont guidé dans le travail de recherche. Je tiens également à le remercier pour sa bonne humeur constante et sa disponibilité qui ont permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions. Je pense pouvoir dire que je suis arrivé il y a plusieurs années au laboratoire en qualité d'étudiant et que je repars aujourd'hui comme l'un de ses collègues et amis.

Un grand merci à Chantal Houée-Levin et Michel Fromm d'avoir accepté de juger mon travail en tant que rapporteurs ainsi qu'à Gérard Baldacchino et Petra Hellwig pour participer à mon jury d'examen en tant qu'examineurs. Merci à eux également pour la bienveillance dont ils ont pu faire preuve à mon égard durant nos différentes rencontres.

Je remercie tout particulièrement Catherine Galindo et Philippe Peaupardin avec qui j'ai travaillé en équipe pour la réalisation de la plupart des expériences d'irradiation. A Catherine, plus particulièrement, pour son précieux travail dans les développements analytiques et pour son aide dans le traitement de données. A Philippe, pour son expertise technique sur le développement des montages expérimentaux. Merci également à eux deux pour ces nombreuses heures d'irradiation passées dans la bonne humeur malgré nos multiples vérifications de la loi de Murphy.

La réalisation des expériences d'irradiation sur la plateforme ACACIA n'aurait pas été possible sans l'aide de Dominique Muller et Yann Le Gall de l'institut Icube. Je tiens à les remercier pour leur disponibilité et leurs conseils avisés tant techniques que théoriques.

Je remercie également Satoshi Kodaira qui m'a accueilli dans son laboratoire (NIRS, Japon) et qui a rendu possibles les expériences réalisées au HIMAC. Un grand merci à Tamon Kusumoto pour sa disponibilité et son investissement pour ces expériences

d'irradiation, pour la plupart nocturnes. Je remercie également toute l'équipe de la « Radiation measurements research team » et notamment Hajime pour leur accueil et leurs conseils durant mes séjours japonais.

Je souhaite remercier l'atelier mécanique de l'IPHC et, plus particulièrement, Schwab Cédric, Dangelser Eddy et Krauth Marc pour leur travail sur la réalisation des montages expérimentaux utilisés dans cette étude.

Mes remerciements vont également vers Serge Pin et Jean-Philippe Renault du CEA de Saclay pour m'avoir fourni de l'apomyoglobine en grande quantité et pour m'avoir permis de réaliser des irradiations sous rayons gamma.

J'ai également une pensée pour tous les stagiaires qui ont participé de près ou de loin à ce travail de thèse, en particulier Svetlana, Julia, Flore et Mo.

Merci à toute l'équipe de radiochimie pour leur accueil et leur bienveillance durant ces années au laboratoire : Sylvia, Olivier, Maria, Christophe, Ali, Mireille et Jean-Marc. Merci également à mes collègues thésards qui m'ont permis de me changer les idées au laboratoire : Guillaume, Tamon, Abderrazak et Florian. Le laboratoire va me manquer !

Je remercie également Louloutte et Georges pour leur aide dans les corrections, s'étendant parfois jusqu'au bout de la nuit. Merci également de m'avoir redonné le sourire pendant la rédaction avec des histoires délirantes de rat ou de diverses cicatrices.

Je remercie tous mes amis pour les bons moments passés ensemble permettant de déconnecter de tout le reste. Les strasbourgeois : Roro, Guigui, Alex, Marco, Quentin, Julie, Maxime & Maxime, Berthe, Justin, Jérémie, Benji, Ras-le-bol, Erika, Mag, ou encore Adrien ; Ceux de la vallée : Thibaud, Thibaut, Chris, Karen, Fab, Karine, Lulu, Boobi et Clément ; Et tous ceux que je n'aurais pas cités. C'est toujours un plaisir de se revoir et j'attends avec impatience nos rendez-vous annuels comme le Wacken ou les Cochonailles. J'espère que ça durera encore de longues années !

Un merci particulier à mes parents, pour m'avoir donné les moyens de réussir et pour m'avoir encouragé et guidé toutes ces années. Merci également à ma sœur, Elodie, et à mon filleul, Axel pour tous les week-ends passés ensemble à Sewen et pour les nombreux fou-rires partagés. Que c'est agréable de rentrer et tous vous revoir.

Enfin, je ne saurais finir cette liste sans remercier ma moitié, Margaux, toujours présente pour moi durant ces trois années et qui a été d'un soutien sans faille dans toutes ces épreuves. J'espère pouvoir lui être d'une aide aussi précieuse un jour.

Sommaire

Sommaire	5
Introduction générale	13
Chapitre 1: Revue bibliographique	17
I. Physique des ions accélérés	18
A. Les différents rayonnements ionisants	18
B. Interactions ions accélérés – matière	21
1) Formule de Bethe-Bloch	21
2) Transfert d'énergie et production d'électrons secondaires	24
3) Quantification des dégâts sous faisceau d'ions	27
a) Le rendement radiolytique	27
b) Intégration des pertes d'énergie avec des faisceaux d'ions de faibles énergies	27
c) Diffusions multiples coulombiennes	28
d) Chocs nucléaires et fragmentation	29
4) Outils de calcul	30
II. Radiolyse de l'eau	31
A. Evolution temporelle de la radiolyse de l'eau	31
1) L'étape physique	31
2) L'étape physicochimique	33
3) L'étape de chimie non homogène.	34
B. Effets de TEL du rayonnement sur la radiolyse de l'eau	37
1) Influence de la densité de dépôt d'énergie	37
2) Hypothèse de l'ionisation multiple et production de O_2 et de $HO_2^{\bullet}/O_2^{\bullet-}$ primaire à fort TEL	38
C. Radiolyse de solution diluée en milieu oxygéné	40
1) Influence de l'oxygène sur la radiolyse de l'eau	40
2) Les espèces d'intérêt de la radiolyse de l'eau en milieu oxygéné	41
a) Le radical hydroxyle HO^{\bullet}	41
b) Le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$	41
c) L'eau oxygénée H_2O_2	42
III. La radiobiologie moléculaire	42
A. Phénomènes de radiolyse à l'échelle cellulaire	43
1) Ancien modèle ADN-centrique	43
2) Nouveau paradigme : l'importance de l'irradiation hors noyau et l'effet bystander	44
3) Observables et effets de TEL : RBE et effet oxygène	45
B. De la radiolyse d'une cellule aux dégradations des biomolécules	47

1) Composition moléculaire d'une cellule	47
2) Les protéines, les cibles statistiques et fonctionnelles	47
3) Interactions directes ou indirectes du rayonnement	48
IV. Radiolyse des protéines et des acides aminés	48
A. Structure et composition des protéines	49
1) Les 20 acides aminés protéinogènes du corps humain	49
2) De la structure primaire à la structure tertiaire	50
3) Radiolyse d'acides aminés et de polypeptide pour la compréhension de mécanismes à l'échelle d'une protéine	51
B. Mécanismes de dégradation des protéines	52
1) Effets indirects en solution aqueuse	52
a) Chimie de la chaîne principale	52
b) Chimie des chaînes latérales	53
2) Effets directs en milieu aqueux	55
C. Modifications structurelles et conséquences biologiques	57
D. Irradiation de protéines sous faisceau d'ions, effets de TEL	57
V. Schéma récapitulatif	59
Chapitre 2: Expériences d'irradiation	61
I. Expériences d'irradiation	62
A. Les rayonnements ionisants utilisés	62
B. Fluence en solution et débit de fluence	63
C. Techniques de dosimétrie mises en œuvre.	65
1) Mesure du courant par cavité de Faraday	65
2) Détecteur solide de traces nucléaires : le CR39	65
3) Dosimétrie chimique : dosimètre de Fricke	66
a) Principe de la dosimétrie de Fricke	66
b) Limitation de la dosimétrie de Fricke	68
II. Sources de faisceaux d'ions	69
A. Plateforme ACACIA, Van de Graaff 4MV	70
1) Présentation ACACIA	70
2) Caractéristiques de la sortie air et dosimétrie.	71
3) Comparaison des mesures de fluences	73
A. Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba (HIMAC)	73
1) Premier centre mondial de Carbothérapie	74
2) Expériences au HIMAC	75
a) Medium Energie room (MEXP) et dosimétrie	76

b) Physics room (PH)	79
III. Supports et montages d'irradiation sous faisceau d'ions	80
A. Irradiation de solutions diluées	80
1) Irradiation de solutions diluées par des ions de faibles énergies	80
a) Cellule d'irradiation « faible énergie »	80
b) Montage à circulation et suivi en ligne.	82
2) Irradiation de solutions diluées par des ions de hautes énergies	83
a) Cellule d'irradiation « haute énergie »	83
b) Montages à circulation	84
B. Irradiation de gels de protéines	85
1) Contraintes d'échantillonnage	85
2) Cellule d'irradiation des gels à basses énergies	85
3) Irradiations à hautes énergies.	87
IV. Expériences d'irradiation par des photons gamma	87
A. Césium 137	88
B. Irradiation gamma et dosimétrie	88
V. Tableau récapitulatif	90
Chapitre 3: Rendements de production du radical hydroxyle	91
I. Principe, scavenging avec 3CCA	92
A. Mesure indirecte de production du radical hydroxyle	92
1) Les sondes du radical hydroxyle pour la radiolyse pulsée	93
2) Les sondes du radical hydroxyle par capture	94
A. L'acide 3-coumarine carboxylique	96
1) Les coumarines au service de la radiolyse	96
2) La 3CCA comme capteur du radical HO•	97
II. Méthode expérimentale	98
A. Préparation des solutions	98
B. Irradiations réalisées	99
C. Quantification de la 7OH-3CCA	100
1) Propriétés spectroscopiques de la 7OH-3CCA	100
2) Analyses en ligne	101
3) Analyses par HPLC-Fluo	101
4) Calcul des rendements de production du radical hydroxyle	103

III. Détermination des rendements de production du radical hydroxyle

103

- A. Validation de la méthode par mesure des rendements sous irradiation par des rayons gamma 103
- B. Des mesures intégrales aux rendements différentiels avec des ions de basses énergies 104
 - 1) Mesure des rendements intégraux sous protons 105
 - 2) Rendements différentiels avec des protons de basses énergies 106
 - 3) Mesures avec des particules alpha et des ions carbone 107
- C. Effets de la nature des particules sur les rendements de production en radical hydroxyle 110
 - 1) Etude en fonction du TEL 110
- D. Comparaison à la littérature : cas des protons 112

IV. Conclusion

113

Chapitre 4: Radiolyse d'acides aminés en solution aqueuse : la phénylalanine

115

I. Etat de l'art de la radiolyse de la phénylalanine

116

- A. La phénylalanine parmi les acides aminés 116
- B. La L-Phénylalanine 117
- A. Radiolyse de la phénylalanine 118
 - 1) Mécanisme de radiolyse à faible TEL 118
 - a) Attaque du radical hydroxyle 118
 - b) Milieu oxygéné, pH neutre 119
 - a) Milieu désoxygéné, pH neutre 121
 - b) Variations du pH et additifs 121
 - 2) Effets de TEL 123

II. Méthode expérimentale

124

- A. Irradiation de solutions diluées de phénylalanine 124
 - 1) Produits chimiques utilisés 124
 - 2) Conditions d'irradiation 125
 - a) Rayonnements utilisés 126
 - b) Variation des conditions chimiques d'irradiation 126
- B. Suivi en ligne 128
- C. Analyses post-irradiation HPLC-DAD-Fluo-CAD-MS 129
 - 1) Appareillage et conditions d'analyse 129
 - 2) Séparation et identification des produits de radiolyse 130
 - 3) Quantification des produits de radiolyse 133

III. Résultats et discussion	135
A. Mesures intégrales et rendements différentiels	135
1) Protons de basses énergies	136
2) Particules alpha et ions carbone de basses énergies	137
3) Rendements différentiels avec ions de basses énergies	138
4) Rendements avec des ions de hautes énergies et gamma	141
5) Classes de produits de radiolyse	141
B. Première hydroxylation : production des tyrosines	142
1) Mécanismes de formation des tyrosines	142
2) Effets de TEL et parallèle avec le radical hydroxyle	143
3) Effets de charge de la particule	145
C. Production de dimères	146
D. Formation de la 2,5-dopa	147
1) Surproduction de 2,5-dopa et effet de TEL	147
2) Mécanisme de formation de la 2,5-dopa	148
3) Vers une dépendance au débit de dose	150
E. Mécanismes de seconde hydroxylation	152
F. Bilan des réactions de la phénylalanine avec le radical hydroxyle	152
IV. Conclusion	154
V. Vers une généralisation aux acides aminés aromatiques : le tryptophane	156
Chapitre 5: Effets directs et effets indirects sur la radiolyse des protéines : la myoglobine	159
I. La myoglobine : structure et propriétés	160
A. Choix de la myoglobine comme cible	160
B. De la structure primaire à la structure tertiaire	161
C. Le site actif : l'hème	162
1) Structure et coordination	162
2) Propriétés d'oxydoréduction en solution aqueuse aérée	163
c) Activité semi-catalytique	166
D. L'apomyoglobine	167
II. Etudes des effets indirects de l'irradiation de la myoglobine	167
A. Etat de l'art de la radiolyse de la myoglobine en solution aqueuse	167
B. Méthode expérimentale	169
1) Produits utilisés	169

2)	Préparation et purification des protéines cibles	171
a)	Obtention de l'apomyoglobine	171
b)	Purification des cibles protéiques	171
3)	Expériences d'irradiation	172
a)	Conditions d'irradiation	172
b)	Rayonnements utilisés	172
4)	Méthodes analytiques	173
a)	Suivi en ligne, UV-Visible	173
b)	Dichroïsme circulaire	174
c)	Analyses par HPLC-UV-CAD-MS	175
d)	Electrophorèse, SDS-PAGE	179
C.	Etude phénoménologique de la radiolyse de la myoglobine par des protons	180
1)	Perte d'intégrité de la protéine	180
a)	Perte de la structure secondaire de la protéine.	180
b)	Des modifications de l'hème	181
c)	Perte d'activité de la protéine	185
2)	Effets de radiolyse sur la chaîne principale	186
3)	Effets de la radiolyse sur les chaînes latérales	188
4)	Effets de l'hème : irradiation de l'apomyoglobine	188
D.	Effets de la nature de la particule	192
1)	Effets de TEL	192
2)	Effets de charge sur la radiolyse	194
E.	Radiolyse de la myoglobine en tampon phosphate	195
F.	Conclusion intermédiaire	196
III. Etude des effets directs de l'irradiation de la myoglobine		197
A.	Développement des gels et caractérisation	197
1)	Produits chimiques utilisés	197
2)	Préparation de solutions de protéines très concentrées	197
3)	Fabrication des gels	198
4)	Analyses UV-Visible	200
5)	Analyses infrarouge	200
a)	Identification des bandes caractéristiques	200
b)	Bande amide I et extraction de la structure secondaire	201
B.	Expériences d'irradiation	203
1)	Protocole d'irradiation classique	203
2)	Rayonnements utilisés	203
3)	Conditions d'irradiation particulières	204
C.	Etude de la radiolyse directe de myoglobine	204
4)	Etude phénoménologique	204
a)	Evolution des propriétés spectroscopiques de la myoglobine sous irradiation	204
b)	Modification de la structure secondaire de la protéine	206

c) Irradiations en milieu désoxygéné	208
d) Production et capture de monoxyde de carbone	209
5) Effets de TEL sur les modifications de structures secondaires	211
6) Structure finale, courbe de survie et théorie de la cible	214
7) Effets de charge sur les modifications de structures secondaires	217
D. Conclusion intermédiaire	218
E. Multiplication des cibles protéiques	219
IV. Comparaison des irradiations de gels et de solutions diluées	221
Conclusion Générale	223
Références bibliographiques	227

Introduction générale

En 1895, la découverte des premiers rayonnements ionisants a été faite par Wilhem Röntgen en mettant en évidence des rayonnements capables de traverser une feuille de papier mais arrêtés par les os : les rayons X. Par la suite, Henri Becquerel découvrit la radioactivité naturelle par hasard en voulant étudier la phosphorescence et Pierre et Marie Curie découvrirent d'autres éléments radioactifs, le polonium et le radium. A partir de ces éléments précurseurs, des avancées majeures sont réalisées dans la première moitié du 20^e siècle sur la compréhension et la maîtrise de la radioactivité et des rayonnements ionisants. De nombreux domaines d'applications ont alors vu le jour, notamment dans le domaine de la médecine avec la mise au point de la radiographie par rayons X, de la radiothérapie ou encore l'utilisation plus tardive de radio-isotopes. C'est ensuite avec la découverte de la fission de l'uranium en 1938 que cette technologie a été envisagée pour la production d'énergie et a également donné naissance au projet Manhattan et au développement de l'armement atomique.

La radioactivité devenant de plus en plus présente durant le 20^e siècle, des premiers cas de développement de tumeurs radio-induites ont été mis en évidence suite à l'exposition aux rayonnements ionisants. Ces tumeurs se sont déclarées notamment chez des mineurs d'uranium ou dans le personnel de la médecine nucléaire, exposés de façon répétitive aux rayonnements ionisants. Ceci, associé aux mémoires des bombardements nucléaires d'Hiroshima et Nagasaki en 1945, mit en évidence la nécessité d'étudier les effets des rayonnements ionisants sur le vivant, ce qui donna naissance à la radiobiologie. Historiquement, la radiobiologie a été plus étudiée avec des rayonnements à faible densité de dépôt d'énergie caractérisés par leur faible transfert d'énergie linéique (TEL), soit les rayons X et les rayons gamma. Depuis les années 1990, la radiothérapie utilisant des ions accélérés, la hadronthérapie, se développe en parallèle avec la radiothérapie classique car elle permet une meilleure préservation des tissus sains et le traitement de certaines tumeurs résistantes aux photons de hautes énergies. A l'heure actuelle, une soixantaine de centres de protonthérapie et une dizaine de centres de thérapie carbone sont opérationnels dans le monde. De même, les thématiques liées à la conquête spatiale vont de pair avec les études de l'exposition aux rayonnements cosmiques, notamment des protons et des particules alpha. Ainsi, comprendre l'interaction des ions accélérés sur le vivant est devenu un enjeu capital. Comme ces derniers ont des TEL variables, et souvent importants, ceci implique d'étudier les effets de TEL sur les mécanismes de radiobiologie.

Généralement, les effets biologiques observés sont la mort ou la mutation cellulaire suite à une exposition à des rayonnements ionisants. Cependant, de multiples étapes complexes mènent de l'irradiation à ces effets biologiques. La première étape est le processus physique de l'excitation et l'ionisation de la matière le long du passage du rayonnement qui se produit à l'échelle de temps de 10^{-15} seconde, juste après l'exposition. Par la suite, l'énergie déposée peut induire la dégradation des biomolécules (ADN, protéines, ...) directement et/ou indirectement par l'intermédiaire de la radiolyse de l'eau en solution. Dans le cas de particules chargées, en particulier les ions lourds à forte densité de dépôt d'énergie, les dégâts directs observés peuvent être particulièrement sévères (cassures double brin de l'ADN ou changements de structures de protéines). Une partie de l'énergie déposée donnera lieu à la production de grandes quantités de radicaux dans les biomolécules ou dans les molécules d'eau à proximité. Ces radicaux pourront

alors indirectement causer des dommages aux biomolécules par des procédés physico-chimiques qui se produisent dans l'échelle de temps de 10^{-13} à 10^{-6} s et initier des effets biologiques se produisant à des temps bien plus longs, de quelques secondes, jusqu'à plusieurs dizaines d'années. De nombreuses études ont été réalisées par des radiobiologistes sur les effets biologiques, du niveau de la cellule jusqu'à l'organisme entier (Girdhani et al., 2015). Les résultats obtenus ont fourni des renseignements précieux, non seulement sur les risques des radiations, mais aussi sur les avantages pour des applications thérapeutiques. Pendant ce temps, la physique des rayonnements et des mesures a été bien établie, ce qui donne accès à des grandeurs physiques de quantification de l'énergie déposée. Cependant, les processus détaillés qui se produisent dans la biomolécule entre l'interaction initiale (processus physique) et les résultats définitifs (processus biologique) par le biais de réactions chimiques complexes sont encore loin d'être compris.

Dans ce contexte, ce travail de doctorat vise à améliorer la compréhension des dommages aux biomolécules sous irradiation par des ions, au niveau moléculaire. Plus précisément, comme les protéines sont la composante majeure de la cellule après l'eau (20 % en masse), ces recherches portent sur les dommages subis par celles-ci et les acides aminés, leurs composants élémentaires. En solution aqueuse, les dégâts aux biomolécules peuvent se produire suite aux effets directs du rayonnement mais aussi, par effets indirects, via l'intermédiaire de produits de radiolyse de l'eau. Par conséquent, la radiolyse de l'eau, dans les mêmes conditions expérimentales, doit, elle aussi, être étudiée pour comprendre les effets indirects. Si la radiolyse de nombreuses biomolécules est relativement bien décrite et connue sous l'action de rayonnements gamma ou d'électrons rapides, les travaux sous irradiation par des ions restent rares. Bien que l'utilisation des ions accélérés en médecine prenne de l'ampleur, il est important de souligner qu'aucune étude systématique n'a encore été effectuée sur ces biomolécules avec des ions de différents TEL et de masses et Z différents. La nature des ions et la manière dont ils déposent leur énergie en solution vont influencer la radiolyse des biomolécules, que ce soit par effets directs ou indirects. C'est dans ce contexte que s'est développé le sujet de cette thèse, avec la volonté d'arriver à terme à une étude systématique d'irradiation de biomolécules pour décrire les dégâts chimiques s'y produisant sous irradiation par des ions accélérés. Les expériences se sont donc orientées sur deux points principaux, la réalisation d'études mécanistiques et la mesure quantitative des modifications chimiques observées. Dans un premier temps, il nous a semblé nécessaire d'étudier la radiolyse de l'eau, et plus spécifiquement la production de l'espèce la plus réactive en milieu oxygéné, le radical hydroxyle. Ensuite, des cibles modèles ont été choisies principalement pour leur simplicité, mais aussi car leurs mécanismes de radiolyse à faible TEL sont connus et bien décrits dans la littérature. La phénylalanine a été sélectionnée pour les acides aminés, et la myoglobine pour les protéines. La suite de ce manuscrit sera alors organisée en cinq chapitres de la manière suivante :

- Le premier chapitre est une revue bibliographique introduisant le contexte de l'étude ainsi que les différentes notions nécessaires à la bonne compréhension du manuscrit. Nous verrons que c'est la physique des interactions ions-matière qui régit le dépôt d'énergie de l'ion dans celle-ci. L'eau étant la première composante du corps humain, nous nous intéresserons ensuite au cas du dépôt d'énergie dans l'eau et aux mécanismes de radiolyse

de l'eau associés. Par la suite, les principales notions de radiobiologie à l'échelle moléculaire seront introduites avant de s'intéresser plus particulièrement au cas de la radiolyse des protéines et de leurs constituants élémentaires, les acides aminés. Cette partie se veut très générale et ne décrit pas spécifiquement le cas des cibles qui seront irradiées.

- Le second chapitre est consacré à l'aspect technique des irradiations par des ions. Il y sera décrit les types de faisceaux utilisés, les montages expérimentaux développés et également les protocoles d'irradiation. Les techniques de mesures de la dose mises en œuvre seront également exposées.
- Le chapitre 3 se consacre aux résultats obtenus dans l'étude de la radiolyse de l'eau et plus spécifiquement, à la mesure des rendements de production en radical hydroxyle. Ceux-ci ont été obtenus par capture grâce à une sonde spécifique, l'acide 3-coumarine-carboxilique. Cette technique ainsi que les expériences réalisées seront décrites et les résultats seront discutés. L'évolution du rendement de production du radical HO• a été étudiée en fonction du temps mais aussi du TEL et du type de particule.
- Le chapitre 4 se base sur les données acquises par l'étude de la radiolyse de l'eau pour tenter de comprendre la radiolyse par effet indirect sur un acide aminé modèle, la phénylalanine et pour étudier une éventuelle spécificité des ions dans les dégâts observés. Un état de l'art de la radiolyse de cet acide aminé à bas TEL, les moyens mis en œuvre et les résultats obtenus seront discutés dans ce chapitre.
- La dernière partie, le chapitre 5, regroupe à la fois l'étude des effets directs et indirects de la radiolyse sur une protéine, la myoglobine. Cette dernière est une petite hémoprotéine avec une structure principalement constituée d'hélices alpha. Pour évaluer l'importance de l'hème, l'apomyoglobine, protéine privée de celui-ci, a également été étudiée dans les mêmes conditions, lorsque c'était possible. Les irradiations ont été réalisées à la fois en solution aqueuse diluée et en milieu concentré et hydraté, sous forme de gel. Après une description de la protéine et un état de l'art des connaissances sur sa radiolyse, les résultats obtenus seront présentés et discutés. Les phénomènes de radiolyse seront décrits et les effets de TEL seront abordés dans les deux cas.

Chapitre 1: Revue bibliographique

I. Physique des ions accélérés

Comprendre les mécanismes de dépôt d'énergie par des ions est essentiel pour une étude de radiolyse. Les dégâts aux biomolécules sont directement dus à la façon dont les ions déposent leur énergie. Dans cette partie, les caractéristiques des ions accélérés parmi les rayonnements ionisants seront introduites. Les principaux phénomènes d'interactions ion-matière seront discutés et le parallèle sera réalisé avec les interactions électron-matière et photon-matière. Pour finir, les problématiques inhérentes à l'utilisation de faisceaux d'ions rencontrées dans cette étude seront discutées.

A. Les différents rayonnements ionisants

Un rayonnement ionisant est un rayonnement capable d'ioniser la matière lors de son passage. Les premiers rayonnements ionisants ayant été mis en évidence sont les rayons X ainsi que les rayonnements alpha, bêta et gamma issus de la radioactivité. Par la suite, de nombreux autres rayonnements ionisants ont été identifiés, on peut citer les neutrons, les électrons ou encore les ions accélérés comme les protons, les noyaux d'hélium (particule alpha) et les ions carbone (Tableau 1-1). Dans le cas des rayons X et des rayons gamma, ils sont de type électromagnétique contrairement aux neutrons, aux électrons et aux ions accélérés qui sont des rayonnements de type corpusculaire. Ils peuvent se différencier par leur nature, leur masse, leur énergie ou encore leur origine mais lors d'une étude de radiolyse, la principale distinction est faite suivant leur mode d'interaction avec la matière. Des rayonnements possédant une charge élémentaire vont être directement ionisants et des rayonnements non chargés sont indirectement ionisants. Le dépôt d'énergie du rayonnement dépend directement de ces interactions avec la matière.

Tableau 1-1 : Les ions accélérés parmi les rayonnements ionisants. Liste non exhaustive.

Type de rayonnement		Rayonnements ionisants	Charge élémentaire
Rayonnement électromagnétique	Indirectement ionisant	Rayon X	0
		Rayon gamma	0
Rayonnement corpusculaire	Directement ionisant	Neutron	0
		Electron / Particule bêta	- 1
		Proton	+ 1
		Ion hélium / Particule alpha	+ 2
		Ion carbone	+ 6
Ions accélérés			

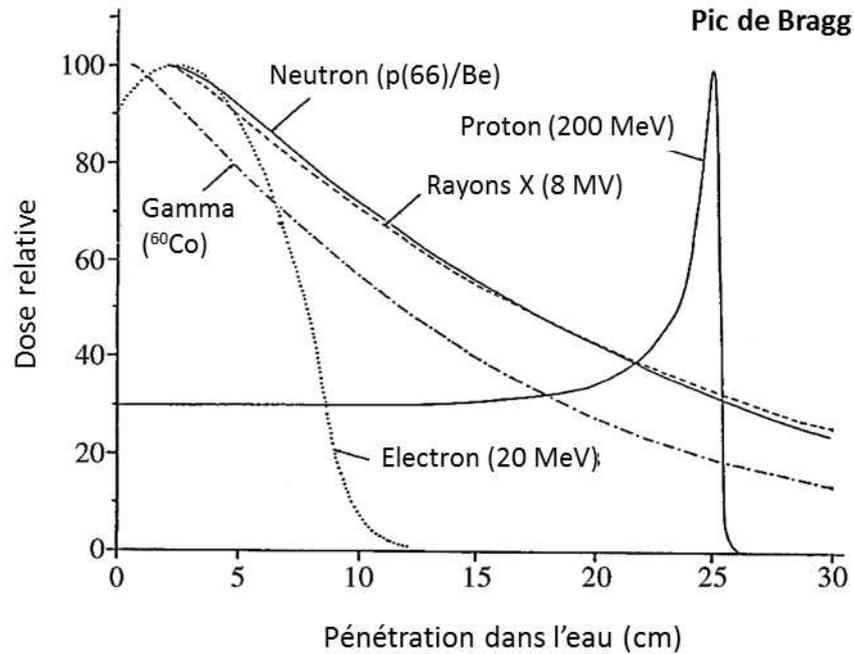


Figure 1-1 : Profil de dépôt de dose relatif des rayonnements utilisés lors de la thérapie en fonction de la distance de pénétration dans l'eau. Figure adapté d'après (Orecchia et al., 1998)

Le profil de dépôt d'énergie de différents types de rayonnements est présenté dans la Figure 1-1. Les rayonnements directement ionisants (proton et électron) ont un dépôt d'énergie croissant dans la matière avant de former un maximum en fin de parcours. Cette tendance est particulièrement visible dans le cas des ions, où le pic formé est nommé pic de Bragg. En ce qui concerne les rayonnements indirectement ionisants, on observe une décroissance de leur dépôt d'énergie en fonction de la distance de pénétration dans la matière (neutrons, rayons X et rayons gamma).

Les rayonnements électromagnétiques X et gamma sont tous deux indirectement ionisants car ils ne possèdent pas de charges élémentaires. Dans la majorité des cas, les rayons X sont de plus faible énergie que les rayons gamma avec une frontière énergétique de l'ordre de 100 keV, mais on les distingue selon leur mode de production. En effet, les rayons gamma sont émis lors de la désintégration radioactive d'un noyau instable alors que les rayons X sont générés par des transitions électroniques dans les couches profondes d'un atome. Dans la même catégorie, les UV lointains sont aussi des rayonnements ionisants mais de plus faible énergie. Trois principaux phénomènes d'interactions photon-matière interviennent en fonction de l'énergie du photon incident. Pour une énergie inférieure à 10 keV, les rayonnements sont totalement absorbés par un électron du milieu qui est éjecté avec une énergie cinétique dépendant de l'énergie du rayon incident, c'est l'effet photoélectrique. D'une énergie de 10 keV au MeV, c'est l'effet Compton qui est prépondérant. Il correspond à la diffusion inélastique d'un photon incident lors d'une collision avec un électron faiblement lié, une partie de l'énergie du photon lui est transférée et l'électron est éjecté. Pour des énergies supérieures au MeV, l'interaction majoritaire d'un photon est la création de paires. C'est la création d'un couple électron-positron qui ne peut se produire

uniquement à proximité d'un noyau pour respecter les règles de conservation de l'énergie et de la quantité de mouvement par interaction avec le noyau. Tous ces modes d'interactions conduisent à la formation d'électrons capables d'ioniser la matière, d'où l'appellation de ces rayonnements « indirectement ionisants ». L'énergie de ces électrons secondaires émis diminue lorsque l'énergie du photon incident diminue. Ainsi, le dépôt d'énergie décroît en fonction de la perte d'énergie du photon et donc, de sa distance de pénétration dans la matière (Figure 1-1).

Parmi ces rayonnements, les neutrons sont un cas à part, ce sont des particules neutres. Ils vont avoir de faibles interactions avec la matière qui peuvent être de deux types. D'abord, il y a les phénomènes de diffusion élastique ou inélastique qui consistent en la modification de la trajectoire du neutron avec ou sans transfert d'énergie. Ensuite, il y a les processus d'absorption qui correspondent à la capture du neutron suivie d'une émission de rayonnements ionisants (gamma, protons, alpha ou neutrons) et qui peuvent engendrer la fission nucléaire. Leur pouvoir ionisant vient indirectement par l'émission de particules secondaires. Ainsi, de la même manière que pour les photons, l'émission de particules secondaires est responsable de leur profil de dépôt d'énergie décroissante avec leur pénétration dans la matière (Figure 1-1).

Les ions accélérés (particules chargées, composées de nucléons) et les électrons font partie des rayonnements directement ionisants. Ainsi, leurs interactions sont plus fortes que celles décrites jusqu'à présent et résultent principalement d'un couplage électromagnétique entre la charge véhiculée par le rayonnement et les charges de la matière (noyaux/électrons). A ce stade, on peut toutefois différencier les électrons des ions accélérés. Les électrons accélérés sont un cas particulier car ils sont de même nature que les électrons composant la matière et de masse bien plus faible que les ions accélérés. Leur trajectoire est alors plus facile à dévier. Ainsi, pour décrire les interactions électron-matière, il faut également tenir compte des processus d'émission (comme les rayonnements de freinage ou Bremsstrahlung) avec des électrons qui sont négligeables dans le cas des ions accélérés bien plus lourds. Pour ces derniers, uniquement le ralentissement électronique et les phénomènes qui en découlent seront pris en compte.

D'un point de vue macroscopique, en considérant la matière comme isotrope, le dépôt d'énergie des ions et des électrons est décrit par unité de longueur ce qui est caractérisé par le transfert d'énergie linéique (TEL). Le TEL est également lié à l'inverse du pouvoir d'arrêt de la matière traversée et cette notation est la plus conventionnelle pour décrire la densité de dépôt d'énergie d'une particule chargée dans une matière donnée. Dans les cas des autres rayonnements, on parle de TEL équivalent qui reflète l'interaction des rayonnements secondaires émis avec la matière (électrons pour les rayons X ou gamma).

B. Interactions ions accélérés – matière

Le dépôt d'énergie des ions accélérés dans la matière est fortement inhomogène. Ainsi, il est nécessaire de décrire le dépôt d'énergie par unité de longueur, d'où la nécessité de faire appel au TEL. Dans ce but, nous verrons dans un premier temps la formule de Bethe-Bloch en discutant les nombreuses corrections faites depuis sa première description. Par la suite, nous discuterons des limitations du TEL avant d'introduire également les phénomènes qui induisent des difficultés relatives aux expériences sous faisceau d'ions. Les notions d'intégration du TEL, de diffusion ou de fragmentation d'un faisceau de particules dans la matière seront abordées.

1) Formule de Bethe-Bloch

Depuis la découverte des émissions de particules chargées (particules alpha et bêta) issues des matériaux radioactifs, il y a eu un intérêt très fort pour comprendre leur mode d'interaction avec la matière. Marie Curie, en 1900, émet l'hypothèse selon laquelle « les rayons alpha sont des projectiles matériels susceptibles de perdre leur vitesse en traversant la matière ». Par la suite, ce sont les travaux novateurs de Bohr qui déduisent que la principale composante de la perte énergétique des ions dans la matière serait de nature électrostatique en considérant la charge de la particule incidente et les électrons de la cible. C'est vingt ans plus tard, après l'avènement de la mécanique quantique, qu'une avancée majeure de cette description fut faite lorsque Bethe et Bloch reprirent le problème en considérant non plus des paramètres d'impacts de la mécanique classique mais un moment de transfert précis entre la particule et les électrons de la cible. Par la suite, les concepts développés par Bethe et Bloch furent étendus et discutés dans de nombreuses revues en y incluant de nombreuses corrections, principalement pour compenser les effets dus à la perte de vitesse des ions de faible énergie ainsi que pour inclure les effets relativistes des particules de haute énergie (Ahlen, 1980; Ziegler, 1999). Nous allons maintenant voir au travers d'une approche simplifiée les concepts nécessaires à cette étude.

Le pouvoir d'arrêt d'un milieu (S) correspond à l'opposé du TEL d'une particule (dE/dx) et peut s'exprimer suivant l'équation 1-1 en fonction de 4 composantes.

- Un facteur constant regroupant les caractéristiques des électrons : $(4\pi e^4/m_e c^2)$
- Un facteur regroupant les caractéristiques de la particule incidente : la charge effective (Z_{eff}) et de la vitesse relative de la particule (β)
- Un facteur des caractéristiques de la cible : numéro atomique des atomes du milieu cible (Z_m) et de sa densité (ρ_m)
- La dernière composante correspond aux nombres d'arrêts ($L(\beta)$) qui sont de nombreux facteurs de correction, équation 1-1.

$$S = -\frac{dE}{dx} = \left(\frac{4\pi e^4}{m_e c^2}\right) \left(\frac{Z_{\text{eff}}}{\beta}\right)^2 (Z_m \rho_m) L(\beta) \quad (1-1)$$

$$Z_{\text{eff}} = Z \left[1 - \exp\left(\frac{-v}{v_0 Z^{2/3}}\right)\right] \quad (1-2)$$

$$L(\beta) = L_0(\beta) + ZL_1(\beta) + Z^2L_1(\beta) + \dots \approx L_0(\beta) \approx \ln\left(\frac{T_{\text{max}}}{I}\right) - \frac{c}{Z_m} - \frac{\delta}{2} + \text{termes relativistes}(\beta) \quad (1-3)$$

S	Pouvoir d'arrêt
dE/dx	Energie déposée par unité de longueur
$\pi = 3.1415$	Nombre Pi
$e = -1.602 \times 10^{-19} \text{ C}$	Charge d'un électron
$m_e = 9.109 \times 10^{-31} \text{ kg}$	Masse d'un électron
$c = 3 \times 10^8 \text{ m/s}$	Vitesse de la lumière dans le vide
Z_{eff}	Charge effective
Z	Charge de la particule
Z_m	Numéro atomique des atomes de milieu
$\beta = v/c$	Vitesse relative de la particule
V	Vitesse de la particule
$v_0 = e^2/\hbar = 25 \text{ keV/u}$	Vitesse de Bohr (u : unité de mass atomique, $1u = 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$)
ρ_m	Densité du milieu
$T_{\text{max}} = 2m_e c^2 \beta^2$	Transfert d'énergie maximale à un électron (non relativiste)
I	Potentiel d'ionisation du milieu

Équations 1-1, 1-2 et 1-3 : Équation de Bethe-Bloch.

La charge effective évolue en fonction de l'énergie de la particule suivant l'équation 1-2. A haute énergie $Z_{\text{eff}}/Z = 1$, mais pour des faibles vitesses de l'ordre de quelques MeV, la particule peut capter des électrons et se neutraliser partiellement. Bien-sûr, une charge ne peut-être décimale. Cependant, Z_{eff} représente une charge statistique sur un grand nombre de particules. Les nombres d'arrêts $L(\beta)$, comportent un grand nombre de composantes. La totalité de leur influence à haute énergie et plus de 95% de leur influence à faible énergie sont contenues dans le nombre d'arrêt primaire $L_0(\beta)$, aussi appelé facteur de Fano. Ce facteur rend compte du potentiel d'ionisation du milieu (I), du transfert d'énergie aux électrons (T_{max}) et inclut les termes correctifs C/Z_m et $\delta/2$. Le premier corrige le fait que les particules se déplacent bien plus vite que les électrons

constitutifs de la cible et devient important pour les faibles énergies où il peut représenter jusqu'à 10% des pertes d'énergie. Le second représente la densité de la cible corrigée des effets de polarisation. Le reste du facteur $L_0(\beta)$ correspond aux termes relativistes qui sont négligeables pour des énergies inférieures à quelques GeV/u (u : unité de mass atomique, $1u = 1,66 \cdot 10^{-27}$ kg soit un douzième de la masse d'un atome de carbone). De même, les facteurs $L_1(\beta)$ et $L_2(\beta)$ respectivement appelés facteur de correction de Barkas et de Bloch rendent compte de la polarisation du milieu et des interactions à grand paramètre d'impact. Ils sont négligeables pour des énergies supérieures au MeV/u.

Eu égard à l'expression du TEL pour un ion accéléré dans un type de milieu, l'énergie déposée a une dépendance de type $1/\beta^2$, soit l'inverse de la vitesse relative au carré. Par conséquent, le TEL d'une particule augmente quand la vitesse diminue et donc, quand son énergie diminue. De cette manière, plus la vitesse d'une particule diminue, plus son énergie sera déposée de façon dense ce qui la ralentira encore plus. Juste avant l'arrêt de la particule, on arrive alors à l'extrême de ce phénomène pour former les courbes dites en pic de Bragg avec une valeur de TEL très grande. Arrivés à ce pic, les ions sont suffisamment ralentis pour capturer des électrons ce qui fait diminuer leur charge effective Z_{eff} et, ainsi, leurs interactions avec la matière. La deuxième forte dépendance observée pour deux particules dans un même milieu est celle de la charge de l'ion. Une charge plus forte engendre des interactions plus intenses et la particule aura alors un TEL plus grand. Une représentation de ces deux tendances est donnée dans la Figure 1-2.

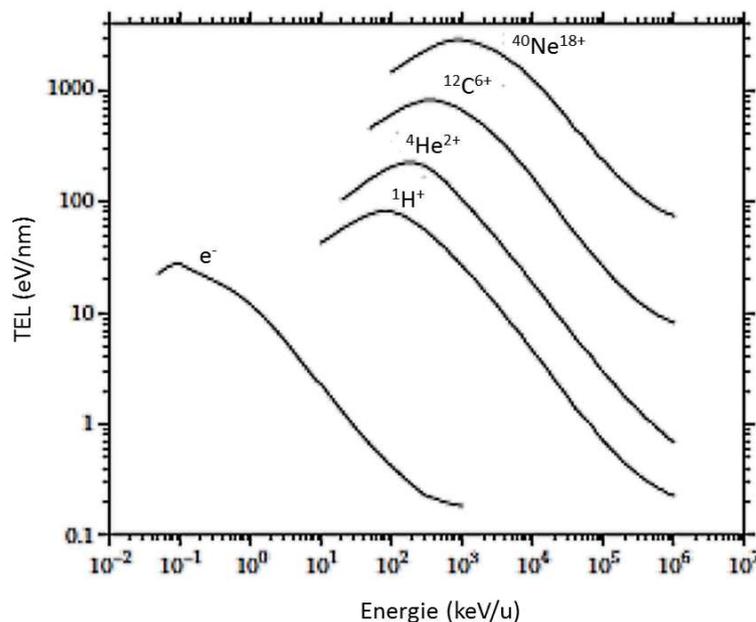


Figure 1-2 : Valeur de TEL de quelques ions et des électrons en fonction de leur énergie.
Figure provenant de (Watt, 1996).

Les rayons X et rayons gamma interagissent majoritairement au travers des électrons secondaires émis. Ainsi, il est souvent admis dans les études de radiolyse que les électrons rapides, les rayons X et les rayons gamma constituent des rayonnements à faible TEL, ceci en opposition aux ions accélérés qui sont des rayonnements à fort TEL. Cette vision est tout de même à relativiser car

un proton de très haute énergie, 200 MeV par exemple, va également avoir un TEL très faible de l'ordre de celui des rayonnements dits à faible TEL. De la même manière, un électron de très faible énergie aura un TEL relativement élevé de l'ordre de celui des ions accélérés.

2) Transfert d'énergie et production d'électrons secondaires

Comme décrit par la formule de Bethe-Bloch, la majeure partie des interactions ions accélérés-matière est de type électrostatique. L'énergie de l'ion est alors transférée aux électrons de la matière et certains électrons vont recevoir une énergie très supérieure à leur énergie d'ionisation. L'électron sera alors éjecté avec une énergie cinétique importante. Certains seront suffisamment énergétiques pour produire des traces secondaires qui vont à leur tour ioniser la matière. Ainsi, il est essentiel d'étudier la production et le devenir de ces électrons secondaires pour pleinement comprendre les processus d'interactions ion-matière. Le nombre d'électrons secondaires créés par unité de volume ainsi que l'énergie cinétique qu'ils possèdent ont été pour la première fois décrits par Bradt et Peters dans le cas d'irradiation d'émulsion photographique par des rayonnements cosmiques (Bradt and Peters, 1948). Il a été montré que l'énergie maximale transférée d'un ion incident à un électron du milieu (T_{max}) pour une particule incidente non relativiste est directement corrélée à l'inverse de la masse de la particule incidente (M) et à son énergie cinétique (E) (Equation 1-4). Cette équation est valable pour un angle de projection de 0° , c'est la limite cinématique pour une collision élastique classique. L'énergie transmise à l'électron sera diminuée selon un facteur cosinus en fonction de l'angle de projection.

$$T_{max} = 2m_e c^2 \beta^2 = 4 \frac{m_e}{M} E \quad (1-4)$$

T_{max}	Energie maximale transférée de la particule à l'électron (non relativiste)
$m_e = 9.109 \times 10^{-31} \text{ kg}$	Masse d'un électron
$c = 3 \times 10^8 \text{ m/s}$	Vitesse de la lumière dans le vide
$\beta = v/c$	Vitesse relative de la particule
v	Vitesse de la particule
M	Masse de la particule
$E = \frac{1}{2} M v^2$	Energie cinétique de la particule

Équation 1-4 : Energie transférée d'une particule accélérée à un électron du milieu.

Ainsi exprimée, l'énergie de la particule en MeV/u est particulièrement intéressante car c'est l'expression de l'énergie normalisée par sa masse, soit son énergie dite par nucléon. Plus l'énergie

de la particule est élevée, plus l'électron émis est énergétique (Tableau 1-2). L'électron émis ionisera à son tour la matière et s'il est suffisamment énergétique, typiquement de plusieurs centaines d'électronvolts, il pourra générer une trace nommée trace secondaire ou rayon δ . Une visualisation de ces traces a été obtenue par modélisation dans de l'eau sous différents ions à TEL constant (Figure 1-3). La longueur des traces secondaires générées augmente avec l'augmentation de l'énergie par unité de masse ce qui reflète l'augmentation de l'énergie des électrons secondaires.

Tableau 1-2 : Exemple d'énergie de transfert en fonction de l'énergie de l'ion incident. Valeurs calculées à partir de l'équation (1-4).

Energie de l'ion incident normalisé par sa masse, E (MeV/u)	Energie de transfert maximum, T_{\max} (keV)
1	2
10	22
50	110
100	220
200	440

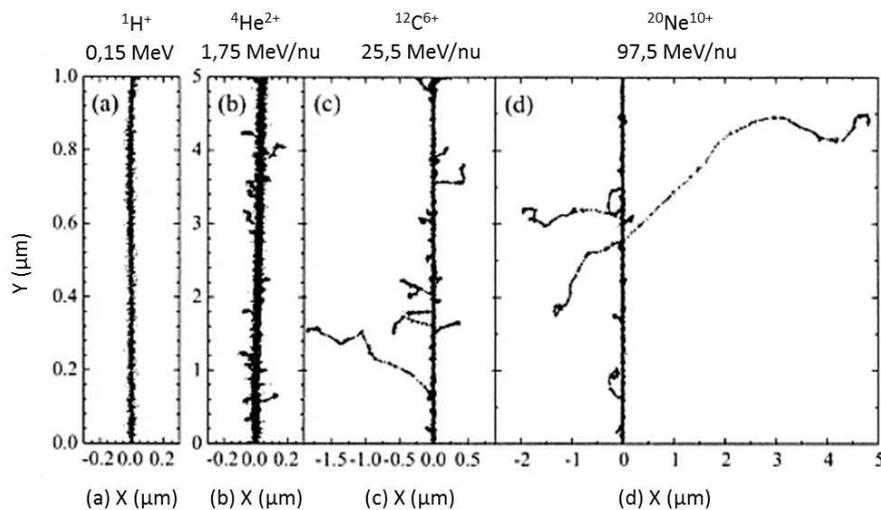


Figure 1-3 : Projection selon l'axe XY de trace ionique calculée (à 10^{-13} s) pour quatre types d'ions à TEL constant. Les ions sont générés à l'origine et suivent l'axe Y dans l'eau liquide dans des conditions de TEL identiques (70 eV/nm). Les points représentent une interaction conduisant à un dépôt d'énergie. Figure obtenue par simulation Monte-Carlo provenant de (Muroya et al., 2006).

On comprend ainsi aisément qu'avec des traces secondaires de plusieurs microns perpendiculaires au passage de l'ion, le TEL ne suffit pas à décrire tous les phénomènes de dépôt d'énergie d'une particule dans un milieu. C'est pourquoi, la notion de dose radiale déposée perpendiculairement à la trace a été introduite pour tenir compte de ces phénomènes. On peut citer notamment les travaux précurseurs de Katz et de son équipe à partir des années 1960 dans le domaine qui ont eu pour but de modéliser cette dose radiale (Butts and Katz, 1967; Katz et al., 1996). Le dépôt de dose radial dans ce modèle est directement proportionnel à la quantité et à l'énergie des électrons secondaires émis et permet de distinguer la dose déposée lors de l'excitation directe de la dose déposée par ces électrons secondaires (Figure 1-4). On note toutefois que la principale composante du dépôt d'énergie reste l'excitation dans le cœur de la trace, jusqu'à quelques nanomètres.

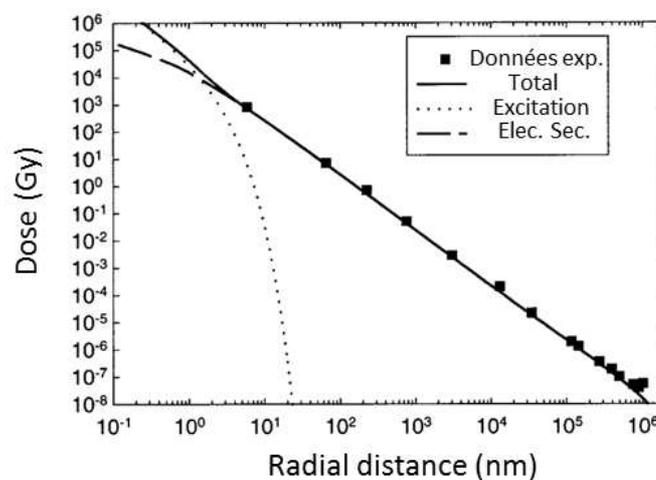


Figure 1-4 : Calcul de la dose radiale déposée dans l'eau selon le modèle de Katz tenant compte de l'excitation directe et de dose déposée par les électrons secondaires. Comparaison à l'expérience pour un faisceau de ^{20}Ne d'énergie 377/u en phase gaz. Figure provenant de (Cucinotta et al., 1998) à partir des données de (Varma and Baum, 1980).

Les électrons secondaires tiennent ainsi un rôle essentiel dans l'ionisation de la matière pour des ions de fortes énergies. Les interactions électron-matière sont régies par des mécanismes d'interactions similaires aux interactions ion-matière. Mais il faut également tenir compte des processus d'émission de rayonnements non négligeables : les rayonnements de freinage qui deviennent importants pour des électrons d'énergie supérieure à 1MeV et des rayonnements Cerenkov peuvent être émis pour des électrons encore plus énergétiques. Des descriptions complètes de ces mécanismes et des équations qui les régissent ont été discutées dans de nombreuses revues et ne seront pas abordées dans ce manuscrit (Seltzer and Berger, 1982).

Au vu de l'influence de la dose radiale, des tentatives ont été faites pour décrire les particules selon d'autres paramètres comme le facteur Z^2/β^2 (Yamashita et al., 2011). ou encore le paramètre MZ^2/E (avec $E = 1/2Mv^2$) (Pimblott and LaVerne, 2002). Avec l'utilisation de ces paramètres, certaines séries de données ont été mieux unifiées qu'avec le TEL, d'autres non. C'est

pourquoi, malgré l'influence de la dose radiale déposée, le TEL reste encore très majoritairement utilisé dans de nombreuses études. En partant de ce constat, par la suite dans ce manuscrit, le paramètre principalement utilisé sera le TEL. Il semble que cette grandeur reste très représentative notamment pour les ions de basses énergies qui seront utilisés, où des électrons secondaires peu énergétiques sont créés. Nous verrons toutefois la limite du TEL, notamment lors d'irradiations avec des particules de très haute énergie.

3) Quantification des dégâts sous faisceau d'ions

a) Le rendement radiolytique

De nombreuses études cherchent à quantifier les dégâts produits lors d'irradiations que ce soit avec des rayonnements à faible TEL ou avec des ions accélérés. L'une des notions les plus couramment utilisées est le rendement radiolytique (G_{esp}) qui est une mesure du nombre d'espèces (N_{esp}) produites ou détruites en fonction de l'énergie déposée dans le milieu (équation 1-5). Cette grandeur sera utilisée dans ce manuscrit pour différencier la production entre plusieurs types de rayonnements. Cependant, la notion d'énergie déposée est assez vague, par la suite nous verrons l'influence du mode de dépôt d'énergie sur les rendements radiolytiques mesurés.

$$G_{\text{esp}} = 100 \frac{N_{\text{esp}}}{E} \quad (1-5)$$

G_{esp}	Rendement radiolytique en esp/100eV (S.I. mol/J : 1 esp/100eV = 0,1038 $\mu\text{mol}/\text{J}$)
N_{esp}	Nombre d'espèces produites par ion (esp/ion)
E	Energie déposée dans le milieu (eV)

Équations 1-5 : Rendement radiolytique.

b) Intégration des pertes d'énergie avec des faisceaux d'ions de faibles énergies

Il a été vu que le TEL d'un ion accéléré varie en fonction de l'énergie de la particule et ainsi, en fonction de la profondeur de pénétration dans la matière. En pratique, il est très difficile de réaliser des mesures à TEL constant. Il est possible de s'en rapprocher lors d'irradiations d'échantillons très fins avec des particules de hautes énergies, mais dans le cas d'échantillons liquides associés à des particules de faibles énergies, il est impossible de travailler à TEL constant. En effet, un proton de 2MeV sera totalement arrêté dans 77 μm d'eau et un carbone de 20MeV parcourra moins de 30 μm . Ainsi, dans ces conditions, la mesure du rendement de production d'un dégât est forcément intégrale, c'est-à-dire qu'il intègre une variation de TEL de la particule. De

ce fait, il est nécessaire de redéfinir la notion de rendement abordée précédemment en fonction du mode de dépôt d'énergie.

- G_{esp} correspond à un rendement intégral, c'est-à-dire intégré sur le parcours d'une particule à TEL variable (équation 1-6).
- G'_{esp} correspond à un rendement différentiel à TEL constant (ou quasi-constant) soit en considérant une perte infinitésimale d'énergie (équation 1-7).

Le rendement différentiel G'_{esp} est bien plus pratique pour la comparaison des données expérimentales car il correspond à une particule à TEL constant et non pas à un TEL moyen. En pratique, il est possible de le recalculer même pour des ions de faibles énergies en multipliant les mesures intégrales à différentes énergies incidentes (Equation 1-8 & Figure 1-5). En effet, l'intégrale des rendements différentiels correspond au nombre d'espèces produites par particule ($N_{\text{esp/ion}}$). De cette manière, en dérivant les courbes de $N_{\text{esp/ion}}$ en fonction de l'énergie initiale de la particule, il est possible d'obtenir les rendements différentiels en espèce de radiolyse. Ce principe sera mis en œuvre lors des mesures avec des ions de faibles énergies par la suite dans ce manuscrit.

$$G_{\text{esp}} = 100 \frac{N_{\text{esp/ion}}}{E_0} \quad (1-6)$$

$$G'_{\text{esp}} = 100 \frac{dN_{\text{esp/ion}}}{dE} \quad (1-7)$$

$$N_{\text{esp}} = \frac{G \cdot E_0}{100} = \frac{1}{100} \int_0^{E_0} G' \cdot dE \quad (1-8)$$

G_{esp}	Rendement intégral (esp/100eV)
G'_{esp}	Rendement différentiel (esp/100eV)
$N_{\text{esp/ion}}$	Nombre d'espèces produites par ion (esp/ion)
E	Energie « instantanée » de l'ion (eV)
E_0	Energie initiale de l'ion (eV)

Équations 1-6, 1-7 et 1-8 : Des rendements intégraux aux rendements différentiels.

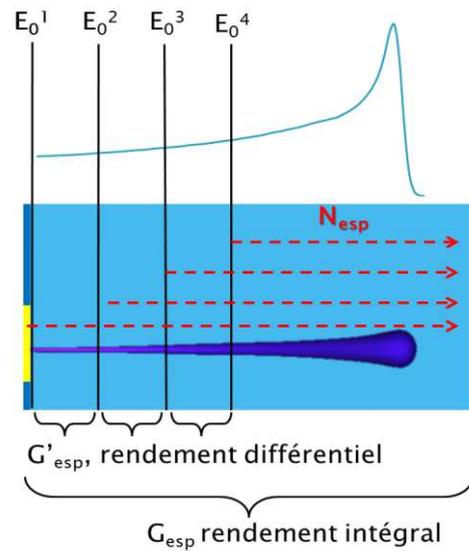


Figure 1-5 : Multiplication des mesures en fonction de l'énergie initiale pour la mesure de rendement différentiel.

c) Diffusions multiples coulombiennes

Si jusqu'à présent le trajet d'une particule dans la matière avait été considéré comme une ligne droite, en traversant un milieu, une particule chargée va subir de nombreuses modifications de

sa trajectoire dans le champ coulombien de la cible. A chaque interaction électrostatique, la trajectoire de la particule incidente sera légèrement défléchie. Ainsi, l'angle de déflexion (θ_0) a été décrit pour la première fois par la théorie des diffusions multiples coulombiennes de Molière (Figure 1-6)(Molière, 1947). Cet angle est dépendant de la cible et de la particule incidente. Plus l'épaisseur de la cible traversée est importante et plus sa densité élevée, plus la diffusion est importante. De même, la diffusion est d'autant plus importante que la charge de la particule soit élevée et que sa vitesse soit faible.

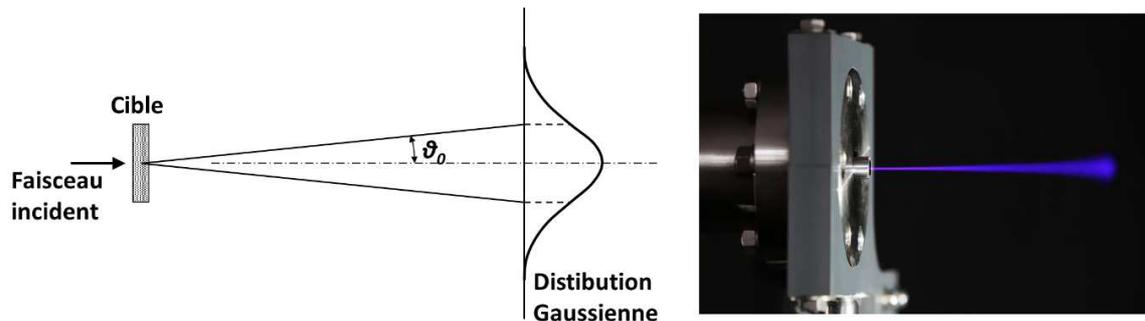


Figure 1-6 : A droite, un schéma représentatif de la distribution angulaire suite à la diffusion coulombienne dans un milieu cible. A gauche, une visualisation de la diffusion d'un faisceau de protons de 2 MeV dans l'air.

De cette diffusion résulte une distribution de type gaussienne des particules dans le milieu. Ainsi, si le milieu traversé est continu, les particules seront totalement arrêtées dans la matière et il est alors possible d'observer un faisceau en forme de « trompette » dû à l'accumulation de la diffusion sur tout le trajet de la particule. Cette diffusion devient très importante en fin de parcours, pour une particule de faible vitesse (Figure 1-6).

d) Chocs nucléaires et fragmentation

Tous les phénomènes décrits jusqu'ici résultent des interactions électrostatiques des ions accélérés avec le milieu cible. La collision des ions avec le noyau est peu probable mais va se produire sur des grandes statistiques. A de faibles énergies, des ions incidents vont subir des chocs élastiques qui peuvent être exploités à des fins d'analyse de matériaux. Ce principe est la base de plusieurs techniques analytiques comme notamment la spectroscopie de rétrodiffusion Rutherford basée sur la diffusion en arrière des ions après un choc élastique. Avec des particules de hautes énergies, quand de tels chocs se produisent, ils conduisent à la fragmentation des ions incidents et de la cible. En effet, il a été observé dans le cas d'un faisceau d'ions carbone thérapeutique de 200 MeV/u que 30% des ions incidents vont subir des interactions nucléaires et n'atteindront pas le pic de Bragg sous leur forme native. Ainsi, des fragments de numéro atomique plus faible seront formés. Par exemple, Golovkov et al. ont observé principalement la formation de fragment de type hydrogène ou hélium à partir d'un faisceau de carbone de 270 MeV/u dans l'eau (Figure

1-7)(Golovkov et al., 1997). La production d'ions plus légers et plus pénétrants conduit généralement à un dépôt d'énergie au-delà du pic de Bragg. Ces phénomènes peuvent être modélisés suivant des lois statistiques. (Goldhaber, 1974; Goldhaber and Heckman, 1978)

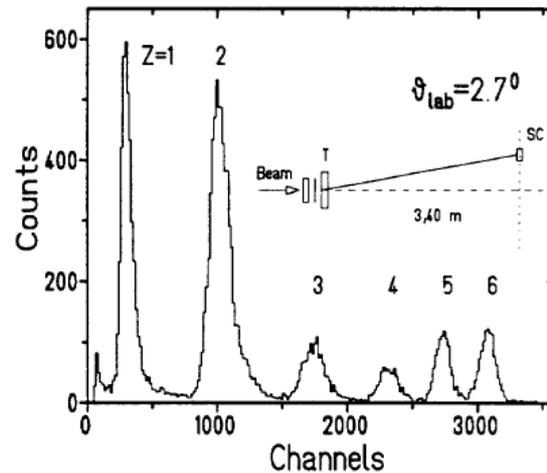


Figure 1-7 : Spectre de perte d'énergie obtenu avec un scintillateur positionné à un angle de $2,7^\circ$ depuis la traversée d'une cible d'eau par un faisceau d'ions carbone de 270 MeV/u ($Z=6$).
Figure provenant de (Golovkov et al., 1997).

En pratique, pour une expérience de radiolyse, on peut s'affranchir de ces phénomènes et utiliser des faisceaux « natifs » en irradiant une faible épaisseur d'échantillon. A l'inverse, l'utilisation de masque avant un échantillon peut permettre de générer ces fragments pour comprendre l'effet d'un faisceau thérapeutique réel.

4) Outils de calcul

Comme décrits dans cette partie, tous les modèles d'interaction ion-matière ont beaucoup évolué au cours des dernières décennies. L'avènement de l'ère numérique permet aujourd'hui de concentrer ces modèles complexes dans des outils informatiques performants permettant de décrire précisément ces phénomènes.

Pour des estimations simples et rapides du pouvoir d'arrêt d'un milieu ou du TEL d'une particule, le logiciel SRIM (the Stopping and Range of Ions in Matter) est un outil de choix. Il a été utilisé lors des expériences présentées dans ce manuscrit pour le calcul des pertes d'énergie dans les différentes membranes ou l'estimation de l'énergie des ions dans nos échantillons (Ziegler et al., 2010). Ce logiciel nous renseigne également sur la géométrie du faisceau et il est possible d'en tirer des informations sur la diffusion dans les milieux de référence.

Quand il s'agit de réaliser la modélisation d'une expérience complète d'irradiation, il est nécessaire de se tourner vers des programmes beaucoup plus complexes. Dans le cadre de la radiolyse de

l'eau, on peut citer l'utilisation des codes de type Monte Carlo comme l'adaptation du programme Geant4-DNA (Cobut et al., 1998; Frongillo et al., 1998; Incerti et al., 2016). Ce dernier permet, par exemple, de calculer les rendements d'espèces de radiolyse en y intégrant des données expérimentales. Il trouve également de nombreuses autres applications, notamment dans la dosimétrie ou encore la radiobiologie.

II. Radiolyse de l'eau

Dans les thématiques de radiobiologie, l'eau est une composante essentielle car elle est omniprésente dans le vivant, elle est la principale composante du corps humain. Ainsi, lors du processus d'irradiation, elle va recevoir une grande partie de l'énergie déposée par le rayonnement ionisant. Ce dépôt d'énergie intense est responsable de la radiolyse de l'eau. Eu égard au mouvement de diffusion possible dans la solution, le passage d'un rayonnement ionisant va initier une chimie bien particulière et inhomogène qui a pour but le retour à l'équilibre après l'apport en énergie massif du rayonnement ionisant. Dans un premier temps, nous allons voir les étapes physique et physicochimique de la radiolyse de l'eau avant de décrire cette chimie. Sa dépendance au temps sera explicitée et la radiolyse de l'eau sous faisceau d'ions sera décrite plus spécifiquement au travers des effets de TEL. Pour finir, les principaux acteurs de la radiolyse de l'eau en solution aérée ou oxygénée seront décrits plus particulièrement.

A. Evolution temporelle de la radiolyse de l'eau

1) L'étape physique

La première étape du processus de radiolyse de l'eau est le dépôt d'énergie du rayonnement ionisant dans l'eau. Nous avons vu précédemment que la plupart des interactions des rayonnements avec la matière sont de nature électrostatique et résultent d'interactions avec les électrons du milieu. Ces processus se produisent en moins de 10^{-16} s ce qui est trop rapide pour tout phénomène de diffusion ou de mouvement moléculaire, uniquement des processus électroniques sont possibles. Ainsi, le transfert d'énergie du rayonnement aux électrons de l'eau va conduire à l'excitation ou l'ionisation de nombreuses molécules directement à proximité du rayonnement donc suivant sa trajectoire. Ces molécules sont respectivement notées H_2O^* et $H_2O^{\bullet+}$ et sont produites suivant les équations (1-9) et (1-10). Lors de l'ionisation d'une molécule d'eau, un électron est arraché. Si suffisamment d'énergie a été transmise à cet électron, il va alors conduire à la formation de sa propre trace.



Équations 1-9 et 1-10 : Réaction de l'étape physique de la radiolyse de l'eau sous effet d'un rayonnement ionisant (RI). (Spinks and Woods, 1990).

Comme énoncé précédemment dans la description des aspects physiques d'une particule chargée, le dépôt d'énergie n'est pas continu mais stochastique. Il est fortement inhomogène à l'échelle du nanomètre dû à l'aspect aléatoire des interactions. Différentes entités constituant la trace initiale de l'ion sont distinguées (Mozumder and Magee, 1966) :

- Lors d'un transfert d'énergie faible à un électron, d'une énergie moyenne de l'ordre de 60 eV, l'électron secondaire aura un parcours très réduit et déposera son énergie dans une zone restreinte appelée grappe. Cette grappe regroupe les molécules d'eau excitées et ionisées formées dans un espace de l'ordre de 2 à 3 nm de diamètre, typiquement chaque grappe contient 3 à 5 molécules d'eau excitées et 3 à 5 molécules d'eau ionisées avec les électrons associés.
- Une perte d'énergie supérieure, de l'ordre de 100 à 500 eV conduira à la formation d'un essaim qui regroupe plusieurs grappes spatialement rapprochées.

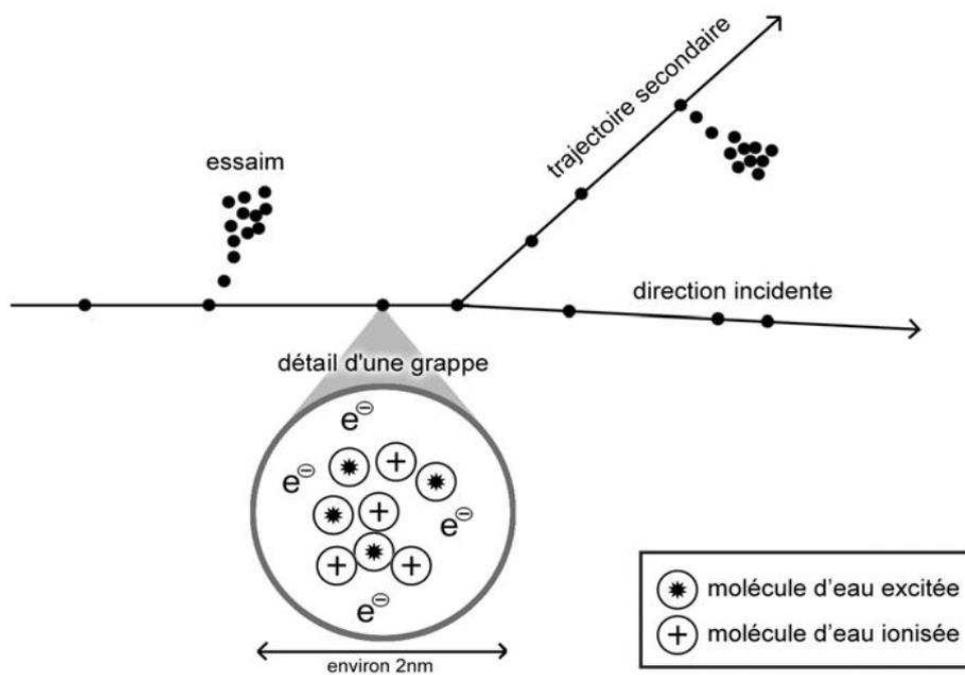


Figure 1-8 : Représentation schématique d'une structure de trace suivant le passage d'un rayonnement ionisant dans l'eau. Figure provenant de (Saffré, 2011) reprenant les concepts de (Mozumder and Magee, 1966).

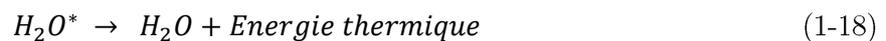
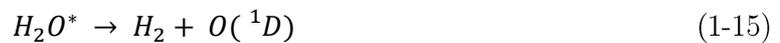
- Pour un transfert d'énergie supérieur à 500eV, un électron secondaire énergétique sera émis, ce qui conduit à la formation d'une trace secondaire régie par les mêmes interactions.

Un schéma permettant la visualisation de ces entités constitutives de la trace d'un rayonnement en milieu aqueux est proposé dans la Figure 1-8. Le parallèle peut être fait avec la Figure 1-3, adaptée d'une modélisation des interactions correspondant au dépôt d'énergie lors de la projection de différents types d'ions dans l'eau.

2) L'étape physicochimique

L'étape physicochimique mène à l'équilibre thermique du système après l'apport d'énergie massif lors de l'étape physique. Ainsi, les espèces très énergétiques et/ou très instables produites vont se désexciter ou se scinder. Ces processus se réalisent en environ 10^{-12} s.

Un électron éjecté lors de l'étape physique s'éloigne de l'ion parent en transférant son énergie au milieu pour arriver éventuellement à atteindre l'équilibre thermique. En ralentissant lors de son parcours dans la matière, les interactions de l'électron évoluent jusqu'à sa thermalisation à une énergie cinétique inférieure à 0,025 eV pour $T=25^\circ\text{C}$ (e_{th}^-). A ce stade, il peut être complètement arrêté puis solvaté par les molécules d'eau pour conduire à la formation d'électrons aqueux (e_{aq}^-), équation 1-11. L'électron éjecté peut encore être capturé par une molécule d'eau pour former un anion intermédiaire très réactif qui va rapidement se dissocier en radical hydroxyle et en ion hydrure très instable qui réagit suivant l'équation 1-12.



Équations 1-11 à 1-19 : Réactions principales de l'étape physicochimique. (Spinks and Woods, 1990).

La désexcitation de la molécule d'eau H_2O^* est une compétition entre plusieurs voies de dissociation et de désexcitation. D'une part, cette molécule peut se dissocier pour engendrer la production de radicaux HO^\bullet et H^\bullet selon l'équation 1-14 ou la production d'oxygène singulet $\text{O}(^1\text{D})$ (équation 1-15). Ce dernier réagira rapidement avec une molécule d'eau suivant les équations 1-16 et 1-17. L'équation 1-18 correspond à une relaxation thermique par vibration. Un autre mécanisme de dissociation a été avancé dans certaines études qui conduit à la formation d'oxygène triplet $\text{O}(^3\text{P})$ mais cette voie réactionnelle est peu observée et négligeable à partir de H_2O^* (Meesungnoen and Jay-Gerin, 2011).

L'ion H_2O^+ intermédiaire réalise quant à lui un transfert de protons avec les molécules d'eau voisines pour conduire à la formation du radical hydroxyle et de l'ion hydronium H_3O^+ suivant l'équation 1-19. Cette voie est responsable de la majeure partie de la formation de radical hydroxyle.

3) L'étape de chimie non homogène.

Jusqu'à ce stade, tous les processus décrits ont eu lieu dans une zone très localisée correspondant aux grappes sur la trace de l'ion ou des électrons secondaires émis. Une trace mesure à ce stade quelques nanomètres de diamètre. Les espèces créées sont alors en concentration locale très forte et la solution est fortement inhomogène. L'étape de chimie non homogène conduit alors à l'équilibre chimique du système et intervient de 10^{-12}s à 10^{-6}s après le passage du rayonnement. Dans ce laps de temps, se tient une compétition entre diffusion des espèces de radiolyse, pour échapper à la trace, et une réaction entre ces espèces qui est favorisée par leur proximité. La Figure 1-9 propose une visualisation du devenir des HO^\bullet et des e_{aq}^- au cours du temps obtenus par simulation. Les principales réactions considérées pour la radiolyse de l'eau à pH neutre sont décrites suivant les équations 1-20 à 1-26, elles sont limitées par la diffusion ($k \sim 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

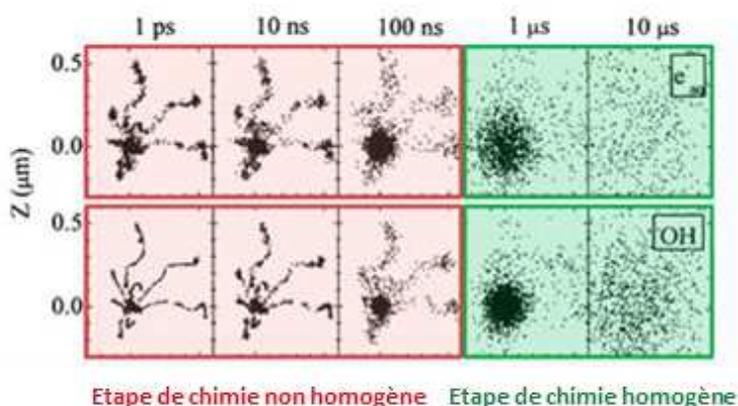
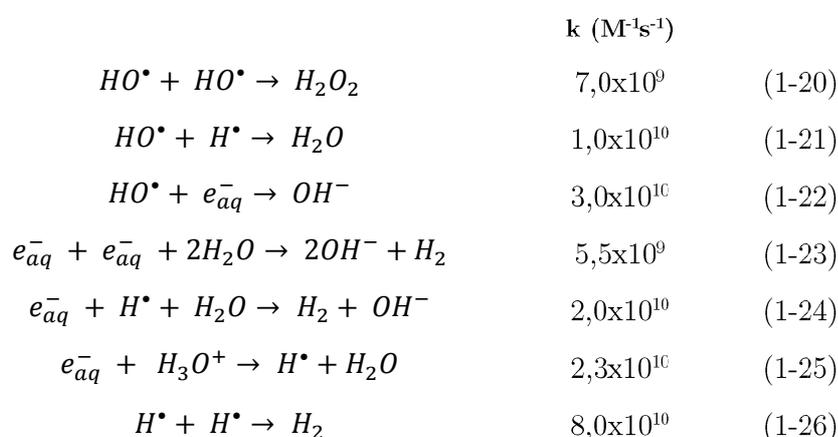


Figure 1-9 : Visualisation du comportement des espèces produites suite à la radiolyse de l'eau lors des étapes de chimie non homogène et homogène. Image obtenue par simulation Monte-Carlo pour une coupe transversale de la trace d'un ion $^4\text{He}^{2+}$ dans l'eau. Figure adaptée d'après (Muroya et al., 2006).

A ce niveau, les principaux acteurs chimiques de la radiolyse de l'eau peuvent être identifiés. Pour caractériser leur évolution, on utilise généralement la notion de rendement radiolytique décrit précédemment par l'équation 1-5 et correspondant à un nombre d'espèces produites par unité d'énergie. Deux types de produits sont distingués en fonction de leur évolution :

- Les espèces radicalaires produites lors de l'étape physicochimique HO^\bullet , e_{aq}^- et H^\bullet . Elles ont des rendements radiolytiques décroissants au cours du temps, dû aux nombreuses réactions dans lesquelles elles sont impliquées (équation 1-20 à 1-26).
- Les espèces moléculaires stables de la radiolyse de l'eau qui sont produites lors de cette étape : H_2O_2 , H_2 . Leur rendement augmente donc avec le temps. On note également la reformation de l'eau ou des ions HO^- et H_3O^+ associés.



Équations 1-20 à 1-26 : Principales réactions de l'étape de chimie inhomogène à pH neutre. (Spinks and Woods, 1990). Constantes cinétiques : (Buxton et al., 1988).

Une visualisation de l'évolution de ces espèces est proposée par la Figure 1-10 comprenant des mesures expérimentales, principalement par radiolyse pulsée et de la simulation Monte-Carlo, la simulation permettant de visualiser efficacement le devenir des espèces sur une large gamme de temps. On note que peu de données expérimentales sont présentes pour la décroissance de HO^\bullet , car sa mesure directe est plus difficile. Une quantification par capture est souvent préférée dans ce cas, comme nous le verrons dans le chapitre 3 dédié à son étude. Les effets d'énergie du rayonnement qui peuvent être observés sur ces graphiques seront discutés par la suite dans la section sur les effets de TEL sur la radiolyse de l'eau. Après relaxation chimique du système vers la microseconde à la fin de cette étape, c'est le début de l'étape de chimie homogène qui est régi par les mécanismes de chimie conventionnelle. Toutes les espèces de radiolyse de l'eau ayant échappé à la trace sont alors susceptibles de réagir entre elles ou avec tous les composés présents en solution. Leur profil de concentration en solution continue à évoluer.

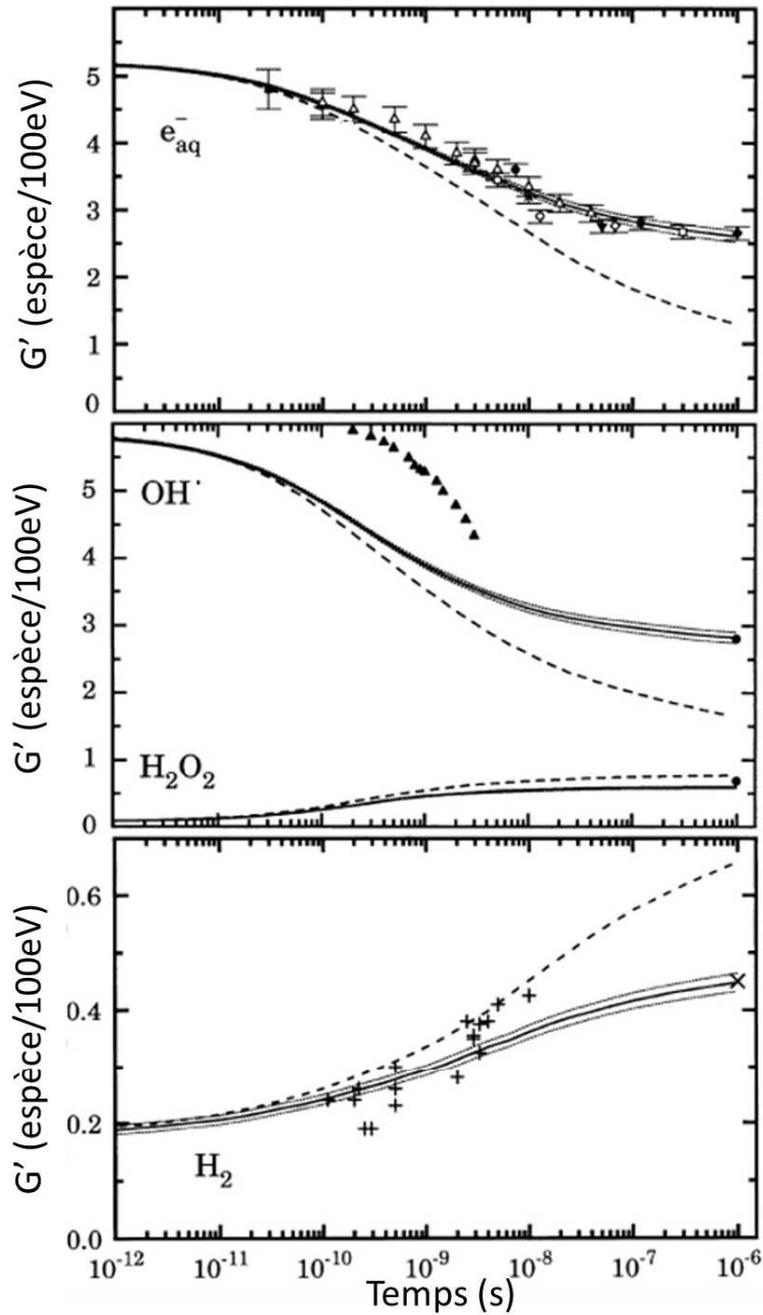


Figure 1-10 : Evolution des rendements différentiels de production de e_{aq}^- , $HO\cdot$, H_2O_2 et H_2 en fonction du temps pour des rayonnements à faible TEL. Pour e_{aq}^- : (*) (Thomas and Bensasson, 1967), électron de 3 MeV ; (●) (Buxton, 1972), électron 2,9 MeV ; (Δ) (Jonah et al., 1973), électron 19 MeV ; (▲) (Jonah et al., 1976), électron 20-22MeV ; (■) (Sumiyoshi and Katayama, 1982), électron 45 MeV ; (□) (Shiraishi et al., 1988), électron 35 MeV ; (○) (Shiraishi et al., 1989), gamma ^{60}Co ; (◆, ◇) (Elliot et al., 1993), 23 MeV $^2H^+$ et 157 MeV $^7Li^{3+}$; (▼) (Sunaryo et al., 1994), gamma ^{60}Co . Pour $HO\cdot$: (▲), (Jonah et al., 1976), électron 20-22MeV ; (●) (Elliot et al., 1993) gamma ^{60}Co . Pour H_2O_2 : (●) (Elliot et al., 1993), gamma ^{60}Co . Pour H_2 : (X)(Buxton et al., 1988) ; (+), (Draganic and Draganic, 1973), gamma ^{60}Co . Monte-Carlo de proton de 300 MeV (trait plein) et proton de 5 MeV (trait pointillé), (Frongillo et al., 1998)

Figure adaptée d'après cette dernière référence.

B. Effets de TEL du rayonnement sur la radiolyse de l'eau

1) Influence de la densité de dépôt d'énergie

Il a été vu précédemment que les espèces initiant la radiolyse de l'eau sont créées dans des grappes de l'ordre de 3nm de diamètre le long du passage de l'ion, Figure 1-8. Ainsi, à très faible densité de dépôt d'énergie caractérisée par de très faibles TEL, les grappes n'interagissent pas entre elles car elles sont trop éloignées et aucun effet de TEL n'est observé. En effet, un dépôt d'énergie moyen de 60eV conduit à la production d'une grappe et les réactions intra-grappes sont complètement terminées après 100ns. En considérant le coefficient de diffusion d'une molécule d'eau, $2\text{nm}^2/\text{ns}$ et celui de l'ion H_3O^+ , $9\text{nm}^2/\text{ns}$, on peut attendre une diffusion de l'ordre de 16 à 34 nm. Ainsi, des grappes distantes de plus de 40 nm ne devraient avoir aucune interaction. $60\text{eV}/40\text{nm} = 1,5 \text{ eV}/\text{nm}$ ce qui correspond à un TEL limite attendu (Yamashita et al., 2011). En pratique, il est difficile d'observer un TEL limite très défini mais on observe bien des modifications importantes sur la production des espèces de radiolyse dans cette zone de TEL. En effet, la Figure 1-11 représente les rendements différentiels de production des espèces e_{aq}^- , HO^\bullet , H_2O_2 et H_2 lors de la radiolyse de l'eau en fonction du TEL du rayonnement.

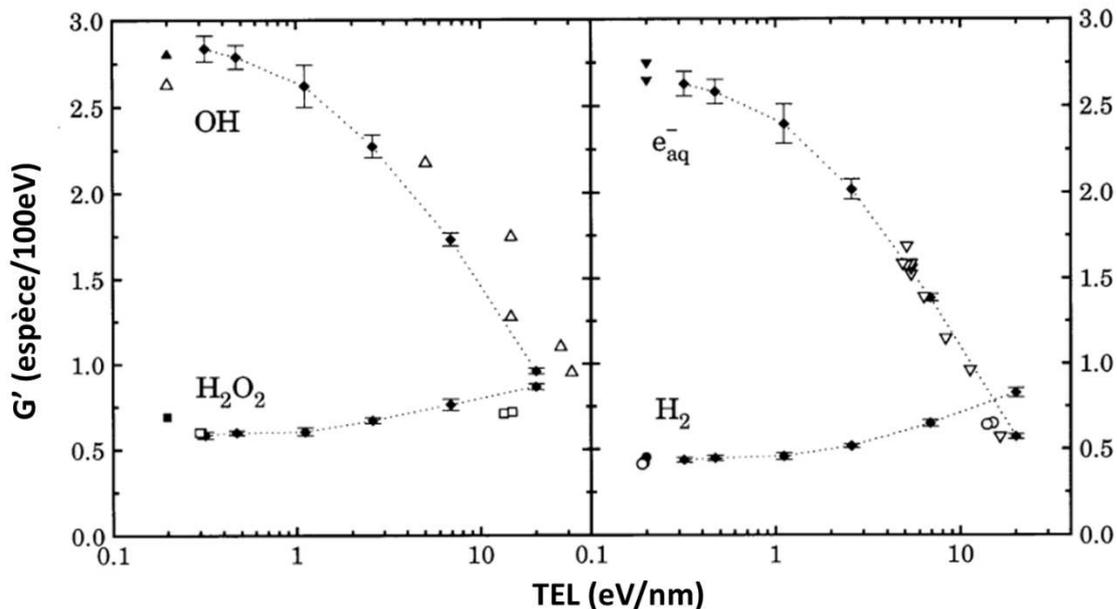


Figure 1-11: Evolution des rendements différentiels de production de e_{aq}^- , HO^\bullet , H_2O_2 et H_2 en fonction du TEL à un temps de 10^{-6}s . Données expérimentales : $^2\text{H}^+$ et $^4\text{He}^{2+}$, ∇ pour e_{aq}^- (Sauer et al., 1977) ; gamma ^{60}Co , H^+ et He^{2+} , Δ pour HO^\bullet , \square pour H_2O_2 , \circ pour H_2 (Burns and Sims, 1981) ; gamma ^{60}Co , \blacktriangle pour HO^\bullet , \blacksquare pour H_2O_2 , \blacktriangledown pour e_{aq}^- , \bullet pour H_2 , (Elliot et al., 1993). Simulations Monte Carlo (\circ , \diamond) (Frongillo et al., 1998). Figure adaptée d'après dernière référence.

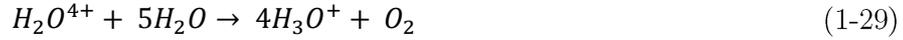
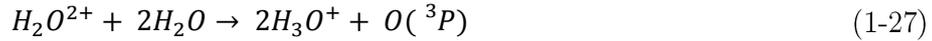
On retrouve bien cette valeur limite de TEL de l'ordre de 1,5 eV/nm, avant laquelle les rendements des espèces de la radiolyse de l'eau varient faiblement et après laquelle ils évoluent avec le TEL. En effet, une diminution des espèces radicalaires e_{aq}^- , HO^\bullet est observée à fort TEL. Cette diminution concorde avec la proximité accrue de ces composés lors du rapprochement de grappes qui va favoriser les réactions inter-radicalaires des équations 1-20 à 1-26. Dans une même logique, les produits moléculaires issus de ces réactions : H_2O_2 et H_2 voient leur rendement augmenter après cette valeur limite de TEL. Des comportements similaires sont également observés dans la Figure 1-10 pour des protons modélisés à 300 MeV et à 5 MeV, le TEL étant inversement proportionnel à l'énergie. Ces évolutions, en fonction du TEL, sont bien admises dans la communauté scientifique et ont été mises en évidence par de nombreuses autres études (Yamashita et al., 2011). On peut également citer les travaux de Laverne qui a discuté d'une valeur limite de TEL proche de 3 eV/nm (LaVerne, 2000).

2) Hypothèse de l'ionisation multiple et production de O_2 et de $HO_2^\bullet/O_2^{\bullet-}$ primaire à fort TEL

Nous arrivons maintenant à une partie plus controversée des effets de TEL sur la radiolyse de l'eau. A l'échelle biologique, il a été observé des efficacités relatives des rayonnements à fort TEL bien meilleures dues en partie au fait que les dépendances à l'oxygène pour les dégâts observés avec des rayonnements à faible TEL deviennent négligeables à fort TEL (Weyrather and Kraft, 2004). Une hypothèse à ces observations est la production directe de dioxygène dans la trace des ions à fort TEL qui résulterait d'ionisations multiples de molécule d'eau lors de l'étape physique de la radiolyse de l'eau. Cette production de dioxygène irait de pair avec la formation de radical superoxyde primaire ($HO_2^\bullet/O_2^{\bullet-}$, pka 4,8, (Bielski and Arudi, 1983)). Les mécanismes d'ionisations multiples ont été mis en évidence pour la première fois en phase gaz, avec la production de Ne^{2+} lors d'irradiation de néon avec des protons de faibles énergies (Manson et al., 1983). Ils ont par la suite été étudiés de nombreuses fois dans des systèmes gazeux, y compris en présence de vapeurs d'eau. Cependant, peu d'études ont été réalisées en phase condensée dû aux difficultés expérimentales. C'est pourquoi, cette partie sera basée uniquement sur des études de modélisation de ces systèmes.

Les phénomènes d'ionisation multiples des molécules d'eau conduiraient à la formation des ions di, tri et quadri chargés très réactifs à l'eau (réaction 1-28 à 1-30). H_2O^{3-} et H_2O^{4+} conduiraient à la formation respective de HO_2^\bullet et O_2 . Cependant, ils seraient moins susceptibles d'être produits que l'ion dichargé H_2O^{2+} , ce dernier pouvant toutefois être impliqué dans la formation du dioxygène ou du radical superoxyde via la formation de l'oxygène triplet $O(^3P)$. Cette forme de l'oxygène réagit suivant des réactions inter-radicalaires pour former $HO_2^\bullet/O_2^{\bullet-}$ et O_2 selon les équations 1-29 à 1-32.

k (M⁻¹s⁻¹)



Équations 1-27 à 1-32 : Réactions pouvant conduire à la production de O₂ et de HO₂[•]/O₂^{•-} primaire (Meesungnoen and Jay-Gerin, 2011).

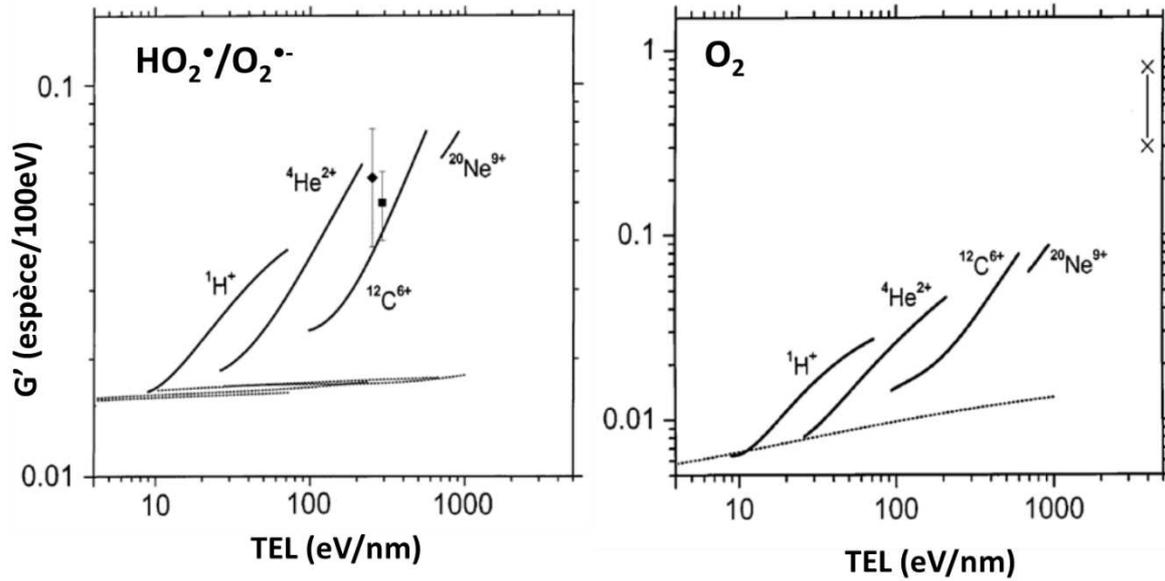


Figure 1-12 : Rendement différentiel de production du radical superoxyde (HO₂[•]/O₂^{•-}) et du dioxygène (O₂) primaire en fonction du TEL lors de la radiolyse de l'eau. Les rendements sont calculés à un temps statistique de 10⁻⁶ s. Mesures expérimentales : (◆) ³⁶S¹⁶⁺, 77MeV/u (Baldacchino et al., 1998) ; (■) ⁴⁰Ar¹⁸⁺, 70MeV/u (Baldacchino et al., 1998) ; (X-X) Intervalle de confiance estimé avec des produits de fission du ²⁵²Cf (Bibler, 1975) ; Les courbes pleines sont des modélisations considérant les phénomènes d'ionisation multiples et les courbes pointillées ne les considèrent pas. (Meesungnoen and Jay-Gerin, 2005) figure adaptée d'après cette dernière référence.

Les équations 1-27 à 1-32 ont été introduites dans le code IONLYS-IRT, ce qui a permis de simuler la production d'oxygène et de l'ion superoxyde en fonction du TEL. En l'absence des processus de multi-ionisation, une faible quantité de ces produits est calculée en milieu désoxygéné, mais elle augmente fortement en fonction du TEL en considérant ces phénomènes

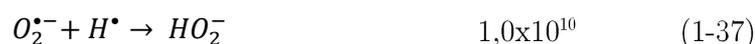
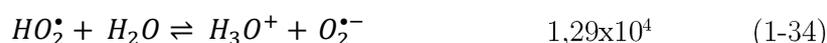
(Figure 1-12). Les résultats obtenus appuient une surproduction de ces espèces à fort TEL, mais ces hypothèses restent controversées en raison des faibles quantités de données expérimentales disponibles à ce sujet et à d'autres modes de production possibles. En effet, une addition des radicaux HO• sur l'eau oxygénée conduit à la production de HO₂• espèces et est cohérente avec la dépendance au TEL observé. (Meesungnoen and Jay-Gerin, 2011)

C. Radiolyse de solution diluée en milieu aéré

Dans cette dernière partie, sera introduit un aspect plus pratique de la radiolyse de l'eau utilisé dans ce manuscrit. En effet, les irradiations sont réalisées en milieu aéré et nous verrons que l'oxygène dissous en solution capte l'électron hydraté et l'atome d'hydrogène pour laisser comme principale source de dégâts au soluté le radical hydroxyle, toutefois le radical superoxyde et l'eau oxygénée sont également présents en solution et capables d'interagir avec le soluté.

1) Influence de l'oxygène sur la radiolyse de l'eau

En milieu oxygéné ou aéré, l'atome d'hydrogène et l'électron aqueux sont efficacement captés par le dioxygène dissous en solution (C= 0,25 mM) suivant les équations 1-33 et 1-34 pour former le couple radicalaire superoxyde HO₂•/O₂•⁻. Le couple créé a un pKa de 4,8 ce qui implique un équilibre déplacé vers O₂•⁻ à pH naturel, réaction 1-34 (Bielski and Arudi, 1983). Le temps statistique pour ces réactions étant de l'ordre de 200ns, le radical superoxyde sera produit lors de la phase de chimie non homogène et pourra interagir avec les autres espèces de la radiolyse de l'eau suivant les réactions 1-32 et de 1-36 à 1-38. Ces équations sont bien sûr favorisées à fort TEL, où les espèces radicalaires seront plus à même de réagir en raison de leur proximité de leur formation.



Équations 1-33 à 1-38 : Réactions associées à la capture de l'électron hydraté et de l'atome d'hydrogène par le dioxygène lors de la radiolyse de l'eau. (Bielski and Arudi, 1983; Spinks and Woods, 1990).

2) Les espèces d'intérêt de la radiolyse de l'eau en milieu oxygéné

La présence de soluté faiblement concentré ne perturbe pas les premières étapes de la radiolyse de l'eau comme l'eau reste largement majoritaire (55,5 M). En revanche, les espèces issues de la radiolyse de l'eau vont réagir avec le soluté durant les étapes de chimie homogène ou non homogène en fonction des constantes de réaction associées. En milieu oxygéné, on peut généralement négliger l'action de l'électron hydraté et de l'atome d'hydrogène sur le soluté. Il faut toutefois veiller à ce que, d'après les constantes cinétiques associées, l'oxygène capte plus efficacement ces espèces que le soluté. Ainsi, parmi les espèces restantes capables d'interagir avec le soluté on retrouve : $\text{HO}\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 . Ces trois espèces font partie des espèces oxygénées réactives (ROS) responsables du stress oxydant en biologie. Ces espèces ont toutefois des propriétés ou des réactivités bien différentes qui seront décrites plus en avant dans les parties à venir. Pour comprendre leur réactivité, une base de données très complète est tenue par le « Notre Dame Radiation Laboratory » qui décrit de nombreuses réactions de cette espèce avec des solutés (“NDRL/NIST Solution Kinetics Database,”).

a) Le radical hydroxyle $\text{HO}\cdot$

Le radical hydroxyle est l'espèce la plus oxydante produite par la radiolyse de l'eau. Ses réactions ont été mises en évidence avec près de 2000 composés en milieu aqueux. Ces réactions sont limitées par la diffusion et peuvent correspondre à des additions du radical sur des insaturations, à la capture d'un atome d'hydrogène ou encore conduire à une oxydation (Buxton et al., 1988; “NDRL/NIST Solution Kinetics Database,”) En pratique, en plus des réactions inter-radicalaires, tous les radicaux survivant réagissent avec les espèces présentes en solution et dans un temps très court, le plus souvent durant la phase de chimie non homogène. Ceci lui confère une forte toxicité in vivo. Ces réactions sont également la base du principe de la capture qui permet, en variant la concentration d'un soluté en solution, de revenir à différents temps statistiques de réaction avec le radical hydroxyle. Ces notions seront abordées plus en détails dans le chapitre 3 dédié à la quantification du radical hydroxyle.

b) Le radical superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$

Le radical superoxyde est un puissant réducteur et est considéré comme responsable du stress oxydant car il peut générer le radical hydroxyle selon les réactions de Haber-Weiss en présence d'ions fer(III) dans le vivant (équation 1-39 & 1-40).



Équations 1-39 à 1-40 : Réactions d'Haber-Weiss conduisant à la production de radical hydroxyle à partir du radical superoxyde et de peroxyde d'hydrogène en présence d'ion fer(III) (Haber and Weiss, 1932).

Ces réactions consistent en la réduction du fer par le radical superoxyde suivie de la réaction de Fenton conduisant à la production de radical hydroxyle à partir de peroxyde d'hydrogène. C'est pourquoi, l'organisme produit une enzyme, la superoxyde dismutase, capable de neutraliser cette espèce. Ceci implique une durée de vie plus longue que son homologue, le radical hydroxyle. En effet, il réagit très fortement avec les autres espèces radicalaires et se dismute suivant l'équation 1-38 dépendante du pH mais sera moins réactif aux autres solutés présents. A pH 7, il aura une durée de vie de l'ordre de la milliseconde contre plusieurs heures à pH 14 (Bielski and Arudi, 1983). En pratique, cela fait de lui un radical à temps de vie intermédiaire pouvant réagir en dehors de la trace d'un rayonnement.

c) L'eau oxygénée H₂O₂

L'eau oxygénée est bien moins réactive que le superoxyde et le radical hydroxyle mais, comme vu précédemment, elle peut être convertie en radical hydroxyle selon la réaction de Fenton (équation 1-40). Elle a également un pouvoir oxydant et est produite en quantité non négligeable durant la radiolyse d'autant plus qu'elle s'accumule en raison de sa stabilité. Ainsi, lors d'expériences de radiolyse, il est bon de s'assurer de son effet sur les solutés ou sur les produits de radiolyse au travers de la réalisation de blanc.

III. La radiobiologie moléculaire

Suite à l'exposition accidentelle ou provoquée du corps humain aux rayonnements ionisants, des effets radio-induits plus ou moins sévères apparaissent dans les heures, les jours ou les années qui suivent. Lors d'une exposition accidentelle, ces effets peuvent se caractériser comme des irritations, des nécroses de certaines parties du corps, des cancers radio-induits résultant de mutations cellulaires et dans les cas les plus sévères, l'exposition peut causer la mort. Ces effets biologiques sont directement liés au devenir des unités de base du vivant, les cellules. L'apport

d'énergie intense et localisé des rayonnements ionisants et plus particulièrement des ions accélérés, va fortement déstabiliser la cellule et la conduire éventuellement à sa mort. Dans d'autres cas, la cellule peut être réparée ou bien, va subir des mutations. Tous ces phénomènes sont fortement liés à la composition de la cellule et aux macromolécules qui assurent les fonctions de celle-ci. La cellule est une unité très complexe où il est difficile d'entrevoir le rôle individuel de chaque macromolécule. Cependant, acquérir des données sur la radiolyse de ces principales composantes reste un objectif prioritaire qui est la raison d'être de la radiobiologie moléculaire. Ainsi, dans cette section, seront abordés dans un premier temps, les principaux effets de la radiolyse sur les cellules et la manière de les quantifier. Par la suite, le détail de la composition d'une cellule sera explicité afin d'identifier les acteurs majeurs de la cellule sous radiolyse. Nous verrons ainsi l'importance et les devenir sous irradiation de l'ADN mais aussi des protéines, une des principales cibles des rayonnements ionisants. Une description plus complète de la nature des protéines et de leur devenir sous irradiation sera alors réalisée dans la section suivante.

A. Phénomènes de radiolyse à l'échelle cellulaire

1) Ancien modèle ADN-centrique

Une des observables essentielles du devenir d'une cellule sous irradiation est la dégradation de son l'ADN. Une multitude de dégâts peuvent être créés comme des ruptures simple brin, double brin, du cross-linking ADN-ADN, ADN-protéines ou encore des modifications chimiques de ses bases azotées. Parmi ces dégâts, les plus sévères sont les ruptures double brin qui sont généralement irréparables ou les lésions clusters qui correspondent à plusieurs dégâts dans une zone localisée. Ces deux types de dégâts sont favorisés avec les ions accélérés comportant de fortes densités de dépôt d'énergie. De tels dégâts peuvent être directement létaux pour la cellule et conduire à sa nécrose. Si la cellule survit, des processus de réparation de l'ADN seront entrepris. Dans le cas de lésions trop sévères, la mort mitotique peut faire suite à l'arrêt de fonction vitales de la cellule. De même, si une cellule identifie que son ADN est endommagé et non réparable, le mécanisme d'apoptose est initié. Ce dernier peut être vu comme une autodestruction cellulaire dans le but de préserver l'organisme de la réplication des cellules défailtantes. En revanche, si les lésions ne sont pas létales et non identifiées ou encore mal-réparées par les processus cellulaires, des mutations pourront alors voir le jour. Ces dernières pourront conduire à terme, à des cancers radio-induits (Prise et al., 2005).

L'irradiation par des ions s'est révélée très efficace pour réaliser des dégâts importants à l'ADN. En effet, dû à la forte densité de dépôt d'énergie, le passage d'un ion va favoriser la formation de lésions cluster ou de ruptures double brin. Ceci est une cause des effets biologiques accrus des ions généralement observés (Fokas et al., 2009). Une visualisation de ces importants dégâts est donnée par représentation du caryotype d'un lymphocyte humain suite à l'irradiation par des ions fer (Figure 1-13). Des recombinaisons aléatoires des fragments de chromosome suite à leur

irradiation sont observées. Des ruptures double brin sont nécessaires pour arriver à un tel résultat ce qui montre la sévérité des dégâts sous faisceau d'ions.

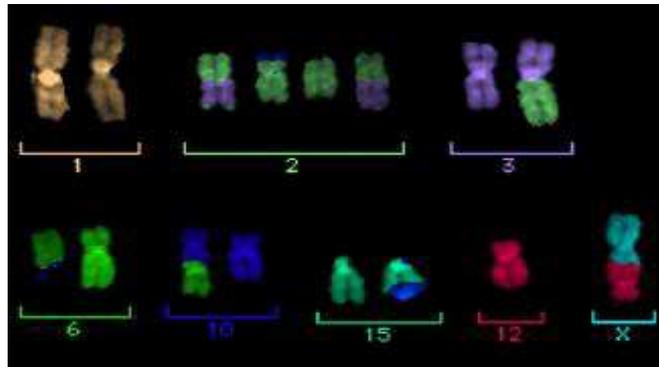


Figure 1-13 : Visualisation par m-FISH (colorisation) des chromosomes endommagés du caryotype de lymphocyte humain les plus touchés après exposition à 3 Gy d'ion Fer (147 eV/nm). Un échange complexe inclut les chromosomes de la paire 2,3,6,10,12 et le chromosome X. Figure adaptée d'après (Ritter and Durante, 2010).

2) Nouveau paradigme : l'importance de l'irradiation hors noyau et l'effet bystander

L'un des points clés de l'étude des mécanismes de mort cellulaire a été le développement de microfaisceaux permettant de viser une zone précise d'une cellule, comme le noyau ou le cytoplasme. Ces nouveaux moyens techniques ont montré que l'irradiation des membranes cellulaires ou encore du cytoplasme est également létal à la cellule, ce qui a remis en cause le modèle ADN-centrique des morts cellulaires car l'ADN est situé dans le noyau cellulaire. Ces phénomènes résulteraient d'une initiation de l'apoptose par des messagers issus des différentes parties de la cellule. L'importance des récepteurs membranaires mais aussi des mitochondries présentes dans le cytoplasme a été mis en évidence dans ces processus ce qui montre la complexité des mécanismes mis en jeu (Prise et al., 2005).

Dans le même esprit, un autre effet surprenant a été mis en évidence par l'utilisation de microfaisceaux, c'est l'effet de voisinage ou effet bystander. Lors d'irradiations de colonies cellulaires, il a été observé que des cellules non ciblées sont impactées par l'irradiation et subissent des dégâts irréversibles pouvant entraîner leur mort. En effet, dans l'exemple de la Figure 1-14, 18 des 143 cellules présentes vont être impactées par l'irradiation d'une cellule avec deux protons de 1 MeV. L'origine exacte de cet effet reste encore méconnue mais l'explication la plus probable est celle de l'intervention d'un intermédiaire capable d'impacter les cellules voisines de l'irradiation. Des théories proposent l'implication de macromolécules activées ou encore, de messagers de mort cellulaire.

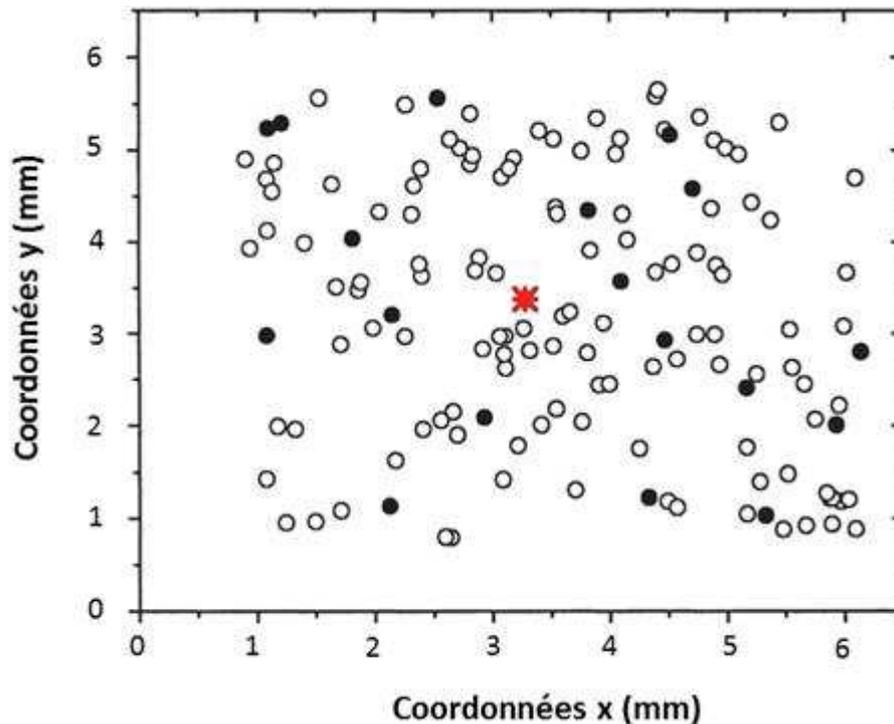


Figure 1-14 : Distribution du devenir des cellules après irradiation d'une seule cellule par deux protons de 1 MeV (*). Les cercles ouverts représentent une colonie cellulaire viable 3 jours après l'irradiation (50 cellules ou plus pour une colonie prospère à partir d'une seule). Les cercles pleins représentent les cellules qui n'ont pas produit de colonie viable. 18 des 143 cellules ont été impactées par l'irradiation d'une seule cellule, soit 12,6%. 5,3% des cellules ont été impactées sur un standard avec une irradiation ne visant aucune cellule. Figure adaptée d'après (Prise et al., 2003).

3) Observables et effets de TEL : RBE et effet oxygène

L'efficacité biologique relative (RBE)

L'efficacité biologique relative (RBE) a été introduite afin de quantifier et de rendre compte, lors de l'irradiation de cellules, des effets biologiques. La RBE est définie comme le rapport de la dose absorbée avec un rayonnement de référence (les rayons X de 220kV) sur la dose absorbée avec le rayonnement étudié nécessaires pour produire les mêmes effets biologiques (Fokas et al., 2009; Weyrather and Kraft, 2004). Les effets biologiques sont la plupart du temps caractérisés par les morts cellulaires, et une manière de les quantifier est de déterminer la dose nécessaire à tuer 90% des cellules, soit 10% de survie, la RBE résultant de cette observable est notée RBE_{10} . La RBE varie en fonction du type d'ion mais aussi de son énergie pour atteindre une efficacité maximale à un TEL de l'ordre de 100 à 500 eV/nm. En effet, des protons de faibles énergies (hors pic de Bragg) ont un RBE moyen in vivo estimé à environ 1,1 (Paganetti, 2003) alors que des ions carbone ayant des valeurs de TEL supérieures ont des RBE supérieures pouvant atteindre 3 à 4 en milieu oxygéné (Figure 1-15 (1)) (Weyrather and Kraft, 2004). Au-delà de cette valeur de

TEL, les RBE des ions accélérés diminuent car à ce stade il y a un effet de surdose, parfois également appelé « overkill » où plus de l'énergie nécessaire est déposée.

Effet oxygène

Lors d'irradiations avec des rayonnements à faible TEL, il a été vu que les tissus oxygénés sont plus sensibles aux radiations que les tissus désoxygénés. Malheureusement, les cellules tumorales sont pour la plupart hypo-oxygénées, ce qui leur confère une résistance aux radiations avec de faibles TEL. Une manière de caractériser cette résistance est le ratio effet oxygène (OER). Celui-ci est défini comme le rapport de la dose requise en atmosphère désoxygénée sur la dose requise sous air pour produire les mêmes effets biologiques (Allen et al., 2011; Weyrather and Kraft, 2004). Ainsi, plus ce rapport est bas, plus le rayonnement est efficace. Pour les photons et les protons ou les rayonnements à faible TEL, les OER moyens enregistrés sont proches de 3 ce qui engendre une résistance de ces tumeurs (Figure 1-15 (2)). En revanche, dans le cas d'ions plus lourds avec des TEL élevés, les OER sont de l'ordre de 1 (Figure 1-15 (2)). Plusieurs explications sont possibles, certaines études décrivent la formation de lésions cluster plus sévères qui diminuent ce ratio à fort TEL, d'autres se basent sur l'hypothétique formation de dioxygène moléculaire intra-trace dans ces conditions de radiolyse (voir II).

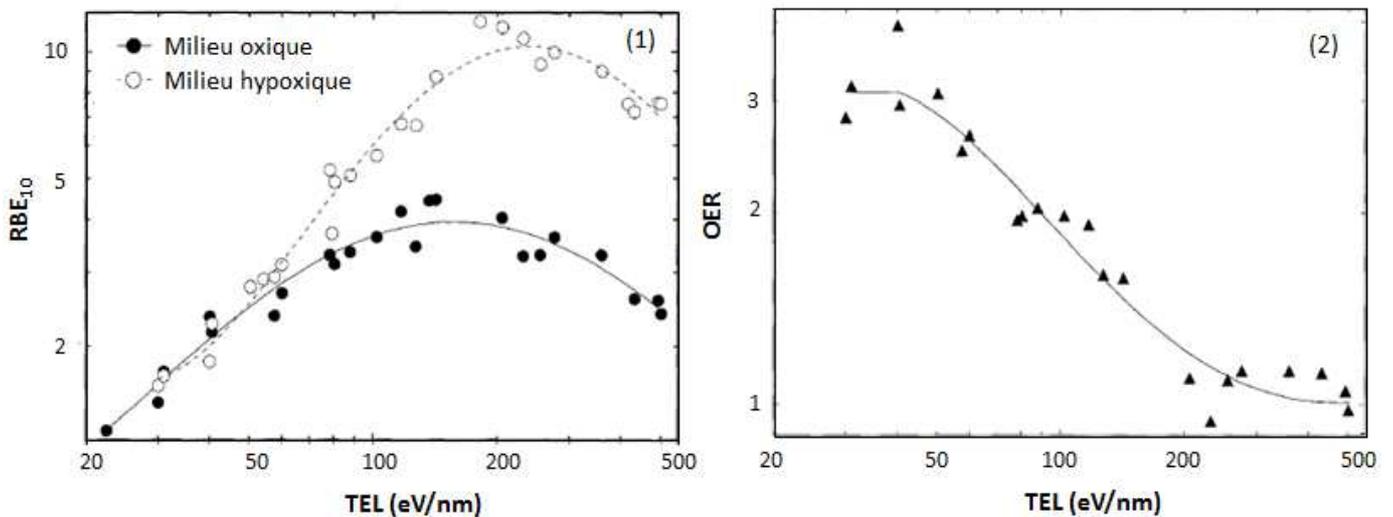


Figure 1-15 : Comparaison des RBE en milieu oxique et hypoxique (1) et des OER lors d'irradiations de cellules V79 avec des ions carbone en fonction du TEL. Figure adaptée d'après (Furusawa et al., 2000; Weyrather and Kraft, 2004).

En plus de leur balistique, les deux effets présentés ci-dessus sont la principale motivation de l'utilisation des ions accélérés dans le cadre de la thérapie et notamment du développement de la thérapie aux ions carbone. Ils mettent également en évidence l'importance de comprendre les mécanismes à l'échelle moléculaire qui vont engendrer les morts cellulaires.

B. De la radiolyse d'une cellule aux dégradations des biomolécules

1) Composition moléculaire d'une cellule

Le corps humain est constitué de cellules eucaryotes, elles se caractérisent par la présence d'un noyau contenant l'ADN et de nombreux autres organites. Parmi ceux-ci, il y a l'appareil de Golgi, les lysosomes ou encore les mitochondries qui remplissent les fonctions biologiques et qui baignent dans un fluide gélatineux appelé le cytosol. Toutes ces organites cellulaires sont elles-mêmes composées de macromolécules organisées tri-dimensionnellement pour remplir des fonctions propres. Dans le cadre d'une étude de radiobiologie moléculaire, il est intéressant de déterminer quels sont les principaux composés moléculaires d'une cellule car ces derniers vont statistiquement subir le plus de dégâts sous irradiation. Pour réaliser cette analyse, les cellules peuvent être séchées afin de déterminer leur composition massique. Le Tableau 1-3 présente une expérience menée par Delgado et al. afin de déterminer la composition de cellules de mammifères basées sur l'analyse de 4 types de cellules de souris. L'eau est bien sûr la composante majoritaire avec 70% en masse. Ensuite, viennent les protéines qui représentent 18% de la masse alors que l'ADN représente seulement 0,3%. Les lipides et l'ARN représentent respectivement 3,9% et 1,2%. Le reste de la composition cellulaire n'a pas été formellement identifié mais est généralement attribué à des sucres, des métabolites ou des ions inorganiques (Delgado et al., 2013).

Tableau 1-3 : Composition massique moyenne des molécules et macromolécules composant une cellule. La mesure est réalisée sur 4 types de cellules de souris. Donnée provenant de (Delgado et al., 2013).

Composition moléculaire	Pourcentage massique
Eau	70,0%
Protéines	18,0%
Lipides	3,9%
ARN	1,2%
ADN	0,3%
Sucres/Métabolites/Ions inorganiques	...

2) Les protéines, les cibles statistiques et fonctionnelles

L'immense majorité des fonctions cellulaires est assurée par des protéines. Elles peuvent avoir un rôle structurel (comme l'actine), un rôle dans la mobilité (comme la myoglobine), un rôle catalytique (les enzymes), un rôle immunitaire (les anticorps). De même, certaines protéines vont également intervenir sur l'ADN pour sa structuration (les histones) ou sa réparation (comme par

exemple les glycosylases). Ces fonctions sont définies grâce à la structure tridimensionnelle spécifique de chaque protéine qui peut facilement être influencée lors de la radiolyse. Par ailleurs, nous avons vu précédemment que les protéines sont les deuxièmes constituants majeurs de la cellule juste après l'eau. Ainsi, statistiquement, elles vont subir la plus grosse partie des dégâts sous radiolyse après l'eau. Des études ont montré que les mécanismes de fragmentation de l'ADN pourraient résulter de l'action de radicaux à long temps de vie sur les protéines qui réagiraient avec l'ADN (Du and Gebicki, 2004). Ces constats associés à leur rôle de réparation/réplication/compaction de l'ADN ainsi qu'à la nécessité de mieux comprendre les processus de radiolyse hors ADN dans la cellule font des protéines une cible d'intérêt majeur (Girdhani et al., 2015; Prise et al., 2005). En effet, ce sont à la fois des cibles statistiques mais aussi fonctionnelles.

3) Interactions directes ou indirectes du rayonnement

A ce stade, il est nécessaire de distinguer deux types d'effets des rayonnements ionisants. Les protéines étant en solution aqueuse concentrées dans la cellule (18% en masse), celles-ci vont subir deux types de dégâts. Les premiers sont les effets directs résultant du dépôt d'énergie du rayonnement ionisant directement dans la protéine ce qui va engendrer sa radiolyse. Le second type de dégâts passe par la radiolyse de l'eau. Les espèces réactives générées ou ROS et particulièrement, le radical hydroxyle, vont pouvoir attaquer les macromolécules en solution pour conduire aux effets indirects.

Dans les cas de protéines dans une cellule, elles subiront les deux types d'effets. En pratique, pour étudier ces effets, il est intéressant de les isoler. Pour les effets indirects, les irradiations sont réalisées en solution très diluée et pour les effets directs, il faut être en milieu très concentré ou pur.

IV. Radiolyse des protéines et des acides aminés

Pour décrire la radiolyse des protéines, il est dans un premier temps nécessaire d'en comprendre leur nature. Ainsi, nous verrons que les briques de base des protéines, les acides aminés, s'organisent pour former les protéines complexes avec une structure et une fonction définies. Par la suite, les principaux mécanismes de radiolyse directe ou indirecte des protéines et des acides aminés seront discutés. Ces mécanismes ont été identifiés pour la plupart avec des rayonnements à faible TEL car peu de documentation existe à l'heure actuelle sur la dégradation des protéines et des acides aminés avec des ions accélérés. Ces quelques études seront discutées à la fin de la section.

A. Structure et composition des protéines

1) Les 20 acides aminés protéinogènes du corps humain

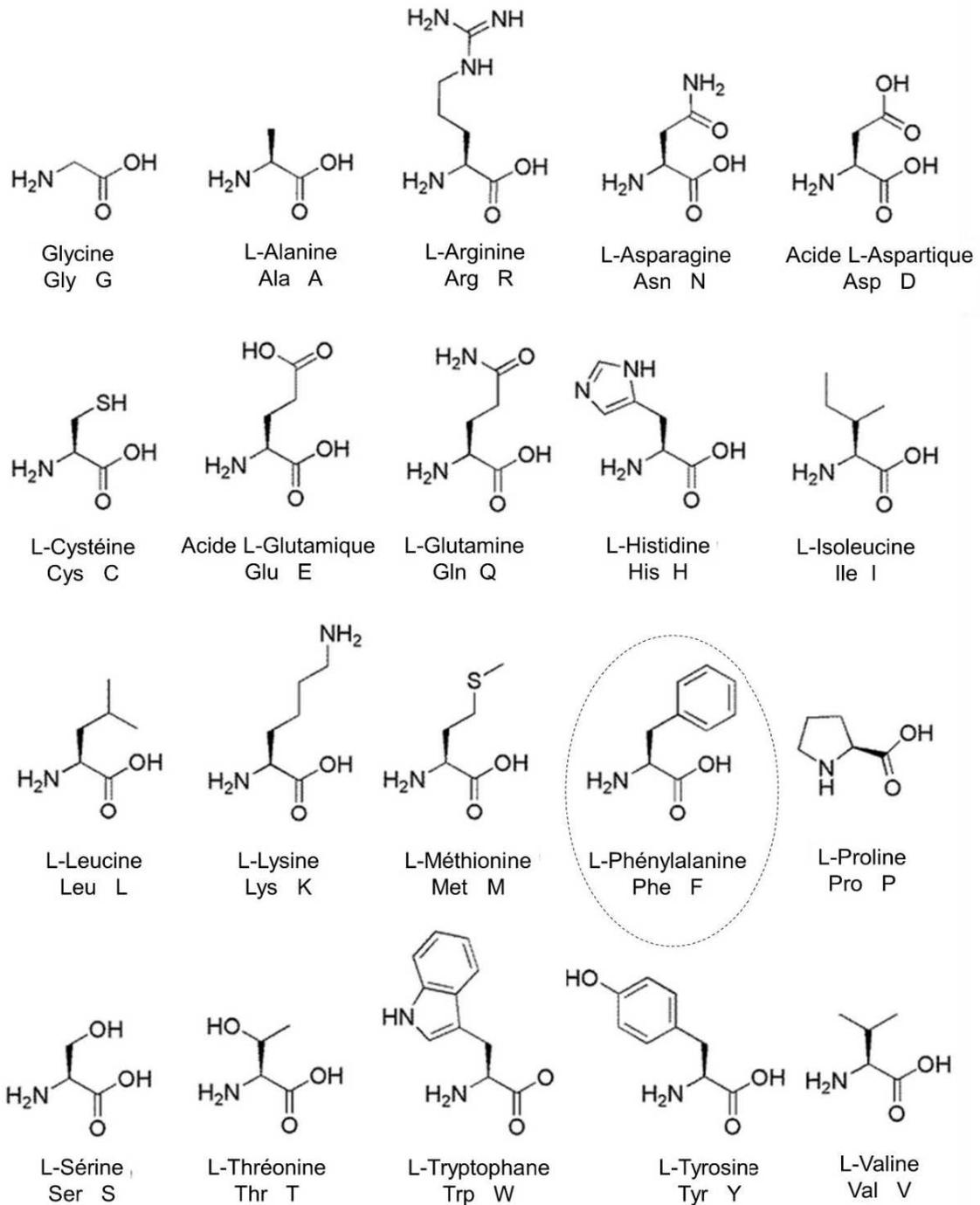


Figure 1-16 : Structure, nom, code à 3 lettres et code à 1 lettre des acides aminés protéinogènes du corps humain. La phénylalanine est mise en évidence car elle sera étudiée de manière plus spécifique dans ce manuscrit.

Parmi plus de 500 acides aminés du vivant, uniquement 20 constituent les protéines du corps humain. Ces 20 molécules comportent une fonction acide carboxylique et une fonction amine et sont de type $H_2N-HCR-COOH$, où R est la chaîne latérale qui les différencie. Leur structure est explicitée dans la Figure 1-16. On retrouve des acides aminés de petite taille (Gly, Ala, Cys, Pro, Ser, Thr, Val), hydrophobes (Gly, Iso, Val, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Hys, Lys) ou encore polaires (Cys, Ser, Asn, Gln, Glu, Asp, Lys, Arg, His, Tyr, Trp). Leur chaîne latérale est composée de fonctions amines (Lys, Arg, His), acides (Asp, Glu), d'amides (Asn, Gln), d'alcools (Ser, Thr), de cycles aromatiques (Tyr, Phe, Trp) ou encore d'hétérocycles (Trp, His). Nous verrons par la suite comment leur nature influence l'organisation de la protéine, mais également sa radiolyse. Leur polarité et leur taille sont la clé de la structuration de la protéine alors que leur composition va permettre de regrouper les différents mécanismes de radiolyse.

2) De la structure primaire à la structure tertiaire

Les protéines du corps humain sont assemblées à partir des 20 acides aminés protéinogènes présentés dans la partie précédente. L'assemblage est fait par les ribosomes dans une séquence précise en formant des liaisons peptidiques de type amide à partir des fonctions acide et amine de la chaîne principale de chaque acide aminé. La séquence de la protéine est appelée structure primaire.

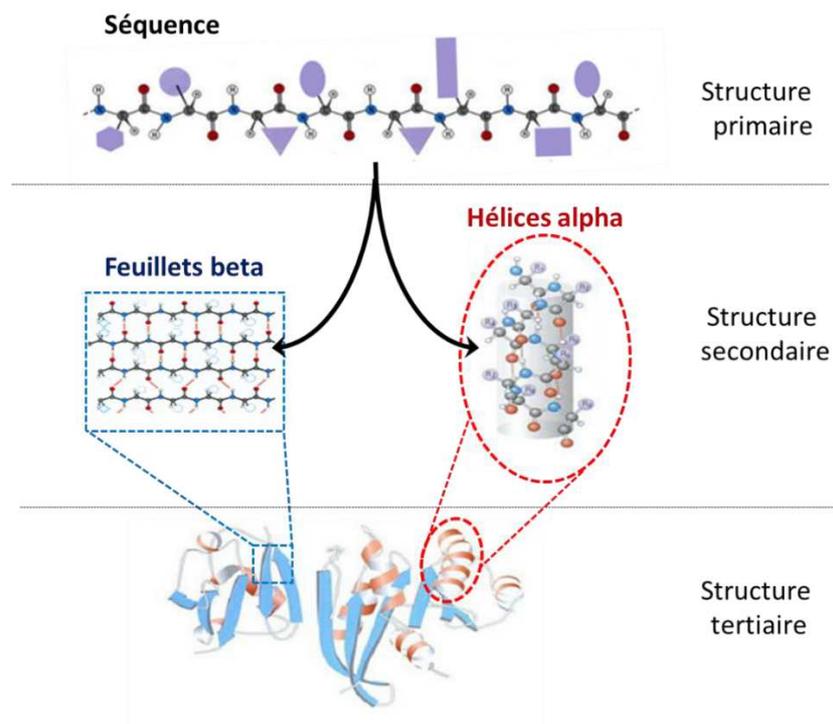


Figure 1-17 : Schéma de formation de la structure primaire à la structure tertiaire des protéines. Figure adaptée d'après (Petsko and Ringe, 2008).

Par reconnaissance à l'aide d'interactions faibles et principalement de liaisons hydrogènes, les chaînes d'acides aminés vont se replier et peuvent s'organiser en fonction de l'affinité de chaque résidu. Les éléments structuraux principalement obtenus sont les hélices et les feuillets β :

- Les hélices se caractérisent par repliement hélicoïdale et se différencient par leur unité de répétition, ceci étant dû à la distance entre les résidus formant des liaisons hydrogènes. Elles peuvent être 3_{10} ou encore π , mais les plus répandues sont les hélices alpha et sont caractérisées par des liaisons hydrogènes entre les résidus n et $n+4$ ainsi qu'une rotation de l'hélice tous les 3,6 résidus.
- Les feuillets β peuvent être parallèles ou antiparallèles en fonction de l'alignement des deux brins de séquence juxtaposés, eux aussi formés par liaison hydrogène.

En plus de ces structures, la séquence d'acides aminés peut former des coudes ou conserver des zones de transition sans organisation. De la somme de tous ces éléments résulte la structure secondaire de la protéine.

Ces éléments vont se replier et se stabiliser, toujours grâce aux interactions faibles et également par la formation de pont disulfure. De cette manière, la structure tertiaire est obtenue, celle-ci correspond à l'organisation tridimensionnelle de la protéine. Cette organisation tridimensionnelle confère à la protéine une fonction qui lui est propre et permet d'optimiser la géométrie d'un site actif pour lui conférer une activité catalytique ou de définir une géométrie précise pour une activité structurelle.

Les principes abordés ci-dessus sont résumés dans la Figure 1-17 qui permet une visualisation de ces éléments de la structure primaire à la structure tertiaire d'une protéine. Si plusieurs protéines interagissent pour former une superstructure, on parle alors de structure quaternaire.

3) Radiolyse d'acides aminés et de polypeptides pour la compréhension de mécanismes à l'échelle d'une protéine

D'un point de vue chimique, les protéines sont des macromolécules très complexes. Ce sont des polymères d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques. Elles peuvent être constituées de dizaines de milliers de peptides. La plus grosse protéine du corps humain est la titine qui possède 34 350 acides aminés, pour une masse de 3 816 kDa et une longueur de l'ordre de 1 μ m de diamètre. Même les protéines les plus simples sont constituées d'une centaine d'acides aminés. Ces tailles démesurées rendent les études mécanistiques de dégradation de protéine difficiles. C'est pourquoi, la plupart du temps, ces dernières passent par l'irradiation de polypeptide simple ou d'acides aminés pour permettre une approche fondamentale des mécanismes de radiolyse. Il faut toutefois garder à l'esprit que des phénomènes à l'échelle d'un acide aminé ne représentent pas une protéine entière. En effet, des phénomènes complexes de radiolyse apparaissent lors dans le cas d'irradiation de polypeptides ou de protéines qui ne sont pas présents pour de simples acides aminés. Parmi ceux-ci, on peut citer les phénomènes de transfert d'électron ou d'hydrogène

(Houée-Levin and Bobrowski, 2013) ou encore les mécanismes de fragmentation inhérents à la présence d'une chaîne polypeptidique (Puchala and Schuessler, 1995).

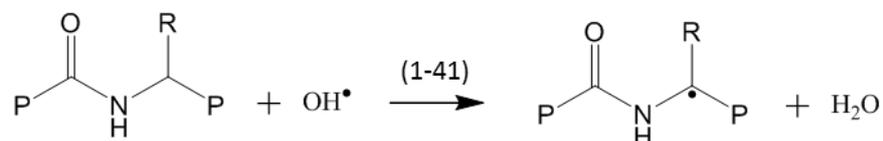
B. Mécanismes de dégradation des protéines

On peut distinguer les dégâts aux protéines en deux catégories. D'une part, ceux affectant la chaîne principale de la protéine, c'est-à-dire le squelette constitué des liaisons peptidiques et, d'autre part, les dégâts aux chaînes latérales des résidus.

1) Effets indirects en solution aqueuse

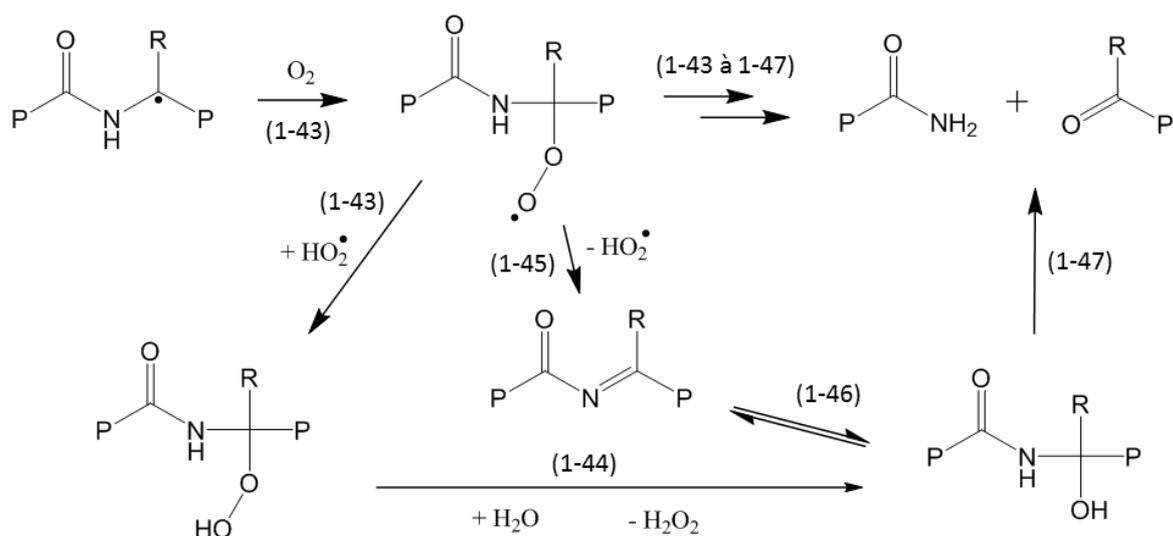
a) Chimie de la chaîne principale

Les principales réactions affectant la chaîne principale correspondent à l'arrachement d'un hydrogène par le radical hydroxyle sur le carbone alpha des peptides. Cette réaction (équation 1-41) conduit à la formation d'un intermédiaire radicalaire carbone alpha et d'une molécule d'eau.



Équation 1-41 : Réaction de capture d'hydrogène du radical hydroxyle sur la chaîne principale de la protéine. R correspond à une chaîne latérale et P à la chaîne principale de la protéine (Garrison, 1987).

En milieu oxygéné, l'espèce radicalaire formée par la réaction 1-41 va réagir avec le dioxygène pour former un radical de type peroxyde qui conduira à la rupture de la chaîne principale. La chimie menant à cette rupture est complexe et résulte dans la majorité des cas en la formation d'un alcool intermédiaire soit par réaction avec le radical superoxyde selon les équations 1-43 et 1-44, soit en éliminant le radical superoxyde selon les équations 1-45 et 1-46. D'autres voies de rupture de la chaîne principale proposées résulteraient de la formation d'un radical intermédiaire alcoyle à partir de l'interaction de deux radicaux peroxydes ou de l'intervention d'un deuxième radical superoxyde sur l'espèce peroxyde formée par la réaction 1-43 (Berlett and Stadtman, 1997; Garrison, 1987; Xu and Chance, 2007). Selon l'équation 1-47, une rupture de la chaîne principale entraîne la formation de dérivés amides et cétones. Il a également été observé la formation d'acides carboxyliques par dégradation des cétones et hydrolyse des amides pour former des acides et de l'ammoniaque.



Équations 1-42 à 1-47 : Réactions conduisant à la rupture de la chaîne peptidique en milieu aéré à partir de l'intermédiaire radicalaire carbone alpha. R correspond à une chaîne latérale et P à la chaîne principale de la protéine (Garrison, 1987).

En milieu oxygéné, les mécanismes prépondérants sont ceux conduisant à une fragmentation. En revanche, en l'absence de dioxygène, les mécanismes de dimérisation sont alors favorisés (Puchala and Schuessler, 1995). L'absence de réaction avec le dioxygène permet l'interaction de deux espèces radicalaires carbone alpha qui ont des temps de vie suffisamment longs pour se rencontrer. Un paramètre limitant à la faisabilité de ces mécanismes réactionnels dans une protéine est l'accessibilité à la chaîne principale en raison de son repliement. En effet, les chaînes latérales sont généralement plus exposées aux attaques du radical hydroxyle en solution.

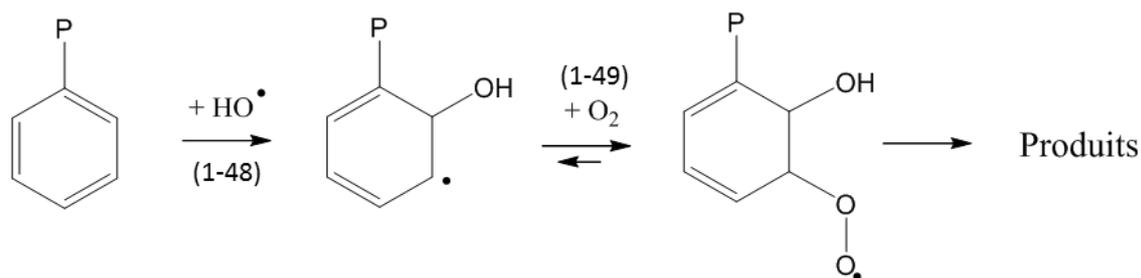
b) Chimie des chaînes latérales

Lors de la radiolyse de protéines en solution diluée et aérée, tout comme les mécanismes de fragmentation de la chaîne principale, les dégradations des chaînes secondaires des acides aminés résultent de l'action du radical hydroxyle. Ce dernier peut réagir avec la plupart des chaînes latérales, le Tableau 1-4 recense les constantes de réaction et les principaux produits de réaction obtenus lors de la réaction des résidus avec le radical hydroxyle. Ainsi, les réactions les plus efficaces se font avec les composés aromatiques et soufrés. Leurs constantes de vitesse sont comprises entre 10^9 et $10^{10} \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Ces deux classes d'acides aminés captent la plus grande quantité de radicaux hydroxyles lors de la radiolyse. Toutefois, les réactions avec les autres résidus peuvent avoir lieu lors de la radiolyse d'une protéine pauvre en acides aminés aromatiques et soufrés ou lorsque ces derniers sont suffisamment enfouis dans la structure de la protéine.

Les produits de dégradation des acides aminés aromatiques résultent pour la plupart de mécanismes d'addition du radical hydroxyle sur le cycle aromatique du résidu (réaction 1-48 et 1-49). Le radical cyclohexadiényle intermédiaire ainsi formé réagit ensuite avec le dioxygène pour former un intermédiaire radicalaire de type peroxyde (réaction 1-48). Ce dernier peut conduire aux produits d'hydroxylation par élimination de superoxyde. Lors de la radiolyse de la tyrosine, la fonction phénol permet la stabilisation du radical intermédiaire cyclohexadiényle par élimination d'eau et formation d'un intermédiaire radicalaire phénoxy ($P-\phi-O\cdot$). Ce dernier est connu pour être impliqué dans des mécanismes de cross-linking qui peuvent conduire à des dimérisations (tyrosine-tyrosine) mais aussi des réactions avec d'autres composés, notamment des couplages avec un résidu thymine de l'ADN (Simic et al., 1984). Dans le cas d'addition sur un hétérocycle (Trp et His), des mécanismes additionnels conduisent à l'ouverture de ce cycle (production de kynurénine, asparagine ou acide aspartique (Getoff, 1992).

Tableau 1-4 : Tableau récapitulatif des réactions du radical hydroxyle avec les acides aminés les plus susceptibles de subir une oxydation. Les constantes de réaction et les principaux produits de réaction sont décrits. Référence : (1) (Solar, 1985) ; (2) (Solar et al., 1984a) ; (3) (Solar et al., 1984b) ; (4) (Scholes et al., 1965) ; (5) (Hoffman and Hayon, 1973) ; (6) (Adams et al., 1965); (7) (Masuda et al., 1973); (8) (Berlett and Stadtman, 1997).

Classe	Acide aminé	Constante de réaction avec $HO\cdot$ ($M^{-1}.s^{-1}$)	Principaux produits d'oxydation (8)
Aromatique	Phénylalanine	$6,9 \times 10^9$ (1)	2-, 3-, 4-hydroxyphénylalanine et 2,3-dihydroxyphénylalanine
	Tyrosine	$1,3 \times 10^{10}$ (2)	3,4-dihydroxyphénylalanine, dimère tyrosine-tyrosine ou tyrosine-O-tyrosine
	Tryptophane	$1,3 \times 10^{10}$ (3)	2-, 4-, 5-, 6-, 7-Hydroxytryptophane, kynurénine, N-formylkynurénine, 3-hydroxykynurénine
	Histidine	$1,9 \times 10^9$ (4)	2-Oxohistidine, asparagine, acide aspartique
Soufre	Cystéine	$1,1 \times 10^{10}$ (5)	disulfure, acide cystéique
	Méthionine	$8,5 \times 10^9$ (6)	sulfoxyde, sulfone
Autre	Asparagine	$4,9 \times 10^7$ (7)	acide glutamique semi-aldéhyde
	Lysine	$3,5 \times 10^8$ (7)	acide α -aminoadipique semi-aldéhyde
	Proline	$6,5 \times 10^8$ (7)	2-Pyrrolidone, 4-, 5-hydroxyproline, acide pyroglutamique, acide glutamique semi-aldéhyde
	Thréonine	$5,1 \times 10^8$ (7)	acide 2-amino-3-ketobutyrique
	Glutamine	$5,4 \times 10^8$ (7)	acide oxalique, acide pyruvique



Équations 1-46 à 1-47 : Réactions de radiolyse de composés aromatiques en milieu dilué oxygéné. P correspond à la protéine (Getoff, 1992).

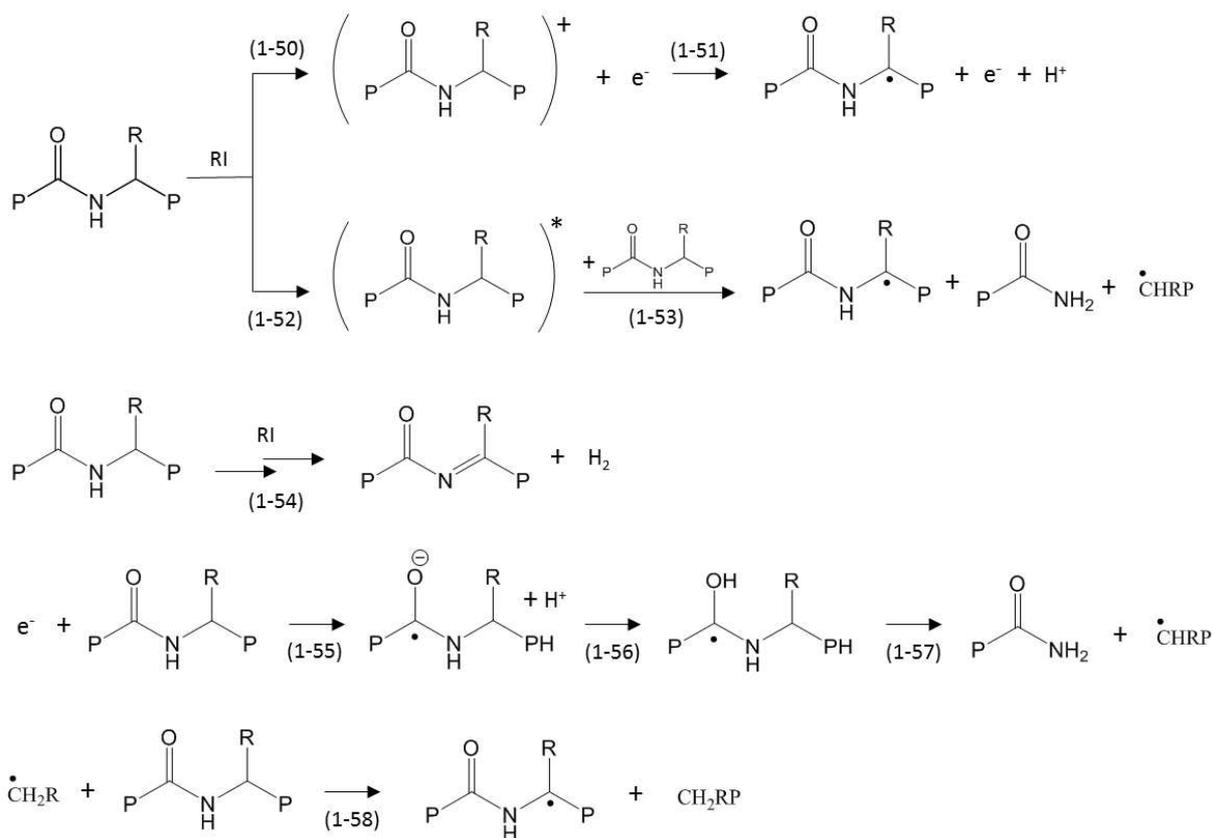
Lors de la dégradation des résidus cystéines, c'est la fonction thiol (PSH) qui sera la principale cible. En effet, par l'action du radical hydroxyle, mais également du superoxyde, l'atome d'hydrogène sera capté pour former un radical intermédiaire $\text{PS}\cdot$, lequel réagira également avec le dioxygène pour conduire à la formation d'un acide cystéique ou avec un second résidu $\text{PS}\cdot$, pour former un pont disulfure. La réaction avec de l'eau oxygénée est également possible pour former un adduit PSOH . Ce dernier peut conduire à la formation d'un pont disulfure par réaction avec une seconde fonction thiol PSH et élimination d'eau. Dans le cas de la réaction du radical hydroxyle avec la méthionine, une addition sur le thio-éther est observée pour former un radical $\text{PS}\cdot(\text{OH})\text{CH}_3$ qui conduira notamment à la formation de sulfone ou de sulfoxyde (Garrison, 1987).

Les mécanismes de dégradation des autres acides aminés passent pour la plupart par la capture d'un hydrogène sur leur chaîne latérale. On note toutefois que lors de la présence de fonction amine ou amide, la désamination et la formation de carbonyle sont une voie de dégradation prépondérante.

Les réactions sur les chaînes latérales peuvent également conduire à des ruptures de la chaîne principale. Ces mécanismes ont été observés principalement avec les résidus proline et acide glutamique, mais également lors de la capture d'un hydrogène sur n'importe quel carbone β (premier carbone de la chaîne latérale). (Xu and Chance, 2007).

2) Effets directs en milieu aqueux

Lors d'une irradiation en milieu concentré, les effets directs de radiolyse deviennent prépondérants. Les mécanismes présentés par la suite ont été étudiés essentiellement lors de radiolyse par des rayons gamma. Le rayonnement incident interagit avec les électrons des protéines pour conduire à leur ionisation et leur excitation selon les réactions 1-50 et 1-52. Lors de l'ionisation, un radical carbone alpha peut être créé par l'éjection d'un électron. Si ce dernier possède suffisamment d'énergie, il pourra réaliser une trace secondaire (cf I. II.). Ensuite, il sera éventuellement capté par un carbonyle pour conduire à la rupture de la chaîne principale (réactions 1-51 et 1-53). Ce dernier peut également conduire à la formation d'un intermédiaire radicalaire carbone alpha selon la réaction 1-55. Un peptide déshydrogéné suite à une élimination de dihydrogène (réaction 1-54) a également été observé sous irradiation.



Équations 1-48 à 1-56 : Réaction faisant suite au dépôt d'énergie d'un rayonnement ionisant dans des protéines. R correspond à une chaîne latérale et P à la chaîne principale de la protéine (Garrison, 1987)

De façon analogue aux irradiations en solution diluée, les espèces déshydrogénées et intermédiaires réactionnelles de type carbone alpha peuvent conduire à des ruptures de la chaîne principale en solution aqueuse oxygénée concentrée, des mécanismes identiques ont également été observés dans de la glace ou en poudre lyophilisée (Houée-Levin and Sicard-Roselli, 2001). En milieu désoxygéné ou dans le cas d'une proximité de ces radicaux accrus, les mécanismes de dimérisation ou de couplage interne sont alors prépondérants.

Des études par résonnance paramagnétique électronique (RPE) sur une large gamme de peptides solides ont montré que le radical à longue durée de vie produit est de type carbone alpha comme produit dans les équations 1-53, 1-54 et 1-58, même sur des peptides incluant la méthionine. (Sevilla et al., 1979a, 1979b; Sevilla and Brooks, 1973). Dans le cas de résidus tyrosines et cystéines, les radicaux obtenus sont majoritairement de type $\text{P}-\phi-\text{O}\cdot$ et $\text{PS}\cdot$. Lors de l'interaction avec les résidus acides glutamiques et acides aspartiques, une décarboxylation est aussi possible par la libération de CO_2 .

Des expériences d'irradiation de solutions de β -lactoglobuline gelées menées par Audette-stuart et al. ont montré que, même en milieu solide, les effets indirects à l'interface solvant-protéine

sont loin d'être négligeables et sont en partie responsables de phénomènes de radiolyse (Audette-Stuart et al., 2005). Ceci démontre l'importance de prendre en compte les deux types d'effets lors d'irradiation de solution très concentrée, une description unique par les effets directs n'étant pas suffisante.

C. Modifications structurelles et conséquences biologiques

L'une des principales conséquences de la radiolyse des protéines est leur perte d'activité. En effet, l'un des points communs entre les différents mécanismes de radiolyse est la modification de la structure secondaire de la protéine. Celle-ci se comprend facilement lors de sa fragmentation ou de sa dimérisation, mais la modification des acides aminés conduit également à la modification de la structure secondaire en influant sur les affinités des résidus (Audette-Stuart et al., 2005). Dans le cas de dégâts directs, une énergie absorbée de 100 eV/protéine rend l'enzyme inactive (Dertinger and Jung, 1969).

La modification des protéines sous irradiation et leur dysfonctionnement entrent dans les phénomènes appelés stress oxydant. A forte dose instantanée, ils sont impliqués dans la mort cellulaire ce qui peut conduire à l'irritation ou la nécrose des tissus. A faible dose répétée, l'accumulation de protéines oxydées et dysfonctionnelles a été reliée au développement de pathologies comme la maladie d'Alzheimer ou encore le diabète (Berlett and Stadtman, 1997; Moskovitz et al., 2002). Les modifications structurelles peuvent être une conséquence des modifications chimiques d'une protéine et donc, représentent un marqueur des effets de radiolyse sur ces biomolécules.

D. Irradiation de protéines sous faisceau d'ions, effets de TEL

Les processus de radiolyse des protéines et des acides aminés présentés ci-dessus ont été identifiés lors d'expériences d'irradiation avec des rayonnements de faibles TEL. On peut attendre une part importante de réactions similaires avec des ions accélérés de TEL plus élevés. En effet, dans le cadre des effets indirects, les mêmes espèces de radiolyse de l'eau interviennent dans les processus (HO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$ et H_2O_2). Quant aux effets directs, les interactions rayonnement-matière conduisant au dépôt d'énergie sont également majoritairement de nature électrostatique même pour des rayonnements à fort et à faible TEL. Cependant, on peut attendre que les structures de traces créées suite au passage de rayonnements à fort TEL influencent la radiolyse directe ou indirecte. En effet, dans le cadre des effets indirects, les recombinaisons inter-radicalaires dues à la densité de dépôt d'énergie modifient les rendements de production des espèces réactives (II p31). De même, les radicaux produits sur la protéine par effets directs seront plus rapprochés au sein d'une même protéine et seront plus à même de réagir entre eux, notamment les radicaux à durée de vie longue comme le radical formé sur un carbone alpha de la chaîne principale.

Dans l'une des seules études de radiolyse de protéines par des ions, Xue et al. ont réalisé des irradiations de film sec d'albumine de sérum bovin (BSA) par des protons de 1,5 MeV. Ils ont montré qu'un seul proton par protéine suffit à modifier la structure de la protéine en convertissant des hélices alpha en des feuillets beta. Des mécanismes de fragmentation et de dimérisation seraient également impliqués dans ces modifications (Xue et al., 2006).

Une étude des effets des protons comparés aux effets des rayons gamma a été réalisée par Synytsya et al. sur des solutions d'albumine de sérum bovin et humain (BSA et HSA) à 2% (en masse) dans l'eau. Les irradiations ont été réalisées avec des protons de 25 MeV déposant environ 10 MeV en solution et des rayonnements gamma (source Cobalt). A ces énergies, les protons ont des TEL quasi constants de l'ordre de 3 eV/nm. Les dénaturations de la structure secondaire et les modifications subies par les acides aminés se sont avérées plus fortes sous rayons gamma que sous protons lors d'irradiation à faible dose. A dose élevée, peu de différence ont été observées. Ces conclusions rejoignent le fait qu'avec des protons à ces énergies, les mécanismes de radiolyse se rapprocheraient de ceux avec les rayons gamma. Les acides aminés prioritairement touchés ont été identifiés comme étant les aromatiques et ceux contenant du soufre. De même, la perte de structures alpha au profit de structures beta a été observée (Synytsya et al., 2007)

Les deux références présentées précédemment sont quasiment les seules à traiter de la radiolyse de protéines par des ions, que ce soit en milieu solide, concentré ou dilué. Il a été vu au travers de ces deux publications que les ions accélérés ont des effets importants en milieu dilué et sévères lors des dégâts directs, un ion pouvant suffire à dénaturer une protéine.

Le manque flagrant d'informations dans ce domaine à ce jour pousse à réaliser une étude plus systématique de ces dégâts et ceci avec une gamme de TEL beaucoup plus large. Peu d'effets de TEL ont été observés en solution avec des protons de 3 eV/nm qui sont des rayonnements à faible TEL, proche des rayons gamma. Il serait intéressant de poursuivre ce type d'étude avec des TEL allant jusqu'à 100 ou 1000 eV/nm correspondants à des ions plus lourds où une influence plus forte est attendue.

V. Schéma récapitulatif

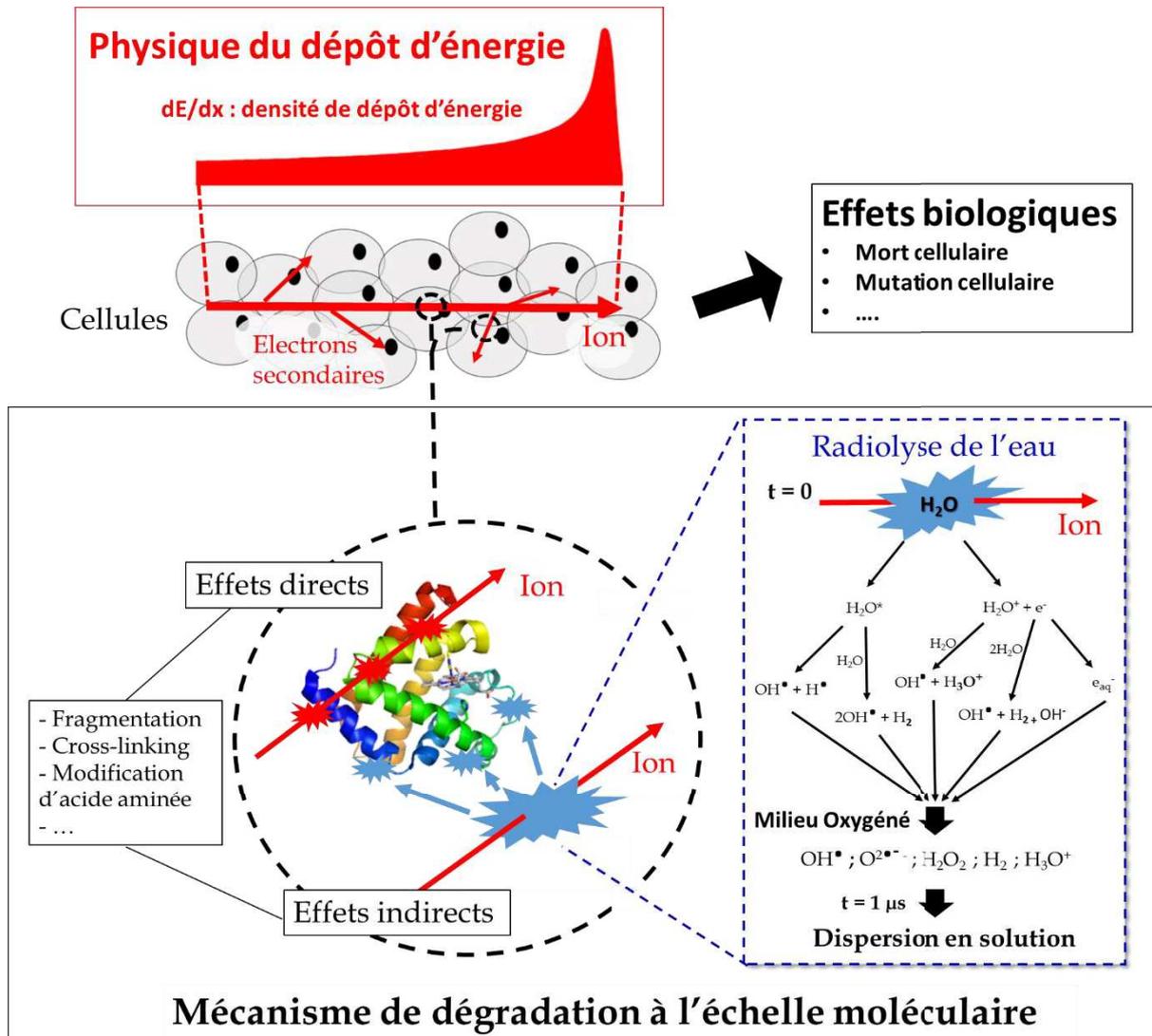


Figure 1-18 : Schéma récapitulatif de chapitre 1 avec l'implication de la densité de dépôt de la particule accélérée sur les mécanismes de radiolyse à l'échelle moléculaire (effets directs par dépôt d'énergie dans la protéine, effets indirects via la radiolyse de l'eau) conduisant aux effets biologiques à l'échelle cellulaire.

Chapitre 2: Expériences d'irradiation

I. Expériences d'irradiation

A. Les rayonnements ionisants utilisés

Le but des expériences mises en œuvre est de comprendre l'effet des ions accélérés sur la dégradation de biomolécules. Pour ce faire, étudier une gamme la plus large possible de TEL et de type d'ion est essentiel. Les plus grandes variations du TEL pour des particules correspondent aux énergies proches du pic de Bragg, c'est-à-dire des énergies relativement faibles. C'est également la zone utile lors de la thérapie pour détruire les tumeurs, ce qui rend l'utilisation de ces énergies pertinentes du point de vue physique et biologique. Ainsi, les irradiations ont été menées avec des protons, des particules alpha et des ions carbone avec des énergies en solution allant de 0,5 à 5,5 MeV/u. Cette gamme d'ions et d'énergies regroupe trois différents types d'ions avec des TEL dans l'eau de 7 à 950 eV/nm (Figure 2-1). Pour avoir une vision plus complète, les mêmes ions à haute énergie sont un point de comparaison idéal. Des irradiations avec des protons de 210 MeV et des carbones de 4,3 GeV ont été réalisées. Leurs TEL respectifs dans l'eau sont de 0,44 et 11,3 eV/nm (Figure 2-1). De même, un point essentiel à toute étude de radiolyse est la comparaison aux rayons gamma. Ces derniers ont des densités de dépôt d'énergie parmi les plus faibles possibles et sont la référence des expériences d'irradiation. La plupart des travaux traitant de mécanismes de radiolyse ont été faits avec des rayons gamma ou alors des électrons de hautes énergies, très similaires. Ainsi, la comparaison des rayonnements gamma aux protons de hautes énergies, dont les TEL sont dans cette gamme, sera également très intéressante.

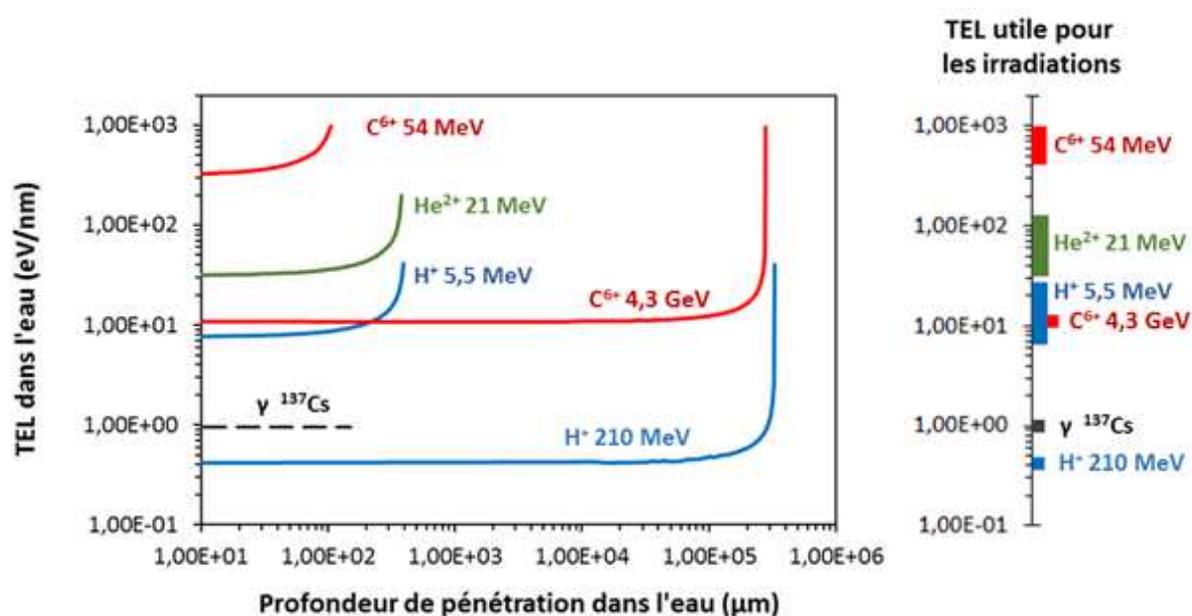


Figure 2-1 : TEL des rayonnements utilisés pour l'irradiation en solution aqueuse.

Dans le cas d'irradiations par des ions, il est essentiel de bien maîtriser les distances et la géométrie impliquées dans les expériences d'irradiation. En effet, les rayonnements déposent de l'énergie dans l'air ou bien dans les membranes nécessaires pour atteindre l'échantillon. Leur énergie et leur TEL vont alors varier avant d'atteindre ce dernier mais également, varier dans l'épaisseur de celui-ci. Les énergies exactes mises en jeu peuvent être recalculées par SRIM, mais ceci implique une bonne maîtrise des distances lors de l'irradiation.

B. Fluence en solution et débit de fluence

Les fluences d'ions (en ions/cm²) correspondent au nombre d'ions par unité de surface envoyés dans un échantillon. Les fluences doivent être déterminées précisément car elles sont directement liées à la dose déposée dans l'échantillon qui est un paramètre clé des expériences d'irradiation. Si dans un échantillon solide le nombre d'ions envoyés par unité de surface est représentatif, en solution cette grandeur est plus compliquée à appréhender. En effet, en conséquence de la diffusion en milieu aqueux, on considère que la trace chimique d'un ion a complètement disparu après plusieurs microsecondes, c'est-à-dire que la chimie de la solution redevient homogène. Les dégâts en solution sont alors moyennés sur tout l'échantillon. Ainsi, une grande fluence envoyée en solution n'est pas forcément synonyme d'un recouvrement de trace comme en milieu solide. En solution, il a un aspect temporel très important sur ces phénomènes de recouvrement à prendre en compte.

Pour une expérience d'irradiation en solution dans de bonnes conditions, il faut impérativement éviter les phénomènes de recouvrement de traces. En effet, des mécanismes inter-traces perturberaient la radiolyse de l'eau et ainsi les mesures sur nos échantillons. Il est alors judicieux de s'intéresser au débit de fluence en fonction du temps en prenant comme référence la microseconde, limite de la chimie inhomogène (ions/cm²/μs). Des modèles physiques qui visent à comprendre les dégâts en fonction des fluences d'ions et des recouvrements de traces sont décrits dans le cadre de la théorie de la cible (Dertinger and Jung, 1969). Cette approche a pu être utilisée notamment pour la compréhension de la radiolyse des polymères mais également en radiobiologie pour estimer la taille de macromolécules (Kempner, 1999; Yamauchi, 2003). Ce modèle purement statistique décrit l'aire occupée (A_N) par le passage de N ions dans un même rayon, ceci en tenant compte de la fluence d'ion (F) et de la surface d'une trace (S) (équation 2-11). L'aire totale de l'échantillon est donc exprimée en fonction de A_1 à A_N avec A_1 représente la proportion d'irradiation à une trace, A_2 à deux traces, etc. On peut ainsi extrapoler ces modèles pour nos systèmes chimiques, en tenant compte de la diffusion des espèces primaires de la radiolyse de l'eau, afin d'estimer la limite de fluence en une microseconde pour le non recouvrement de traces. D'après l'étude de Muroya et al, une estimation d'un rayon maximal de trace chimique de l'ordre de 200 nm a été obtenue par simulation à la microseconde (Muroya et al., 2006). En appliquant cette valeur à l'équation 2-11, il est possible de tracer les aires relatives occupées à la microseconde en fonction de la fluence et du nombre de traces chimiques qui se recouvrent. Un débit d'ions inférieur à 10⁸ ions/cm²/μs doit garantir un régime de non

C. Techniques de dosimétrie mises en œuvre.

Dans cette partie, le principe des mesures réalisées est explicité, tandis que leur mise en œuvre sera présentée par la suite dans la description des plateformes d'irradiation.

1) Mesure du courant par cavité de Faraday

La mesure par cavité de Faraday, ou mesure directe du courant d'ions, est une technique physique de détermination de la dose. Elle se base sur la nature de l'ion qui est chargé. Elle est réalisée sous vide dans l'enceinte des lignes d'irradiation. En principe, la cavité de Faraday n'est qu'un dipôle qui se charge électriquement lorsque le faisceau d'ion est implanté dans le métal. Si le métal est relié à un circuit électrique, le mouvement des contres charges portées par les électrons peut être enregistré (Brown and Tautfest, 1956). Ainsi, la mesure directe du courant induit est directement corrélée au nombre de charges implantées et donc au nombre d'ions. Avec une connaissance précise des aires irradiées, une fluence en ions/cm² peut ainsi être déterminée. Pour une mesure la plus exacte possible, les électrons secondaires émis lors de l'implantation doivent être repoussés vers la cavité de Faraday pour ne pas surestimer les courants mesurés. En pratique, des plaques sous tension isolées du reste du système imposent un champ électrique pour ramener les électrons secondaires vers la cavité.

Cette technique destructive pour le faisceau d'ions est mise en œuvre de manière séquentielle par rapport aux irradiations d'échantillon. D'abord, la cavité de Faraday est irradiée pour calibrer la fluence d'ions par unité de temps puis l'échantillon est irradié durant un temps précis. Cependant, avec une géométrie adéquate et un faisceau large, il est possible d'irradier à la fois la cavité de Faraday et l'échantillon comme présenté par la suite pour réaliser un suivi en ligne de l'irradiation.

2) Détecteur solide de traces nucléaires : le CR39

Le poly allyl diglycol carbonate (PADC) est un polymère aussi connu sous le nom de CR-39 pour son développement par la société Columbia Résine dans les années 40. Sa structure est composée d'un enchaînement de groupements éther et carbonate (Figure 2-3).

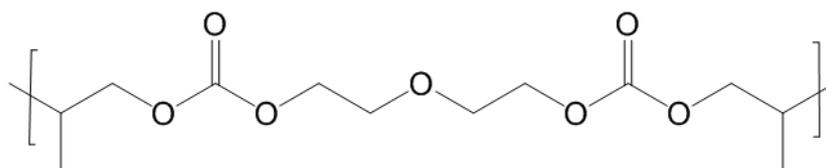


Figure 2-3 : Unité de répétition dans le PADC/ CR39.

Parmi les nombreuses applications de ce polymère, celui-ci est couramment utilisé comme détecteur de traces nucléaires. En effet, le passage d'un rayonnement casse les liaisons chimiques du polymère. Par attaque chimique dans des solutions de caustique, les zones fragilisées par radiolyse sont révélées et peuvent ensuite être facilement identifiées, par exemple par AFM (Figure 2-4). La taille des traces révélées dépend directement de la densité de dégâts et donc du TEL, ainsi le CR39 peut être utilisé pour caractériser le type de particule et l'énergie de ces dernières.

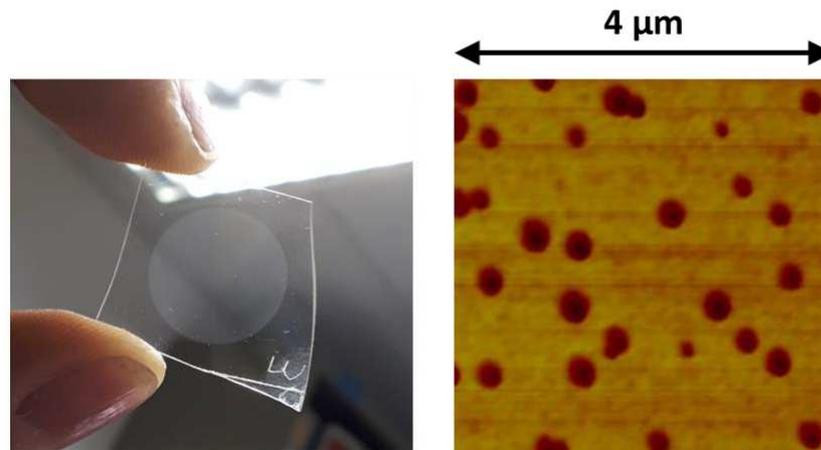


Figure 2-4 : A gauche, un CR39 irradié en son centre après attaque chimique. A droite, une mesure AFM $4\mu\text{m} \times 4\mu\text{m}$ du même CR39.

Pour nos expériences, du CR39 HARZLAS TD-1 (Fukui, Japan) a été utilisé. Après irradiation à des fluences de l'ordre de 10^8 ions/cm², les plaquettes de CR39 sont plongées dans des bains de KOH à 6M à 70°C pendant 2 à 10 minutes, en fonction du TEL des rayonnements. Les TEL les plus élevés vont initier plus de dégâts, l'attaque chimique sera alors plus rapide. Une fois sortis du bain et rincés, les échantillons sont analysés en AFM (Microscopie à Force Atomique). L'analyse est réalisée en mode tapping sur une surface de $4\mu\text{m} \times 4\mu\text{m}$ et les traces sont comptées. Pour réaliser une statistique, les mesures sont faites sur trois zones différentes de l'échantillon. Chaque trace révélée correspond au passage d'un ion. Ainsi, une mesure par unité de surface donne une fluence en ions/cm².

3) Dosimétrie chimique : dosimètre de Fricke

a) Principe de la dosimétrie de Fricke

La dosimétrie de Fricke, présentée par Fricke et Hart en 1966, est une dosimétrie chimique basée sur la conversion des ions Fe (II) en ions Fe (III) par réaction avec les espèces issues de la

radiolyse de l'eau en milieu acide et aéré (Fricke and Hart, 1966). Les solutions de Fricke sont calibrées et composées de 1 mM d'ion Fe^{2+} (sel de Mohr), 0,4 M H_2SO_4 , et 1 mM de NaCl.



Équations 2-1 à 2-9 : Schéma réactionnel du dosimètre de Fricke

Les réactions 2-1 à 2-6 conduisent à l'oxydation des ions Fe (II) par les espèces issues de la radiolyse de l'eau (e_{aq}^- , H^\bullet , H_2O_2 et HO^\bullet). Ces réactions sont rapides et totales. Cependant, en présence d'impuretés organiques, la réaction 2-7 peut conduire à fausser la mesure de la dose. C'est pourquoi NaCl est introduit dans le dosimètre de Fricke pour s'affranchir des réactions avec ces impuretés organiques en réalisant les réactions 2-8 et 2-9 car Cl^\bullet est trop faible pour attaquer RH.

$$G'_{\text{Fe}^{3+}} = 3G'_{e_{\text{aq}}^-} + 3G'_{\text{H}^\bullet} + 2G'_{\text{H}_2\text{O}_2} + G'_{\text{OH}^\bullet} = \frac{100 \times N_{\text{Fe}^{3+}}}{E} \text{ (esp/100eV)}$$

Équation 2-10 : Équation bilan des rendements différentiels de Fricke

Le bilan global de ces réactions conduit à un rendement de production de Fe (III) dépendant de la production d'espèces de la radiolyse de l'eau comme résumé dans l'équation 2-10. Ce rendement varie donc en fonction du rayonnement utilisé et de son énergie comme recensé pour les rayonnements utilisés dans cette étude dans le Tableau 2-1. On observe globalement une corrélation de ce rendement au TEL des particules. Les rayonnements à très faible TEL, gamma et H^+ 210 MeV, ont les rendements les plus forts. Plus le TEL augmente, plus les rendements diminuent (H^+ 3 MeV, He^{2+} 20 MeV et C^{6+} 50 MeV)

Tableau 2-1 : Rendement différentiel (à TEL constant) de Fricke pour quelques rayonnements. Référence 1 : (“ICRU - REPORT 14,”) ; 2 : Extrapolation depuis (Laverne and Schuler, 1994) ; 3 : (LaVerne and Schuler, 1987).

Rayonnement et énergie	Gamma ¹³⁷ Cs	H ⁺ 210 MeV	H ⁺ 3 MeV	He ²⁺ 20 MeV	C ⁶⁺ 4,3 GeV	C ⁶⁺ 50 MeV
G' _{Fe3+} (esp/100eV)	15,3 ¹	15,5 ²	10,6 ³	7,21 ³	13 ²	5,31 ³

Pour la mise en œuvre de cette dosimétrie, la dose (énergie par unité de masse) peut être déterminée en quantifiant la production de fer (III) quand son rendement de production est connu avec le rayonnement utilisé. Cette quantification est réalisée simplement par UV-Visible via la bande d'absorption du fer à 304nm dont le coefficient d'extinction molaire est connu : $\epsilon_{304} = 2197 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (LaVerne and Schuler, 1987). Pour une mesure de dose précise, il est essentiel de respecter le domaine de linéarité du dosimètre. La perte de linéarité à haute dose a pour origine la consommation de l'oxygène en solution (Équation 2-1, 2-2). En effet, au-delà de 400-500 Gy, si l'oxygène en solution n'est pas renouvelé, il y a une perte de linéarité. Ainsi dans toutes les expériences réalisées, la dose utilisée ne dépassait pas les 200Gy pour la dosimétrie de Fricke. Toutefois, dans la plupart des expériences, le dosimètre de Fricke n'a pas été notre principal dosimètre car il comporte également de fortes limitations.

b) Limitation de la dosimétrie de Fricke

Une étude a été menée pour vérifier et/ou réévaluer les rendements de production de fer (III) dans nos conditions avec nos montages expérimentaux. Dans un premier temps, des irradiations en fonction du flux ont été réalisées pour vérifier la bonne utilisation de ce dosimètre dans nos conditions. En variant le flux de protons lors des irradiations, une diminution régulière des rendements en fer(III) a été observée (Figure 2-5). Le rendement intégral recalculé dans les mêmes conditions à partir des mesures de Laverne et Schuler en 1987 est de $6,8 \text{ Fe}^{3+}/100\text{eV}$. Cette valeur est proche de nos mesures pour les flux d'ions les plus bas. A de tels flux d'ions, on ne s'attend pas à des phénomènes de recouvrement de traces. Il est possible que les variations observées soient dues au fait que ce dosimètre fait intervenir également les espèces secondaires de la radiolyse de l'eau à temps de vie long (équation 2-4 à 2-6). Ces espèces étant sensible aux débit de dose variant avec le flux d'ions.

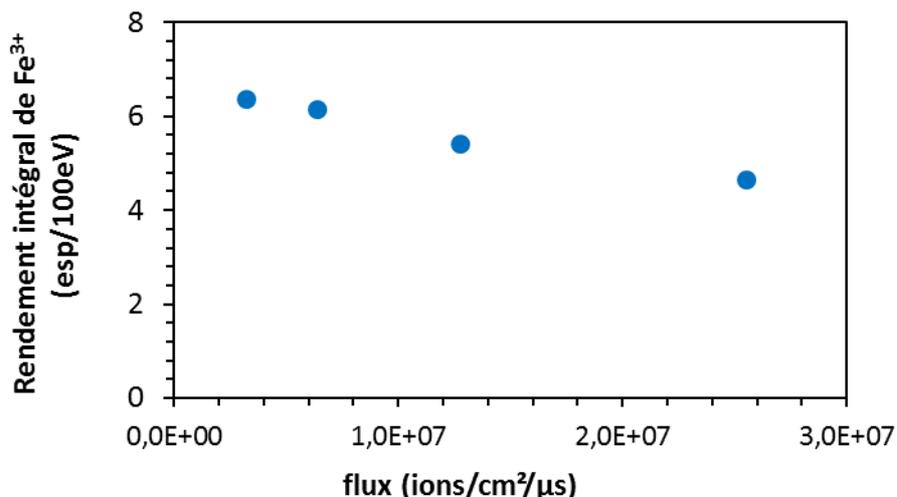


Figure 2-5 : Rendement de production de Fe³⁺ dans une solution de Fricke en fonction du flux. Expérience menée avec des protons de 1,7 MeV. Le rendement intégral calculé à partir des mesures de Laverne et Schuler en 1987 pour des protons de 1,7 MeV est de 6,8 Fe³⁺/100eV.

Au vu de l'incompatibilité de ce dosimètre avec nos conditions expérimentales, nous nous sommes finalement tournés vers des techniques dosimétriques physiques avec comme principale référence la calibration au CR-39 qui permet de compter directement le nombre d'ions réels. La dosimétrie de Fricke est tout de même restée notre référence pour les expériences à très faible débit de dose comme les irradiations gamma et les irradiations par faisceau d'ions de hautes énergies où les autres techniques de dosimétrie ont été difficiles à mettre en œuvre.

II. Sources de faisceaux d'ions

Dans le cadre des expériences présentées dans ce manuscrit, les irradiations sous faisceau d'ions se sont déroulées sur deux plateformes : la plateforme ACACIA à Strasbourg, institut Icube, UMR 7357; et le Heavy Ion Medical Accelerator, in Chiba (HIMAC) au Japon. ACACIA, en raison de sa proximité et de sa disponibilité, nous a permis de réaliser la plupart des mises au point sur nos protocoles d'irradiations, nos montages expérimentaux, nos échantillonnages ainsi que des études mécanistiques. Cependant, il n'est possible d'y utiliser que des protons de faibles énergie (jusqu'à 3,5 MeV) dans nos conditions d'irradiation. Le HIMAC, quant à lui, possède une large gamme d'ions et d'énergies disponibles, allant du proton au xénon jusqu'à 800MeV/u. Son accès, en revanche, y est plus limité et s'est fait sous la forme de campagnes d'irradiation. Les expériences d'irradiation de solutions diluées ou d'échantillons hydratés ne pouvant être réalisées sous vide, il est nécessaire de disposer de faisceaux d'ions extraits à l'air. Une fois les faisceaux extraits et caractérisés, les différents types d'échantillons sont irradiés avec les mêmes faisceaux. C'est pourquoi, lors des descriptions dans la suite de cette partie, les types de faisceaux d'ions et

leur caractérisation seront présentés indépendamment des montages utilisés pour l'irradiation des échantillons.

Les irradiations gamma, quant à elles, ont été réalisées dans le cadre des expériences au Japon ou au CEA Saclay à Paris. En effet, un irradiateur au Césium est accessible au HIMAC, de même qu'une source similaire au laboratoire LIONS à Paris-Saclay. Les expériences sur ces deux appareils sont très similaires et seront présentées de manière commune.

A. Plateforme ACACIA, Van de Graaff 4MV

1) Présentation de la plateforme ACACIA

Dans la tradition de la physique nucléaire sur le campus de Cronenbourg de Strasbourg, ACACIA fait partie de la plateforme C³-Fab rattachée à l'institut ICube de Strasbourg (UMR 7357, CNRS - Université de Strasbourg). Traditionnellement dédiées à la caractérisation, la synthèse, la modification ou l'analyse des matériaux, cette plateforme permet d'utiliser une large gamme de faisceaux d'ions allant jusqu'à 4MeV grâce à ses deux accélérateurs de particules : un implanteur de 200kV moyen courant et un accélérateur Van de Graaff 4MV. Dans le cadre de nos expériences, seuls les faisceaux de l'accélérateur Van de Graaff avaient des énergies assez élevées pour pouvoir être utilisés. Cet accélérateur est basé sur la technologie développée par le physicien américain du même nom dans les années 1930. Cette technologie permet d'atteindre des différences de potentiel de l'ordre du MV en accumulant des charges en continu sur une électrode terminale en utilisant le mouvement d'une courroie isolante. Cette technique a rapidement été adaptée pour mettre au point les premiers accélérateurs des particules électrostatiques (McKay, 2005). Dans cette lignée, l'accélérateur d'ACACIA permet d'obtenir des faisceaux d'ions sous forme gazeuse (H, D, He, C, N, O, Ne, Ar, Kr, Xe ...) avec une énergie des particules variant de 0,5 à 4 MeV pour des particules mono-chargées. La résolution énergétique est de quelques keV et les courants d'ions peuvent atteindre 200 μ A à la sortie de l'accélérateur. Des courants de l'ordre de 100nA ont généralement été utilisés pour nos expériences afin de rester dans des fluences assez basses et rendre négligeables les recouvrements de traces.

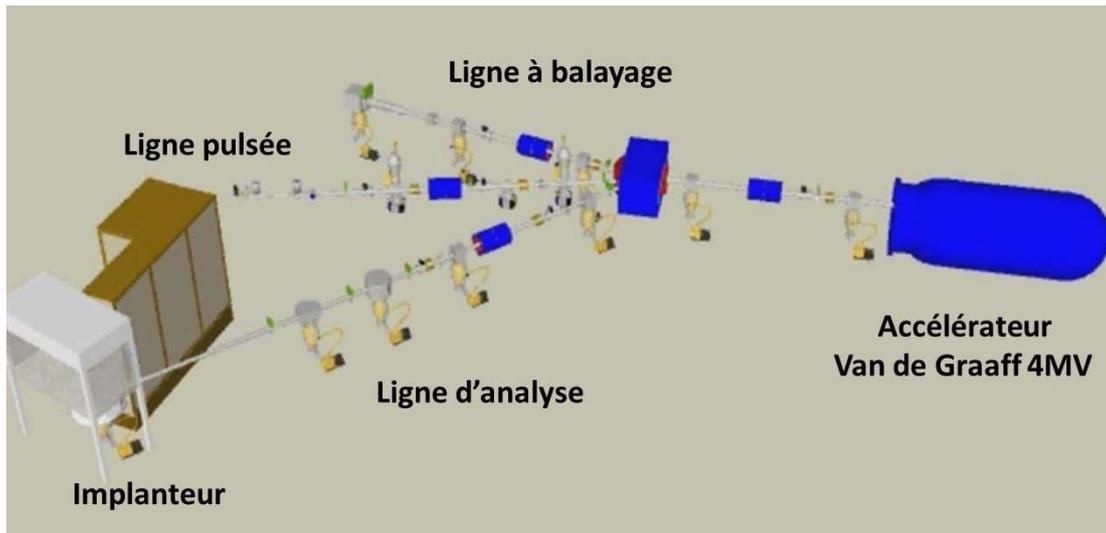


Figure 2-6 : Schéma de la plateforme ACACIA comportant un accélérateur Van de Graaff 4MV, ses trois lignes d'irradiation et un implanteur.

Trois lignes d'irradiation sont réparties à la sortie de l'accélérateur (Figure 2-6), la ligne d'analyse et la ligne pulsée n'ont pas été utilisées. La ligne d'analyse est dédiée à l'analyse physique des matériaux et la ligne pulsée ne dispose à l'heure actuelle d'aucune méthode satisfaisant de mesure de la dose dans nos conditions. Les expériences présentées ont été réalisées sur la ligne à balayage sur laquelle un montage expérimental d'extraction des faisceaux à l'air a été développé pour l'irradiation de nos échantillons.

2) Caractéristiques de la sortie air et dosimétrie.

La nature des échantillons, liquides ou solides et hydratés, rend les expériences impossibles sous vide. Ainsi, une sortie à l'air des faisceaux d'ions a été développée sur la ligne à balayage de la plateforme ACACIA. Cette dernière dispose d'un faisceau 5mm de diamètre balayé en XY sur une surface maximale de 4x4cm. Le balayage est réalisé avec une composante X rapide de 517Hz et Y plus lente de 64Hz, garantissant l'homogénéité du faisceau sur la surface balayée. Le courant de spot (non balayé) est généralement fixé à environ 200nA, ce qui conduit à des fluences instantanées de l'ordre de $6,4 \times 10^6$ ions/cm²/µs en tenant compte du balayage. En fin de ligne, il a été possible de développer un montage permettant l'irradiation sur un disque de 1,5cm de diamètre et le suivi de la dose en continu.

Inspirée de la ligne à faisceau extrait développée sur la plateforme Radiograaff à Lyon (Constanzo, 2013) une fenêtre de Mylar (polyéthylène téréphtalate) de 12µm d'épaisseur avec une face aluminisée a été utilisée comme membrane pour l'extraction de faisceau. L'aluminium est placé du côté extérieur afin d'empêcher des phénomènes d'oxydation du polymère sous l'oxygène sous radiolyse, mais également pour permettre la bonne élimination des charges dans la membrane.

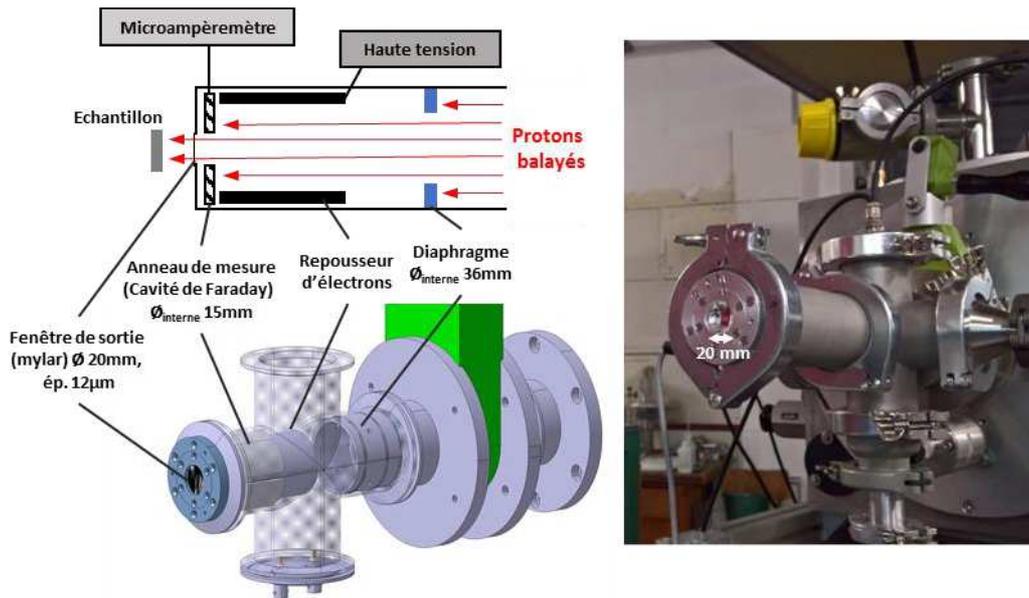


Figure 2-7 : Schéma et photo de la sortie air à balayage développée sur la plateforme ACACIA.

Les ions, en traversant la membrane, vont perdre une partie de leur énergie. Ces pertes ont été systématiquement quantifiées par le logiciel SRIM (Ziegler et al., 2010). Ainsi, des protons de 3,5 MeV perdent 0,17 MeV et des protons de 1 MeV perdent 0,44 MeV lors de leur extraction (Figure 2-8). Sous l'action du vide poussé, généralement inférieur à 6×10^{-5} mbar, la fenêtre est en déplétion d'une longueur maximale estimée à 3,5 mm en son centre. Cette déplétion entraîne une différence de parcours pour les ions centraux et latéraux à la fenêtre qui résulte en une différence d'énergie de 30 à 100 keV pour des protons de 3,5 à 1 MeV, soit 1 à 10%.

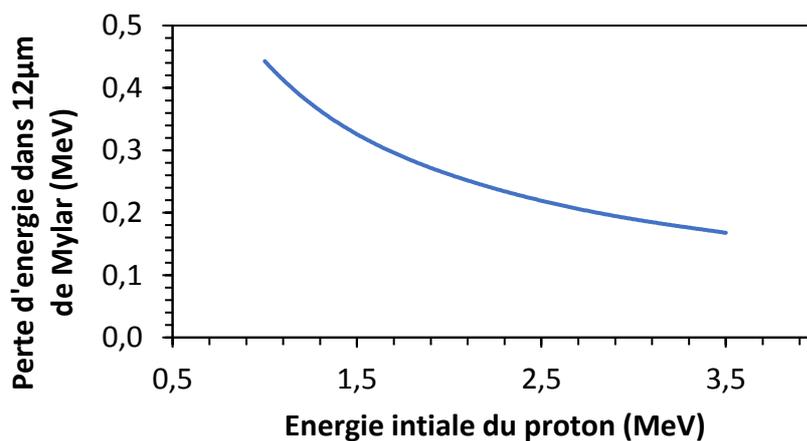


Figure 2-8 : Perte d'énergie à travers la membrane de Mylar des protons extraits sur la plateforme ACACIA

Le diaphragme additionné à la cavité de Faraday en forme d'anneau juste avant la membrane de Mylar permet le suivi en ligne de la fluence des ions. Le faisceau étant homogène sur la surface balayée, en connaissant précisément l'aire de l'anneau de mesure (cercle de diamètre 36 mm avec

un trou de 15mm en son centre), il est possible de déterminer une fluence en ions/cm² traversant la membrane et arrivant à l'échantillon (équation 2-12).

$$F = \frac{Q}{1,6 \times 10^{-19} \times A_{\text{anneau}}}$$

F : Fluence (ions/cm²)

Q : Somme des charges (Cb)

$1,6 \times 10^{-19} = 1 \text{ Cb}$: Charge élémentaire

Anneau : 8,41 cm² : Aire de la cavité de Faraday

Équation 2-12 : Calcul de la fluence à partir de la charge. Sortie air, plateforme ACACIA

3) Comparaison des mesures de fluences

La mesure directe du courant sur la cavité Faraday a été comparée aux mesures réalisées par CR39, l'accord obtenu entre les deux mesures est jugé satisfaisant (Figure 2-9). Par la suite, la mesure de la charge déposée sur la cavité de Faraday sera donc utilisée pour déterminer les fluences irradiées.

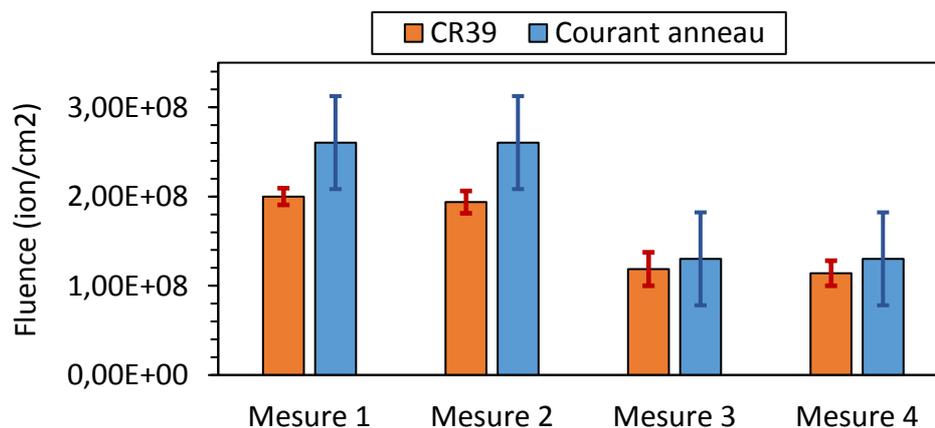


Figure 2-9 : Calibration d'un faisceau de protons de 2 MeV, plateforme ACACIA.

A. Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba (HIMAC)

Les irradiations réalisées au HIMAC sont très complémentaires des irradiations réalisées sur la plateforme ACACIA. En effet, une fois les expériences développées et optimisées à Strasbourg, elles ont pu être transposées au HIMAC, qui offre la possibilité d'irradier avec une large gamme d'ions et d'énergie. De cette manière, il est possible d'étudier les effets de TEL et de masse des ions.

1) Premier centre mondial de Carbothérapie

L'institut national des sciences radiologiques japonais (National Institut for Radiologique Sciences – NIRS) a été fondé en 1957. Son centre, situé à Chiba, a pour vocation d'étudier les effets des rayonnements sur le corps humain, sur l'environnement mais aussi de développer des applications médicales des rayonnements comme la radiothérapie et l'imagerie. Dans ses premières années, des traitements de radiothérapie ont été menés avec des sources cobalts dans le centre. Par la suite, la construction d'un cyclotron a permis d'étudier la radiothérapie avec des neutrons et de développer le premier scanner PET pour application médicale. Tout en continuant les recherches sur la radio-toxicité, les avantages physiques et biologiques que présentent les ions pour la thérapie ont motivé la construction du HIMAC qui devient par la suite le premier hôpital expérimental au monde utilisant la thérapie aux ions carbone. A ce jour (fin 2016), le HIMAC a permis le traitement de plus de 10 000 patients par faisceaux d'ions carbone ("PTCOG - Patient Statistics,"). En journée, les installations sont utilisées pour la thérapie et la nuit, pour la recherche. De ce fait, l'accès à des faisceaux de calibres médicaux a fait du HIMAC un centre mondial d'études des rayonnements ionisants. En 2015, une cinquantaine d'instituts internationaux entretiennent des collaborations avec le NIRS permettant l'accès aux faisceaux d'ions du HIMAC.

Le HIMAC est composé de deux accélérateurs linéaires en série de type LINAC (ACcélérateur LINéair) permettant, par un jeu d'électrodes successives en fonctionnement alternatif, d'accélérer des faisceaux d'ions pulsés à une énergie de 6MeV/u. Par la suite, les ions sont injectés dans un des deux synchrotrons en parallèle, où l'accélération a lieu uniquement dans une section de l'anneau. Après de nombreux tours successifs et donc autant d'accélération successives, les ions atteignent des énergies allant jusqu' 800 MeV/u et sont délivrés sous forme de faisceaux pulsés (Figure 2-10). Seuls les ions carbone sont utilisés en thérapie, mais pour la recherche, une vaste gamme d'ions est accessible (H, He, C, O, Ne, Ar, Fe, Kr, and Xe). Les caractéristiques des faisceaux seront détaillées par la suite car elles sont variables en fonction des salles d'irradiation.

A l'heure actuelle, trois salles de traitement sont en activité et se situent dans le nouveau bâtiment de traitement expérimental (Figure 2-10). Jusqu'à fin la des années 2000, des masques étaient utilisés pour reconstruire la forme de la tumeur sur des faisceaux larges dans les anciennes salles de traitement. Depuis le développement du nouveau bâtiment de traitement, les salles aujourd'hui en activité utilisent un faisceau « pinceau » qui adapte l'énergie des particules pour redessiner la tumeur en profondeur. Deux de ces salles disposent de ports verticaux et horizontaux pour le traitement et dans la troisième, une ligne rotative y a été développée pour irradier à 360° (Iwata et al., 2013).

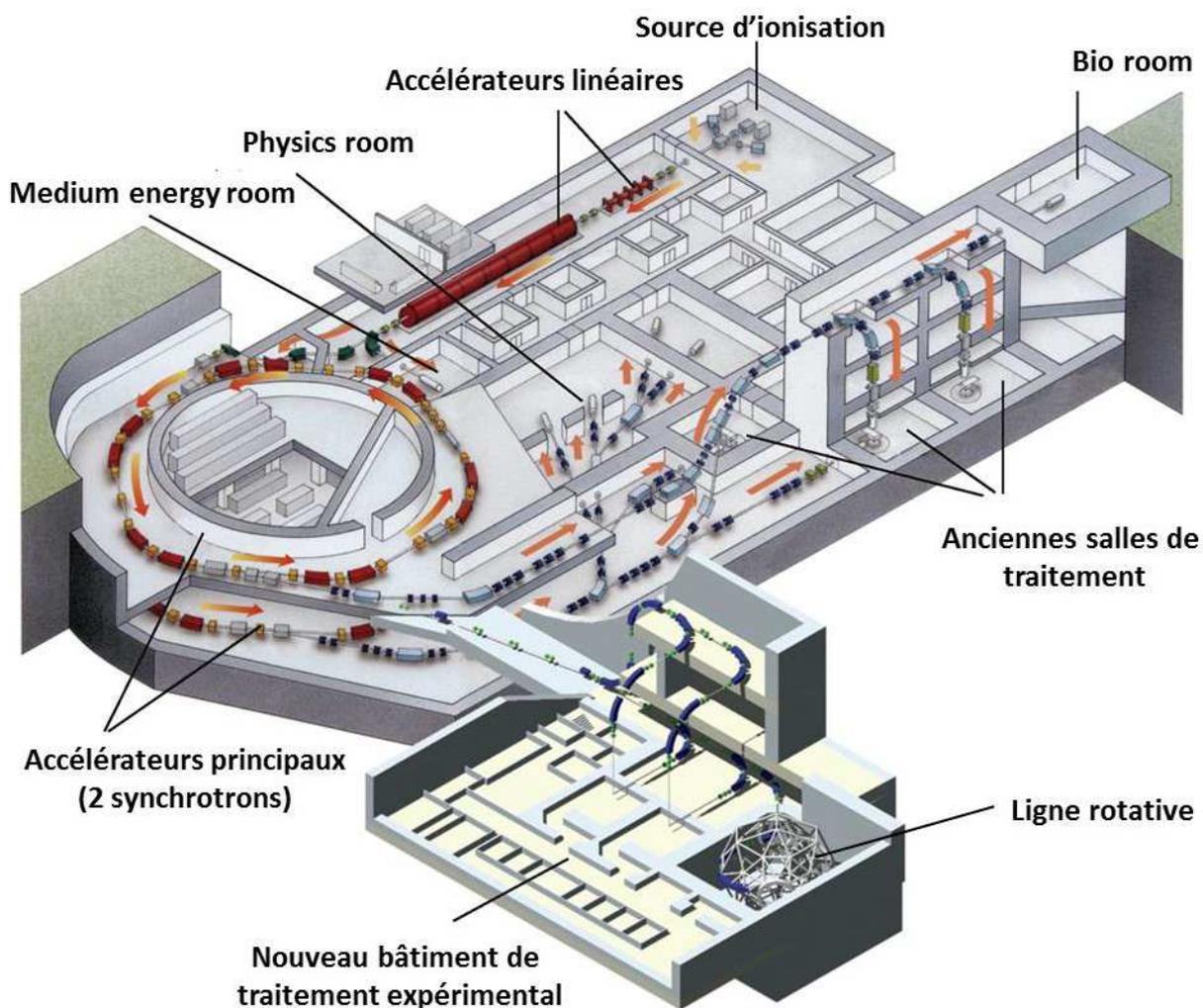


Figure 2-10 : Schéma du HIMAC, salles de traitement et salles d'expériences

Trois salles de recherche sont présentes au HIMAC et correspondent à trois types de faisceaux d'ions (Figure 2-10). La « medium énergie room » (MEXP) est dédiée à l'irradiation avec des particules de faible énergie qui proviennent directement des accélérateurs linéaires donc d'énergie nominale de 6 MeV/u quel que soit l'ion. La « physics room » (PH) qui délivre des faisceaux de hautes énergies à de fortes intensités est dédiée aux applications physiques. La « bio-room », quant à elle, délivre des faisceaux larges (10 cm de diamètre) et de hautes énergies pour des applications biologiques. Par la suite, seront présentées en détails la « medium énergie room » et la « physics room » où des expériences ont été menées dans le cadre de cette thèse.

2) Expériences au HIMAC

Le groupe de Radiochimie de l'IPHC entretient des relations de longue date avec le NIRS et des équipes japonaises. Une coopération internationale a récemment été mise en place dans le cadre

d'un projet IOL (International Open Laboratory) du NIRS permettant la réalisation d'expériences au HIMAC. Cette coopération dirigée conjointement par le Dr Satoshi Kodaira (NIRS) et le professeur Rémi Barillon (IPHC/Radiochimie) s'intitule « Radiation damage mechanism at molecular level approached with physicochemical technologies ». Ma thèse s'intègre dans ce projet.

J'ai également été lauréat d'une bourse d'échange de la JSPS (Japanese Society for the Promotion of Science) qui m'a permis de réaliser un séjour de deux mois à Chiba (Janvier-Février 2018) au cours duquel j'ai pu réaliser plusieurs expériences sous faisceau d'ions.

Tableau 2-2 : Récapitulatif des irradiations menées au HIMAC.

Date de la campagne	Salle d'expériences	Type d'ion, énergie et nombre de nuits d'irradiation
Octobre 2016	MEXP	H ⁺ , 6 MeV
Février 2017	MEXP	H ⁺ , 6 MeV C ⁶⁺ , 72 MeV
Juillet 2017	MEXP	C ⁶⁺ , 72 MeV x2
Janvier et Février 2018	MEXP	He ²⁺ , 24 MeV x3
	PH	H ⁺ , 230 MeV C ⁶⁺ , 4800 MeV
Juin 2018	MEXP	He ²⁺ , 24 MeV C ⁶⁺ , 72 MeV x2
	PH	C ⁶⁺ , 4800 MeV

Au total, cinq campagnes d'irradiation ont permis de réaliser 14 expériences dans la « medium energy room » et la « physics room » du HIMAC. Toutes les deux délivrent des faisceaux d'ions extraits à l'air.

a) Medium Energie room (MEXP) et dosimétrie

La medium energy room a été développée pour obtenir des faisceaux d'ions à des énergies proches du pic de Bragg pour des applications entre autres biologiques (Konishi et al., 2005; Yasuda et al., 2005). En effet, se situant entre les accélérateurs linéaires et les synchrotrons du HIMAC (Figure 2-10), les faisceaux d'ions ont alors une énergie de 6 MeV/u. Ils sont homogènes sur un disque de 2 cm de diamètre et sont pulsés. La fréquence du pulse est de 1,65 s avec une largeur allant de 1 à 700 µs. En modifiant la largeur du pulse ou en utilisant des atténuateurs électromagnétiques, il est possible d'obtenir des fluences comprises entre 10³ à 10¹⁰ ions/cm²/pulse. Pour nos expériences nécessitant des doses élevées sur des volumes conséquents,

on se place généralement dans les conditions d'irradiation les plus rapides, donc à des fluences de l'ordre 10^{10} ion/cm²/pulse qui sont équivalentes à des débits d'ions instantanés de l'ordre de 10^7 ion/cm²/μs.

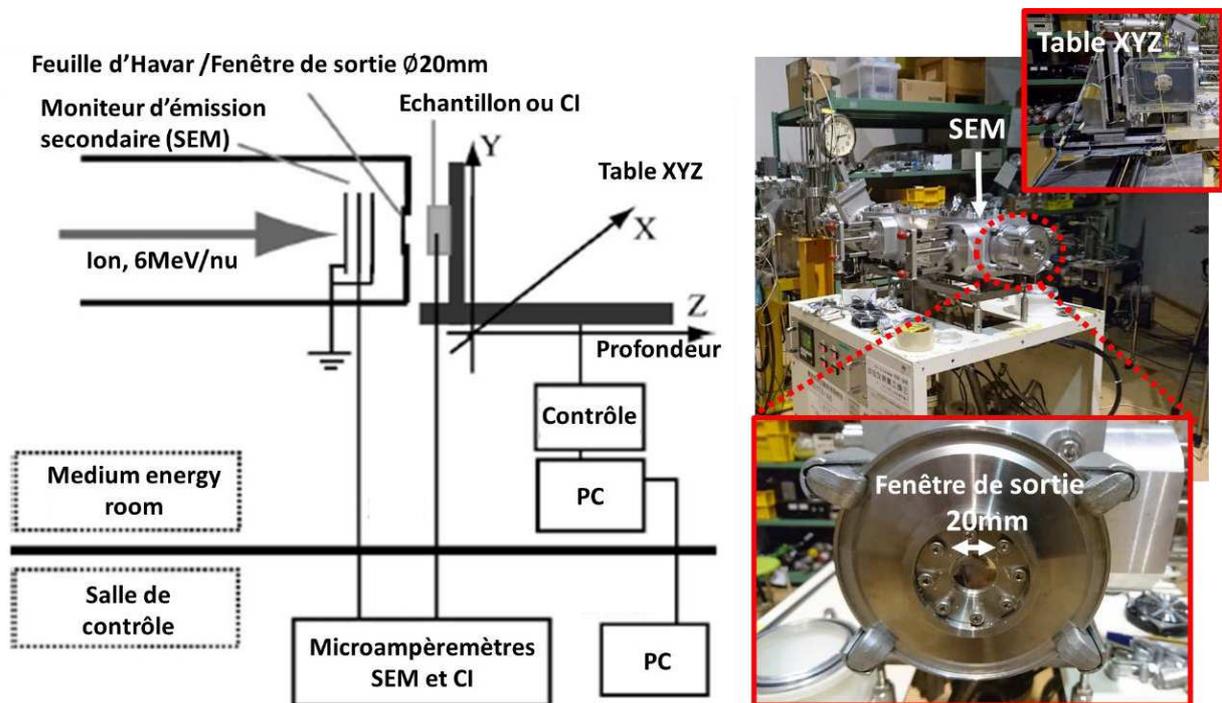


Figure 2-11 : Schéma et photos de la sortie air dans la medium energy room, HIMAC. Figure adaptée d'après (Konishi et al. 2005).

Une feuille de 6μm d'épaisseur et de 20mm de diamètre de havar (alliage composé principalement de cobalt, de chrome et de nickel) est utilisée comme sortie du faisceau d'ion à l'air (Figure 2-11). Dans la ligne, sous vide, un moniteur d'émission secondaire (SEM) traversé par les ions donne un signal proportionnel à la fluence. L'utilisation d'une table XYZ permet des déplacements précis du support dans les trois directions. En pratique, les expériences sont réalisées après alignement de l'origine en X et en Y par rapport au faisceau. Une variation selon l'axe Z, correspondant à la profondeur, permet de dégrader l'énergie des ions incidents avant l'arrivée dans l'échantillon.

En début d'expérience, pour la calibration du faisceau d'ion, une chambre d'ionisation (CI) est positionnée sur le support à échantillon. Cette dernière permet de reconstruire le pic de Bragg du faisceau en variant l'axe Z pour connaître la distance parcourue dans l'air par les ions. Une simulation SRIM permet alors de déterminer l'énergie du faisceau avec précision en connaissant le pouvoir de pénétration des ions dans l'air (Figure 2-12 (2) et (3)). De même, des mesures par CR39 sont faites en fonction de la profondeur afin d'estimer la fluence correspondant au signal du SEM en fonction de la distance sur l'axe Z (Figure 2-12 (1)). On observe une diminution des fluences en ions en fonction de la profondeur en raison des phénomènes de diffusion (discutés en chapitre I.) En pratique, des diffusions conséquentes ont été observées avec les ions de faible masse, protons et particules alpha, et une diffusion nulle a été mesurée avec des ions carbone.

Lors des expériences d'irradiation, la profondeur Z peut être variée pour modifier l'énergie des ions accélérés dans nos échantillons.

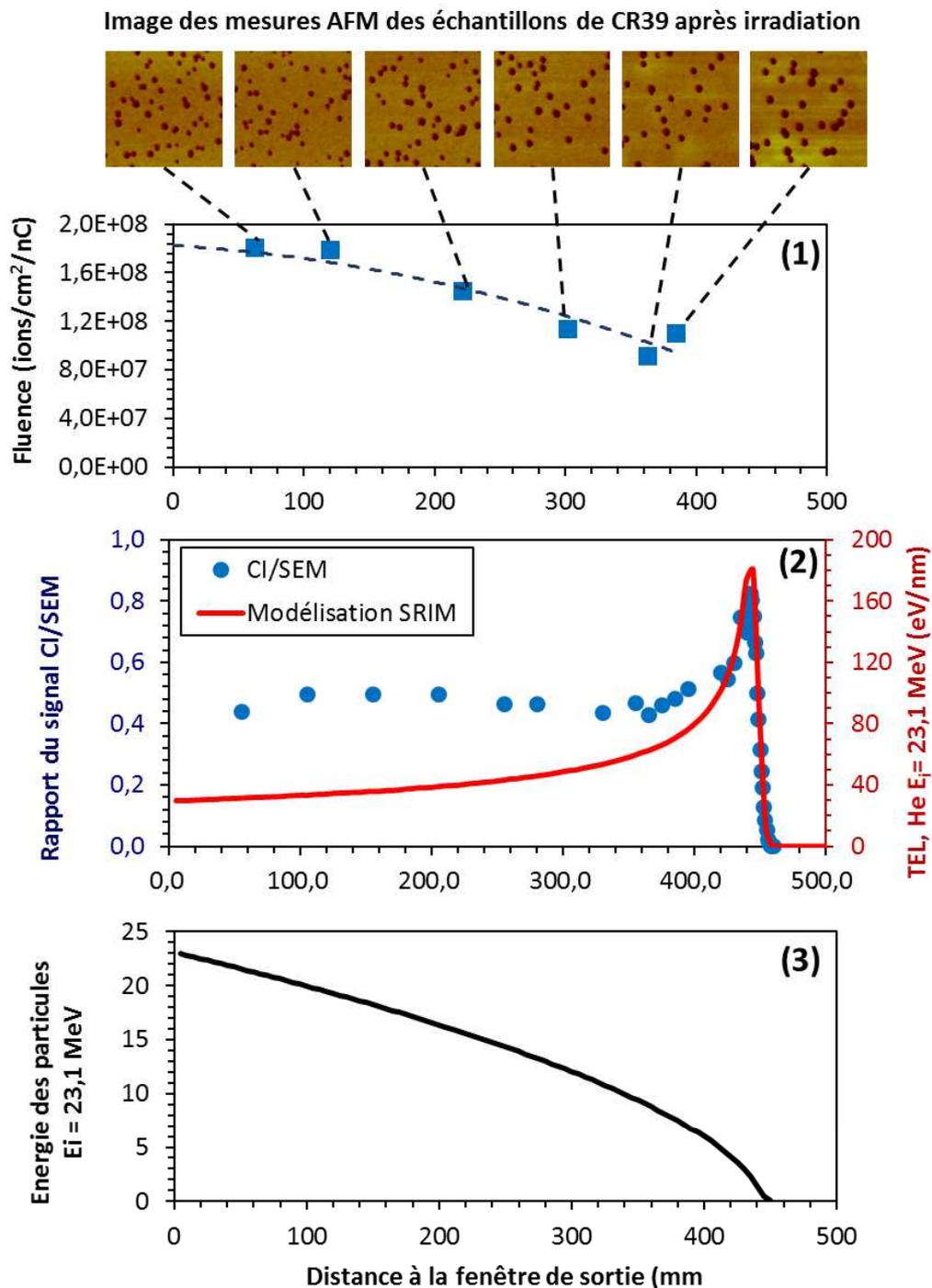


Figure 2-12 : Calibration d'un faisceau de particules alpha au HIMAC, medium énergie room. (1) : Mesure de la diffusion du faisceau de particules alpha par irradiation de CR-39 en fonction de la distance dans l'air des particules. Les traces après attaque chimique sont mesurées par AFM. (2) Mesure de la position du pic de Braag avec la chambre d'ionisation (CI) et estimation du TEL en fonction de la distance par SRIM. (3). Simulation de la perte d'énergie du faisceau en fonction de la distance sur SRIM.

b) Physics room (PH)

La « physics room » est la salle d'expérience du HIMAC permettant l'accès à des faisceaux d'ions de haute énergie allant jusqu'à 800 MeV/u avec des fortes intensités, elle est généralement dédiée à des applications de physique. Cette salle d'expériences est située à la sortie du synchrotron inférieur (Figure 2-10) et possède 4 sorties de faisceaux. Deux sont identiques et sont dédiées à l'utilisation de faisceaux natifs, les deux autres permettent l'étude de faisceaux de particules secondaires générées par impact sur des cibles. Dans notre cas, seuls des faisceaux natifs ont été étudiés : des protons de 230MeV et des ions carbonés de 4,8GeV.

Les ions sont délivrés sous forme d'impulsions avec un délai de 3,3 secondes entre chaque pulse. Les durées des pulses sont de 2 secondes pour les carbonés et 1,3 seconde pour les protons. Les fluences par pulse s'étendent de 1×10^6 à 1×10^{10} ions/pulse. Pour nos expériences, elles étaient de l'ordre de 2×10^9 ions/pulse. Le faisceau est annoncé comme étant homogène sur un diamètre de 5mm puis la quantité d'ion décroît de manière exponentielle sur les extrémités de cette zone de stabilité. Ces caractéristiques conduisent à des débits de dose de l'ordre de 3×10^3 ions/cm²/μs. Les faisceaux sont extraits à l'air au travers d'une feuille de titane de 2 mm d'épaisseur.

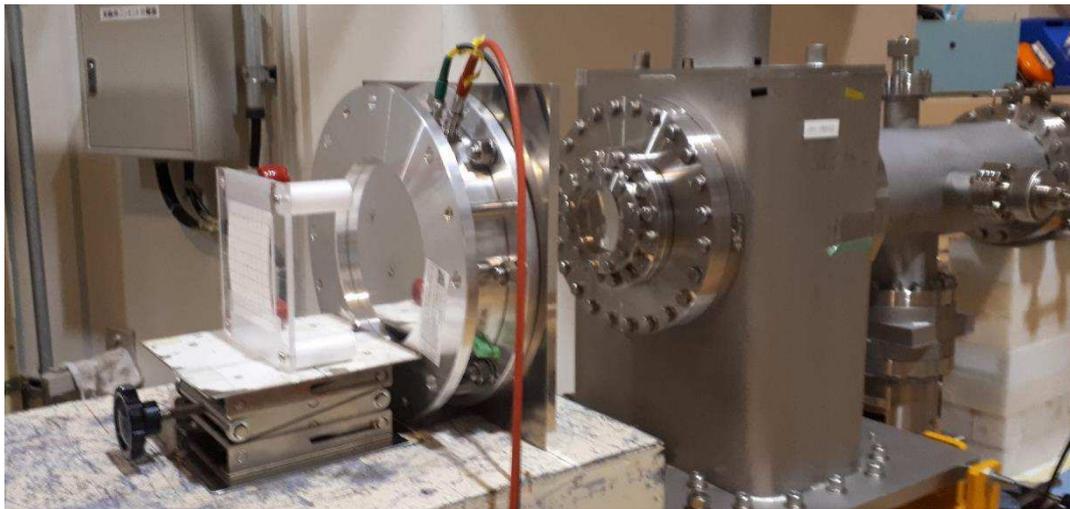


Figure 2-13 : Photo de la sortie air des faisceaux de la physics room. La chambre d'ionisation est placée devant la sortie et reste en place durant les irradiations.

Pour nos mesures, une chambre d'ionisation constituée de 5 feuilles d'acier de 15μm est traversée. La distance d'air entre l'échantillon et le faisceau est d'environ 4 mètres. L'énergie des ions peut être dégradée en utilisant des épaisseurs contrôlées d'aluminium, mais seuls des faisceaux natifs aux énergies maximales ont été utilisés dans ce manuscrit à l'arrivée, dans nos échantillons. Les débits d'ions

III. Supports et montages d'irradiation sous faisceau d'ions

Dans cette partie, seront introduits les supports et les montages d'irradiation développés pour l'irradiation de solutions diluées et de gel de protéines. Les montages expérimentaux et les conditions d'irradiation seront présentés indépendamment pour chaque type d'expérience.

A. Irradiation de solutions diluées

1) Irradiation de solutions diluées par des ions de faibles énergie

a) Cellule d'irradiation « faible énergie »

La cellule d'irradiation « faible énergie » a été développée pour permettre des expériences avec des énergies proches du pic de Bragg (**Figure 2-14**). Une membrane de 12 μm d'épaisseur de Mylar aluminisée permet l'introduction des ions en solution avec des pertes d'énergie raisonnables. La solution est alors irradiée dans une cavité de 1,5 cm de diamètre et de profondeur 4mm où les ions, peu pénétrants à ces énergies, sont totalement arrêtés dans la solution (**Figure 2-14 (B)**). Les mesures réalisées via ce montage sont donc intégrales. La cellule a été développée en PEEK (polyetheretherketone) car c'est un matériau solide et très inerte chimiquement (**Figure 2-14 (A)**). Elle comporte une pastille d'acier pour fermer et bloquer la membrane de Mylar contenant un joint torique assurant l'étanchéité (**Figure 2-14 (C)**).

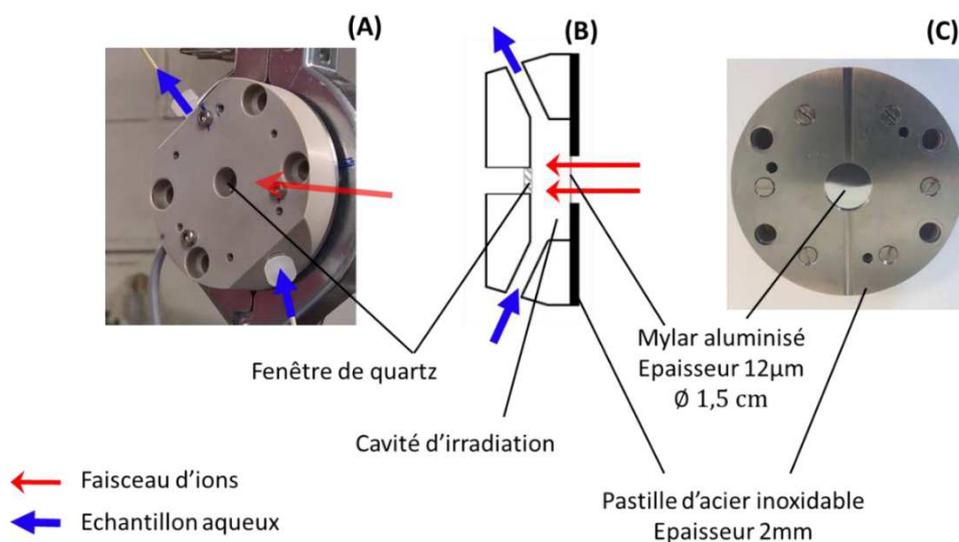


Figure 2-14 : Schéma et photos de la cellule "basses énergies"

A l'opposé de la membrane en Mylar, une fenêtre en quartz permet de vérifier le bon déroulement des irradiations. En effet, bien que la solution soit aspirée par le haut, il n'est pas rare d'avoir des bulles dans la cellule qui pourraient perturber la radiolyse. Cette fenêtre en quartz est aussi prévue pour de futurs développements de radiolyse pulsée, où elle permettra de laisser passer une source d'excitation puis de récupérer la lumière émise par l'échantillon pour une détection par fluorescence.

Cette cellule s'adapte sur la sortie air de la plateforme ACACIA ainsi que sur la table XYZ de la medium energy room du HIMAC pour laquelle un portoir spécifique a été développé. Le bilan total des pertes d'énergie des particules depuis l'accélérateur, jusqu'à la solution, est réalisé à l'aide du logiciel SRIM (Ziegler). Par exemple, dans le cas d'un faisceau de protons d'énergie initiale de 2,6 MeV sur la plateforme ACACIA, le faisceau traverse la membrane de sortie de l'accélérateur, de l'air et la membrane de la cellule faible énergie pour entrer en solution avec une énergie 2,05 MeV (Figure 2-15).

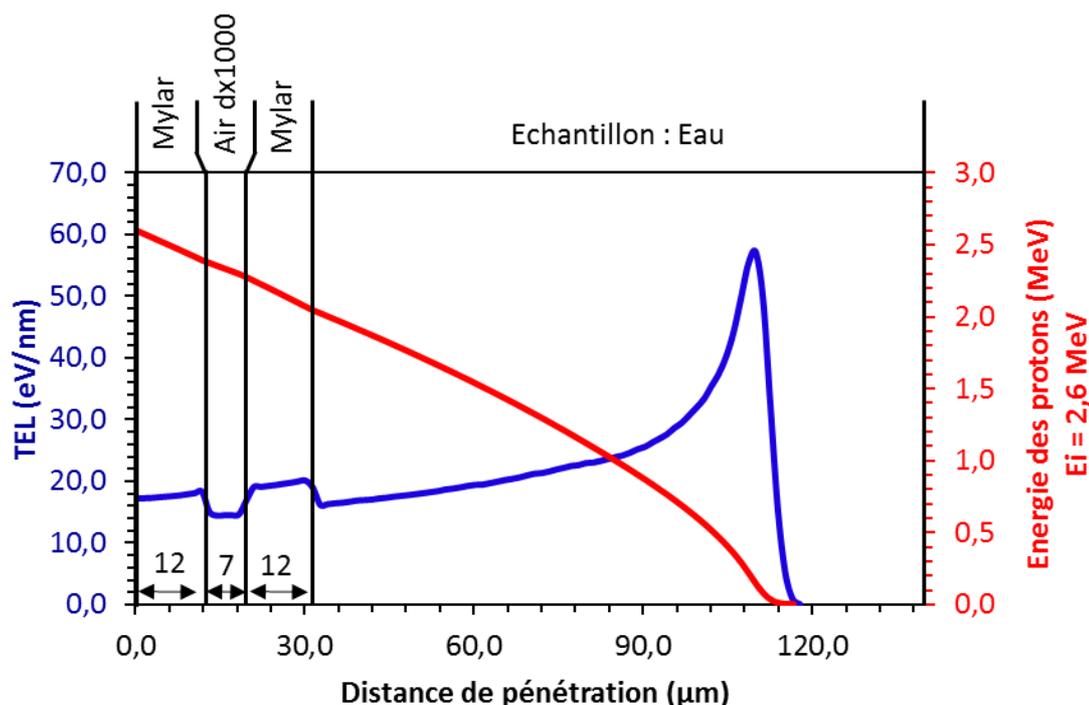


Figure 2-15 : Pertes d'énergie d'un faisceau de protons de 2,6MeV associées à la cellule "basse énergie" sur la plateforme ACACIA. Simulation réalisée sur SRIM, les distances prises en compte sont les suivantes : deux membranes de 12 μm de Mylar et 7 mm d'air regroupant les déplétions des deux membranes et l'espace cellule-sortie air. Pour des raisons propres à la simulation sur SRIM (quantité de points limités), la profondeur d'air est divisée par 1000 et sa densité est multipliée par 1000.

b) Montage à circulation et suivi en ligne.

La cellule d'irradiation est connectée à un circuit à circulation en PEEK permettant d'abord d'y introduire l'échantillon puis de faire circuler ce dernier en circuit fermé pendant l'irradiation. Les tuyaux en PEEK ont un diamètre interne de 0,625mm et la circulation est assurée par une pompe péristaltique Watson-Marlow S100 DV114 imposant un débit fixé à 40mL/min dans les conditions standards. Lors d'une expérience typique après rinçage du circuit et de la cellule puis conditionnement avec l'échantillon, l'irradiation se fait sur un volume total compris entre 8 à 15 mL. Ce dernier comprend le volume du circuit, de l'ordre de 5 à 6 mL, et le volume de la réserve d'échantillon de 2 à 10 mL variable en fonction des prélèvements réalisés au cours de l'irradiation. A chaque irradiation, le volume total de l'échantillon doit être précisément connu car la dose déposée dépend de la masse de l'échantillon et est moyennée dans le volume total irradié. Des techniques de suivi en ligne peuvent être adaptées à ce circuit. A l'aide de cuves à circulation spécifiques, il est possible de réaliser des suivis en ligne par UV-Visible et/ou de fluorescence. Sur la plateforme ACACIA, un spectromètre Agilent DAD Cary 8454, équipé d'une technologie à barrette de diodes permet l'enregistrement du spectre UV-Visible sur toute la gamme en suivi cinétique. Le système a également été adapté pour un suivi en ligne par fluorescence à l'aide d'un spectrofluorimètre HORIBA Jobin Yvon Fluoromax 4 et une cuve à circulation à 90°C adaptée pour la fluorescence. Cependant, le suivi par fluorescence n'a pas été exploité pour les expériences discutées dans le présent manuscrit.

Dans la medium energy room du HIMAC, le même montage est utilisé avec un suivi en ligne par UV-Visible Figure 2-16. Un spectromètre UV-Visible HITACHI U-3900H est utilisé, il permet un suivi en ligne à longueur d'onde fixe ou en réalisant un spectre en arrêtant momentanément l'irradiation et la circulation.

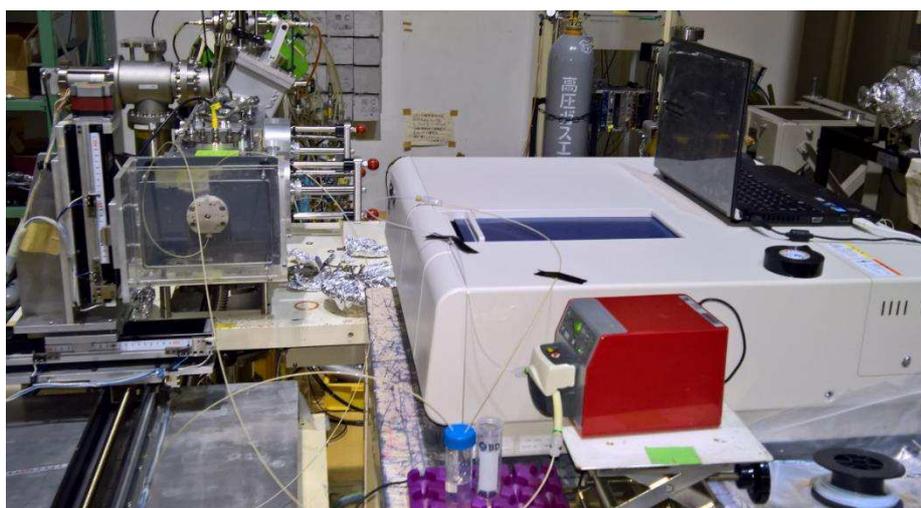


Figure 2-16 : Montage à circulation dans la medium énergie room du HIMAC. A gauche, la cellule à circulation et la ligne d'irradiation, à droite la pompe péristaltique et le spectromètre UV-Visible

2) Irradiation de solutions diluées par des ions de hautes énergies

a) Cellule d'irradiation « haute énergie »

Les ions de hautes énergies étant beaucoup plus pénétrants que les ions de faibles énergies, le montage décrit précédemment ne peut pas être utilisé pour ces expériences. C'est pourquoi des cellules spécifiques pour ces expériences ont été développées. Ces cellules sont en PEEK et elles sont principalement constituées d'une cavité cylindrique dans laquelle circule la solution (Figure 2-17). Le canal d'irradiation mesure 8mm de diamètre pour 5cm de long. 5 cm permet un dépôt d'énergie conséquent ($dE=TEL \times 5\text{cm}$) des particules avec un TEL à peu près constant. Les cellules sont fermées aux extrémités par des disques d'acier ou de PEEK de 1,5mm d'épaisseur. Un support spécifique en V a également été développé afin de positionner toutes les cellules à la suite. Les hautes énergies permettent des irradiations simultanées de cellules en série. L'alignement par rapport au faisceau lors de ces expériences est crucial. Des irradiations préliminaires sont réalisées avec des films Gafchromic EBT3 (Ashland Inc.) révélant la position du faisceau pour l'ajustement du montage.

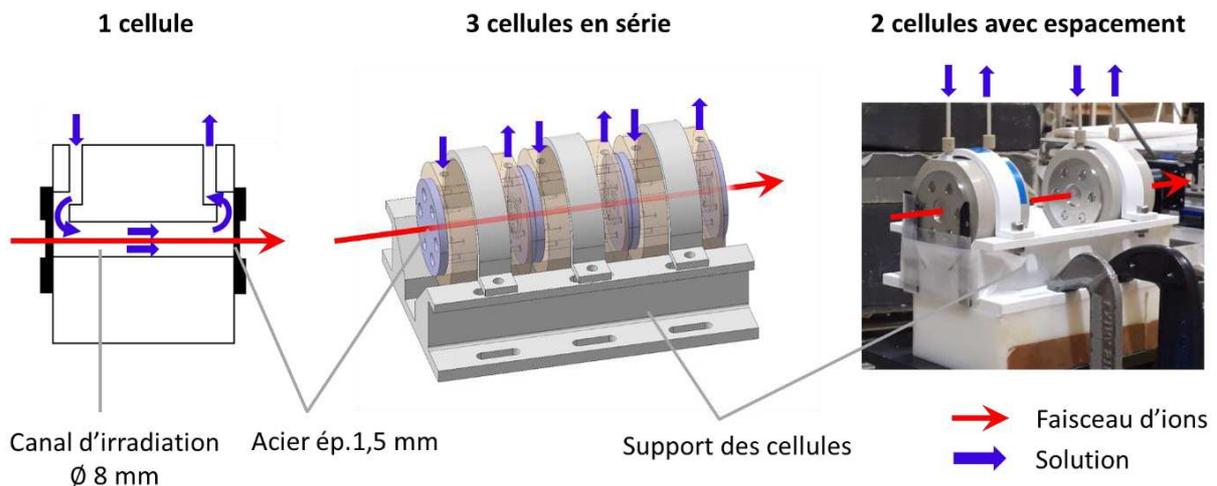


Figure 2-17 : Schéma et photo explicatifs de l'utilisation des « cellules hautes énergies ». Il est possible d'en irradier jusqu'à 3 en simultané.

A nouveau, les pertes d'énergies associées à ce montage dans la « physics room » sont calculées à l'aide du logiciel SRIM (Figure 2-18). L'échantillon dans la cellule n°1 représente un faisceau d'ions natif, dans les cellules 2 et 3 les énergies sont plus faibles et le faisceau est dégradé car avec des ions de hautes énergies, la fragmentation n'est plus négligeable. Pour exemple, on obtient à partir d'un faisceau natif d'ion carbones de 4,8 GeV, des énergies moyennes de 4,3, 3,5 et 2,6 GeV en solution représentant des TEL de 11,3, 12,6 et 15,7 eV/nm.

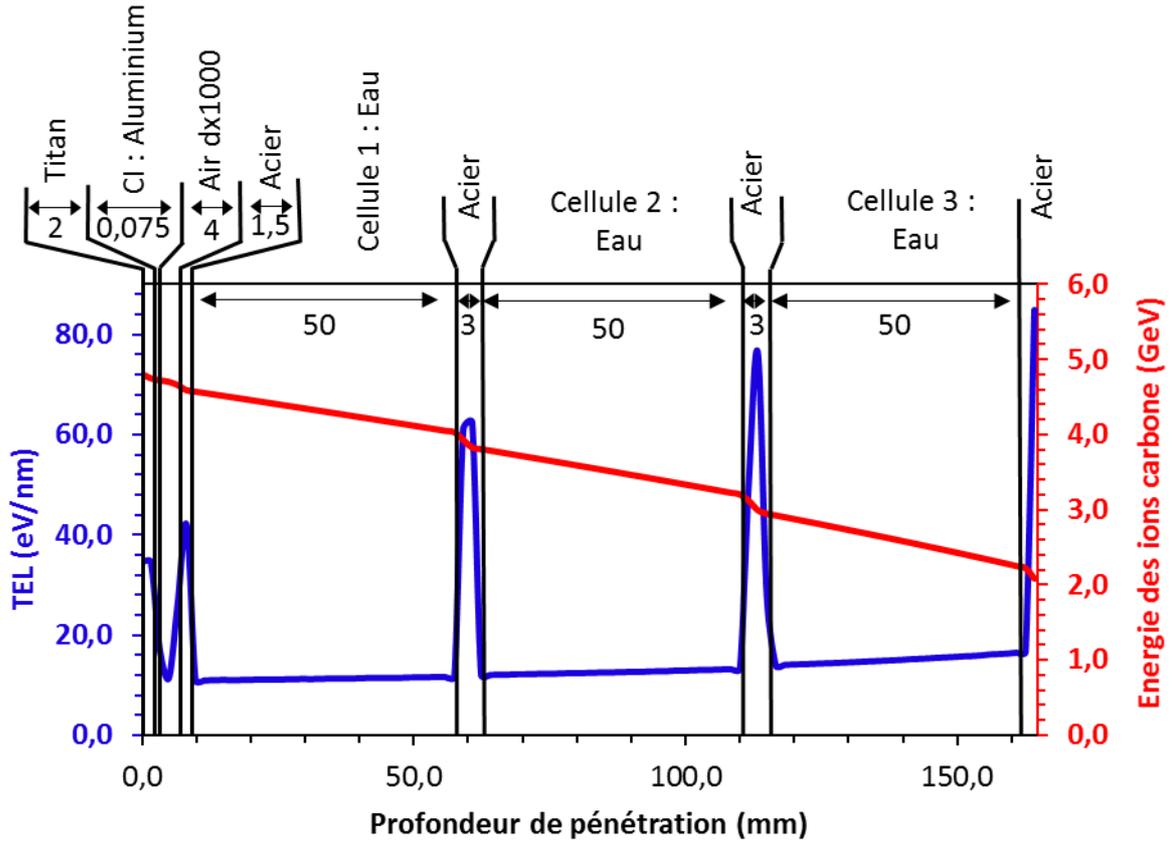


Figure 2-18 : Pertes d'énergie d'un faisceau d'ions carbone d'énergie 4,8GeV au travers de trois cellules "hautes énergies" dans la physics room HIMAC. Simulation réalisée sur SRIM, les distances prises en compte sont les suivantes : 2mm de la fenêtre d'extraction en Titan, 0,075mm d'épaisseur de la CI en aluminium, 4m d'air puis les cellules de 5cm d'échantillon avec les fenêtres respectives de 1,5mm d'acier. Pour des raisons propres à la simulation sur SRIM (quantité de points limités), la profondeur d'air est divisée par 1000 et sa densité est multipliée par 1000.

b) Montages à circulation

Des montages à circulation permettent l'irradiation dans les cellules sur le même principe que pour la cellule « basse énergie ». Deux pompes péristaltiques assurent la circulation de trois échantillons indépendants dans chaque cellule d'irradiation. La première est une pompe Watson-Marlow S100 DV114 avec une tête de pompe, la seconde une pompe Masterflex Cole-Palmer avec deux têtes indépendantes de type Easy-Load. Les tuyaux en PEEK de diamètre interne 1,25 mm sont utilisés avec des débits de l'ordre de 100 mL/min afin de renouveler totalement la solution dans les cellules entre chaque pulse.

B. Irradiation de gels de protéines

1) Contraintes d'échantillonnage

L'étude des effets directs de radiolyse impose de nombreuses contraintes pour des échantillons de protéine :

- Les échantillons doivent être suffisamment concentrés pour que les effets directs soient représentatifs.
- Les échantillons doivent être fins et d'épaisseur contrôlée pour contrôler le dépôt d'énergie mais également, pour permettre l'analyse par spectroscopie optique.
- Les échantillons doivent être stables à la verticale pour permettre l'irradiation et l'analyse.

Ainsi, des échantillons de protéines sous forme de gel hydraté d'environ 30% en masse ont été développés pour cette étude. Ils sont réalisés à l'aide d'un agent crosslinker, le glutaraldéhyde qui reste faiblement concentré par rapport à la protéine. Ces gels sont formés avec une épaisseur de 5 μ m entre deux feuilles de polypropylène de 5 μ m d'épaisseur par pressage à l'aide de calles de clinquant de 5 μ m. Les détails de la réalisation des gels seront explicités plus en avant dans leur partie spécifique sur l'étude des effets directs de radiolyse de la myoglobine.

2) Cellule d'irradiation des gels à basses énergies

Une fois les échantillons préparés, une cellule étanche permettant l'irradiation avec des ions de basses énergie et l'analyse infra-rouge en ligne a été développée (Figure 2-19). Celle-ci a été conçue de manière à pouvoir être aussi proche que possible de la sortie air du faisceau tout en étant placée dans un spectromètre infrarouge ALPHA Brucker. Le suivi est essentiel pour réaliser des mesures reproductibles nécessaires à une bonne analyse du gel. La cellule développée comporte deux fenêtres de ZnSe permettant de réaliser les analyses par infrarouge. Ces fenêtres ont de bonnes transmittances dans la gamme utile pour nos échantillons entre 4000 et 700 cm^{-1} . L'irradiation est possible par l'utilisation d'une membrane d'entrée dans la cellule de 5 μ m de Mylar aluminisé. Lors des irradiations, le gel est placé au plus près de fenêtre d'irradiation (position d'irradiation) puis les analyses sont séquentielles. Le gel est alors tourné à 90°C pour être placé dans le faisceau infra-rouge afin d'enregistrer un spectre. Un système de motorisation a été développé afin de contrôler automatiquement cette rotation entre les deux positions.

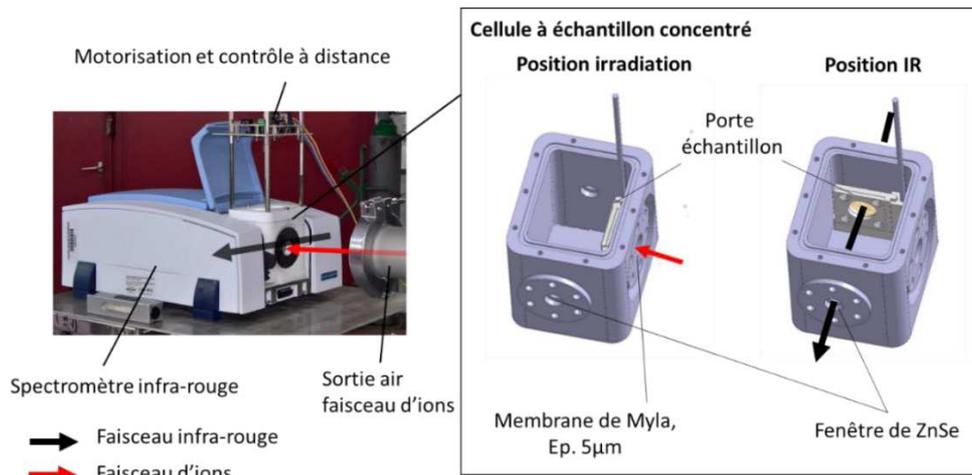


Figure 2-19 : Schéma et photo d'irradiation et suivi en ligne d'un échantillon en concentré dans la cellule d'irradiation solide

A nouveau, les distances en jeu doivent être connues précisément pour recalculer les énergies par SRIM (Ziegler et al., 2010). Dans le cas d'un faisceau de protons de 2,6 MeV sur la plateforme ACACIA, l'énergie finale dans le gel est estimée à 2 MeV en moyenne avec un TEL de 163 eV/nm. (**Figure 2-20**). La variation de TEL dans le gel est relativement faible, ce qui permet des mesures différentielles.

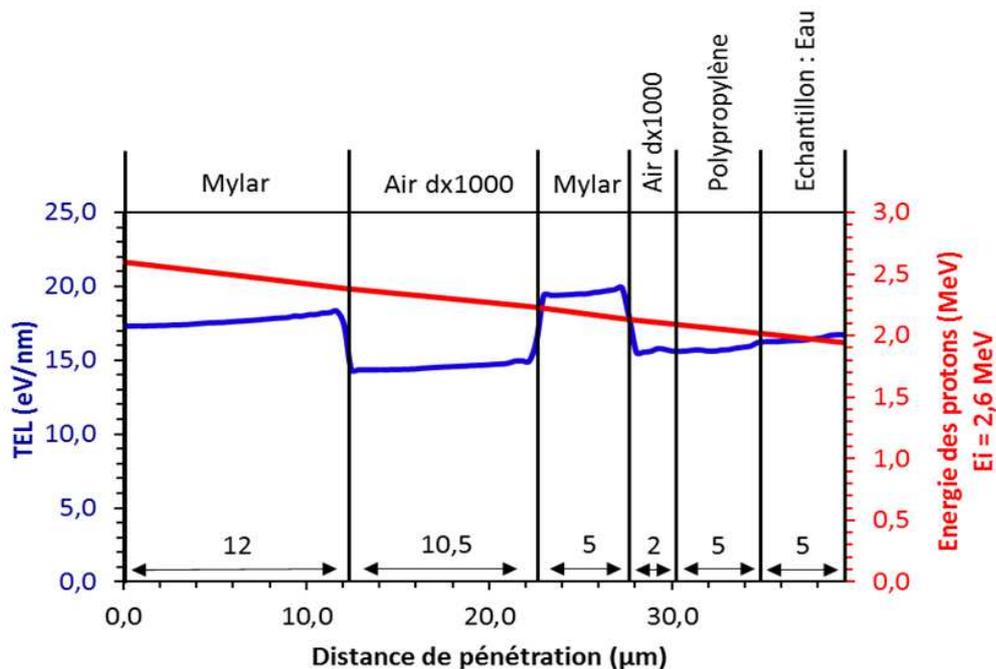


Figure 2-20 : Perte d'énergie d'un faisceau de protons de 2,6MeV associée à la cellule pour les gels sur la plateforme ACACIA. Simulation réalisée sur SRIM, les distances prises en compte sont les suivantes : 12µm de Mylar pour la fenêtre d'extraction, 10,5 mm d'aire, 5µm de Mylar pour l'entrée dans la cellule, 2 mm d'aire, 5 µm de polypropylène support du gel puis 5µm d'épaisseur du gel approximé comme de l'eau de densité 1. Pour des raisons propres à la simulation sur SRIM (quantité de points limités), la profondeur d'air est divisée par 1000 et sa densité est multipliée par 1000.

La cellule décrite ci-dessus a également été développée de manière à être étanche. Elle est munie d'une entrée et d'une sortie de gaz ce qui permet de réaliser des expériences dans des conditions d'atmosphère variables (Figure 2-21). Il est possible de modifier la composition de l'atmosphère ou son hydratation. Les expériences ont été réalisées en milieu aéré et désoxygéné (Argon, Azote).



Figure 2-21 : Cellule d'irradiation des gels comportant les tuyaux de circulation de gaz

3) Irradiations à hautes énergies.

Si le montage présenté précédemment s'adapte facilement pour les faisceaux d'ions de faibles énergies de la plateforme ACACIA ou du HIMAC, il n'est pas compatible avec les faisceaux d'ions de hautes énergies très pénétrants. Dans la géométrie actuelle, le spectromètre infrarouge subirait une irradiation directe qui l'endommagerait rapidement.

IV. Expériences d'irradiation par des photons gamma

Deux sources gamma au Césium 137 (^{137}Cs) ont été utilisées dans le cadre de nos expériences. La première appartient au NIRS à Chiba, tandis que la seconde appartient au CEA de Saclay (NIMBE)

A. Césium 137

Le Césium 137 est l'un des 40 isotopes de césium connus. Il est instable et sa demi-vie est de 30,15 ans. Dans 94,6% des cas, sa désintégration va conduire dans un premier temps à la formation de Barium 137 métastable après émission d'une particule β^- . Ce dernier ayant une demi-vie de 2,55min, il va se désexciter par émission d'un rayonnement gamma d'énergie 0,662 MeV. Dans les 5,4% des cas restants, la désintégration du ^{137}Cs conduit directement à la formation du ^{137}Ba stable par l'émission d'une particule β^- plus énergétique (Figure 2-22). Une fois isolé et scellé, le ^{137}Cs peut être utilisé comme source à des fins médicales, industrielles ou dans la recherche.

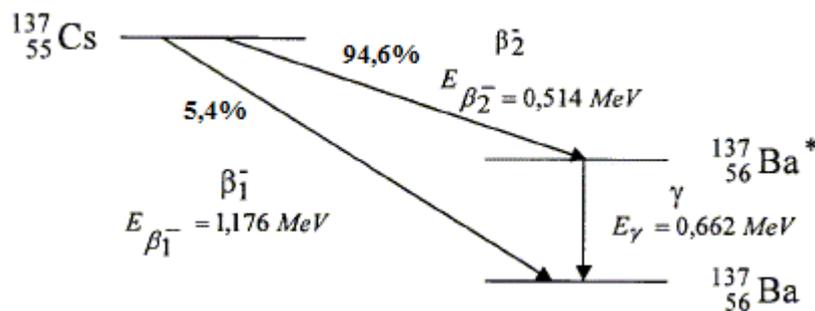


Figure 2-22 : Diagramme de désintégration du Césium 137

B. Irradiation gamma et dosimétrie

Les deux sources au Césium utilisées, à Saclay et à Chiba, sont des sources scellées. Elles se présentent sous la forme d'irradiateurs très similaires (Figure 2-23). Un compartiment pour introduire le porte-échantillons se situe à l'avant de l'appareil et lors de l'actionnement, les échantillons sont mis en rotation à proximité de la source. La dose est alors contrôlée via le temps d'irradiation. Les échantillons liquides irradiés sous rayons gamma ont été introduits dans des eppendorfs de 2mL placés dans le porte-échantillons de manière circulaire (Figure 2-23). Sur le même rayon, la dose est moyennée car le porte-échantillons est en rotation grâce à un support rotatif. Ainsi, il est nécessaire de réaliser une mesure de dose par rayon et pour ce faire, la dosimétrie de Fricke est très appropriée. Le rendement pour ces rayonnements est de 15,3 esp/100eV. Les débits de dose mesurés par cette méthode étaient de 6,7 Gy/min pour l'irradiateur de Chiba et de l'ordre de 5,0 Gy/min pour celui de Saclay. Les irradiations ont été typiquement réalisées avec des doses par palier de 100 Gy. En cas d'étude en fonction de la dose, les échantillons retirés de l'irradiateur au cours de l'irradiation ont été remplacés par des fantômes pour ne pas perturber la mesure de la dose par effet d'écrantage. Le cercle d'échantillon reste donc toujours identique.



Figure 2-23 : Irradiateur gamma et porte-échantillons, Chiba NIRS.

Des irradiations préliminaires de gel de protéines ont également été réalisées. Les gels, autoportants entre deux feuilles de polypropylène qui leur servent de support, ont été introduits dans le même portoir (Figure 2-23). La dose a également été estimée à partir du dosimètre de Fricke.

V. Tableau récapitulatif

Tableau 2-3 : Tableau récapitulatif des différents types d'expériences d'irradiation, des conditions expérimentales et de la dosimétrie associée

Plateforme d'irradiation, Lieu	Salles/Appareils d'irradiation	Rayonnement et énergie dans l'échantillon	TEL (eV/nm)	Type de source et débit d'ions maximal	Dosimétrie associée	Type d'échantillon et montage d'irradiation
ACACIA, Strasbourg	Van de Graaff 4MV Ligne à balayage	H ⁺ , 0,5 à 3,5 MeV	11 à 24	Continu balayé 6,4x10 ⁶ ions/cm ² /μs	Cavité de Faraday CR39	Ech. Liquide : Cellule basse énergie Ech. Gel : Cellule pour gel
HIMAC, Chiba	Medium energy room	H ⁺ , 2 à 5,5 MeV He ²⁺ , 3 à 31 MeV C ⁶⁺ , 4 à 44 MeV	7 à 16 30 à 130 360 à 940	Pulsé 700μs toutes les 1,65s 1x10 ⁷ ions/cm ² /μs	CR39	
	Physics Room	H ⁺ , 210 MeV C ⁶⁺ , 4,3 GeV	0,44 11,3	Pulsé 1,3s et 2s (H ⁺ et C ⁶⁺) toutes les 3,3s 3x10 ³ ions/cm ² /μs	CR39 Fricke	Ech. Liquide : Cellule haute énergie Ech. Gel : Pas de portoir
	CEA Saclay, Paris	Irradiateurs Gamma	γ ¹³⁷ Cs, 0,662MeV	Equiv. 0,91	6,7 Gy/min	Fricke
5 Gy/min						

Chapitre 3: Rendements de production du radical hydroxyle

Le but de cette étude est de mesurer les rendements de production du radical hydroxyle en fonction du temps avec les rayonnements utilisés dans ce manuscrit. Dans le cadre des ions, peu de données sont décrites dans la littérature ou uniquement de manière isolée. Comprendre la production du radical hydroxyle nous sera très utile par la suite pour étudier les dégâts indirects sur les biomolécules.

Dans la première partie de ce chapitre, un état de l'art des techniques de quantification du radical hydroxyle sera fait et nous verrons plus spécifiquement l'utilisation de la capture qui sera mis en œuvre par l'acide 3-coumarine carboxylique dans notre étude. Ensuite, les techniques analytiques mises en œuvre et les expériences d'irradiation seront décrites avant de présenter les résultats obtenus.

I. Principe, scavenging avec 3CCA

A. Mesure indirecte de production du radical hydroxyle

En chimie sous rayonnement en solution aqueuse, la mesure de la production des espèces primaires de la radiolyse de l'eau est un défi auquel se sont consacrées de nombreuses équipes de recherche sous divers types de rayonnements. Parmi les espèces produites, il a été vu que le radical hydroxyle possède un rôle prépondérant car il est lié au stress oxydant et c'est la principale source de dégradation des solutés lors de la radiolyse en solution aérée (Chap1. II.). Cependant, sa mesure directe s'avère difficile dû à sa forte réactivité et donc, à sa faible durée de vie en solution, souvent accompagnée d'une faible concentration. Une méthode sensible, sélective et rapide est alors nécessaire pour sa quantification. L'absorbance du radical dans l'UV a été utilisée pour mesurer sa production. Si son maximum d'absorption se trouve à 240nm, la mesure se fait en pratique à des longueurs d'onde bien plus hautes, principalement pour éviter les interférences avec d'autres espèces, comme l'ont réalisé Jonah et Miller en mesurant directement la production du radical en radiolyse d'électrons pulsés à 280nm sur un intervalle de 200ps à 3ns (Jonah and Miller, 1977).

Eu égard aux difficultés de la mesure directe citée ci-dessus, la quantification du radical hydroxyle par mesure indirecte lui est souvent préférée. Dans ce cas, des sondes moléculaires vont réagir avec le radical dans une compétition avec les recombinaisons radicalaires ayant lieu lors de la phase de chimie non homogène. Pour être efficace, une sonde doit être sélective au radical hydroxyle et la réaction doit former un produit stable chimiquement pour la détection, ce qui permettra de revenir aux quantités initiales du radical. La cinétique de réaction entre la sonde et le radical doit être très élevée, voire limitée par la diffusion pour atteindre des faibles temps de capture correspondants à l'étape de chimie non homogène. Le système doit également être bien connu, notamment le rendement de production de l'espèce détectable afin de pouvoir déterminer la production initiale du radical par proportionnalité. Répondant à ces critères, de

nombreuses sondes ont pu être décrites et utilisées pour la quantification du radical hydroxyle, des exemples de ces dernières vont être introduits par la suite.

1) Les sondes du radical hydroxyle pour la radiolyse pulsée

La radiolyse pulsée est un outil essentiel pour déterminer la production et les temps de vie des espèces radicalaires formées par radiolyse de l'eau. C'est la seule technique permettant d'observer directement après un pulse de rayonnement ionisant la production et/ou le déclin d'espèces en fonction du temps. C'est pourquoi l'analyse doit également être pulsée. C'est de cette manière que des mesures directes ont été réalisées sur la production du radical hydroxyle par sous irradiation par des électrons (Jonah and Miller, 1977). Dans le cas d'ions accélérés, en plus des contraintes techniques temporelles pour corrélérer les mesures aux pulses d'ions, des contraintes géométriques et techniques s'additionnent. En effet, les ions de basses énergies ont de faibles parcours en solution qui vont de pair avec de faibles signaux mesurables en conséquence des faibles rendements de production des espèces de radiolyse. Ainsi, pour faciliter la détection, une sonde qui va réagir avec le radical hydroxyle peut être introduite afin d'obtenir des signaux plus intenses. De cette manière, en connaissant la concentration de la sonde ainsi que les constantes de réaction en jeu, l'apparition du produit final peut être corrélée à la production du radical primaire.

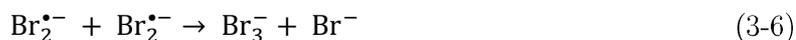
Parmi les différentes sondes, l'ion thiocyanate fut décrit comme capteur au radical hydroxyle pour la première fois par Adams et son équipe (Adams et al., 1965). Ce système est basé sur la détection par UV-Visible du radical $(\text{SCN})_2^{\bullet-}$ formé par réaction avec HO^\bullet (Équation 3-1). Ainsi, il est nécessaire de connaître les constantes de réaction des intermédiaires, $\text{SCNOH}^{\bullet-}$ et $^{\bullet}\text{SCN}$, qui vont conduire à la formation de l'ion $(\text{SCN})_2^{\bullet-}$ (Équations 3-2 et 3-3). L'ion thiocyanate a également pu être utilisé dans le cadre d'expériences avec des ions accélérés (Baldacchino, 2015; Chitose et al., 2001).



Équations 3-1 à 3-3 : Schéma réactionnel du système ion thiocyanate pour la détection du radical hydroxyle.

De façon similaire, l'ion Br^- a été identifié comme un capteur à HO^\bullet en solution aqueuse dès les années 50 (Hochanadel, 1952). Plus récemment, il a également pu être utilisé comme sonde spécifique au radical lors d'irradiations par des ions (Saffré, 2011). La réaction avec le radical

hydroxyle conduit à la formation de l'ion Br_2^\bullet et Br_3^- tous les deux détectables par UV-Visible. (Équations 3-4 à 3-6).



Équations 3-4 à 3-6 : Schéma réactionnel du système ion bromure pour la détection du radical hydroxyle.

Dans les systèmes thiocyanate ou bromure présentés ci-dessus, il est nécessaire de corrélérer les analyses en fonction du temps car les espèces observables ont des faibles temps de vie en solution. Pour faciliter les mesures, les techniques dites de capture ou « scavenging » peuvent être employées. Celles-ci permettent une analyse à temps long après l'irradiation et ne nécessitent pas l'utilisation de radiolyse pulsée. Cependant, ces techniques permettent uniquement d'avoir une « image » de la solution correspondant à un temps moyen reconstruit par la statistique de réaction.

2) Les sondes du radical hydroxyle par capture

La capture ou « scavenging » est une mesure indirecte et statistique de la production du radical hydroxyle. En effet, celle-ci permet de remonter à différents temps statistiques après passage du rayonnement, suivi de la radiolyse de l'eau en faisant varier la concentration de la sonde. Le temps de capture est directement proportionnel à la constante de réaction et à la concentration (Équation 3-7).

$$t = \frac{1}{kC}$$

t	Temps statistique de capture (s)
C	Concentration de la sonde (mol/L)
k	Constante de réaction (L/mol/s)

Équations 3-7 : Equation de calcul du temps statistique de capture.

Cette technique, expérimentalement plus simple que la radiolyse pulsée, a motivé le développement de différentes sondes qui se différencient par la détection du produit final utilisé et leur sélectivité. Il est possible d'utiliser la spectroscopie de masse par exemple pour quantifier la production du CO_2 résultant de l'attaque du radical hydroxyle sur l'acide formique en solution aqueuse (Burns and Sims, 1981). De même, le composé de type nitroène 5,5-diméthylpyrroline N-oxyde (ou DMPO) est l'une des sondes les plus répandues quand il s'agit de détection par résonance paramagnétique électronique (RPE). En effet, par sa réaction avec HO^\bullet , l'adduit HO-

Avec sa constante de réaction de $k = 6,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et sa solubilité de 13 g/L dans l'eau à 37°C, cette sonde permet de revenir à des temps statistiques de quelques nanosecondes (Équation 3-7). (Yamashita et al., 2012). La facilité de la mise en place de ce système ainsi que sa spécificité et sa basse limite de détection ont motivé son utilisation pour nos mesures. Une description plus complète de cette sonde et de son schéma réactionnel sera faite par la suite.

A. L'acide 3-coumarine carboxylique

1) Les coumarines au service de la radiolyse

Les coumarines sont des substances naturelles organiques aromatiques connues depuis plus de 200 ans pour leurs propriétés olfactives. Leur forme la plus simple, la 2H-1-benzopyrane-2-one que l'on retrouve dans de nombreux produits végétaux, a été isolée pour la première fois en 1820 à partir de la fève de tonka. Ce fut également l'une des premières molécules aromatiques synthétisées fin du 19^e siècle par William Perkin marquant un tournant dans le développement de la parfumerie artificielle.

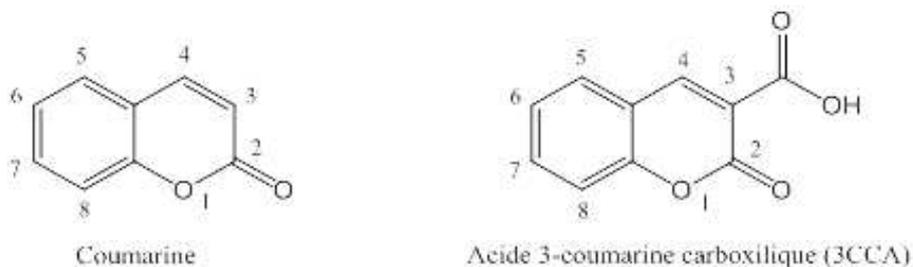
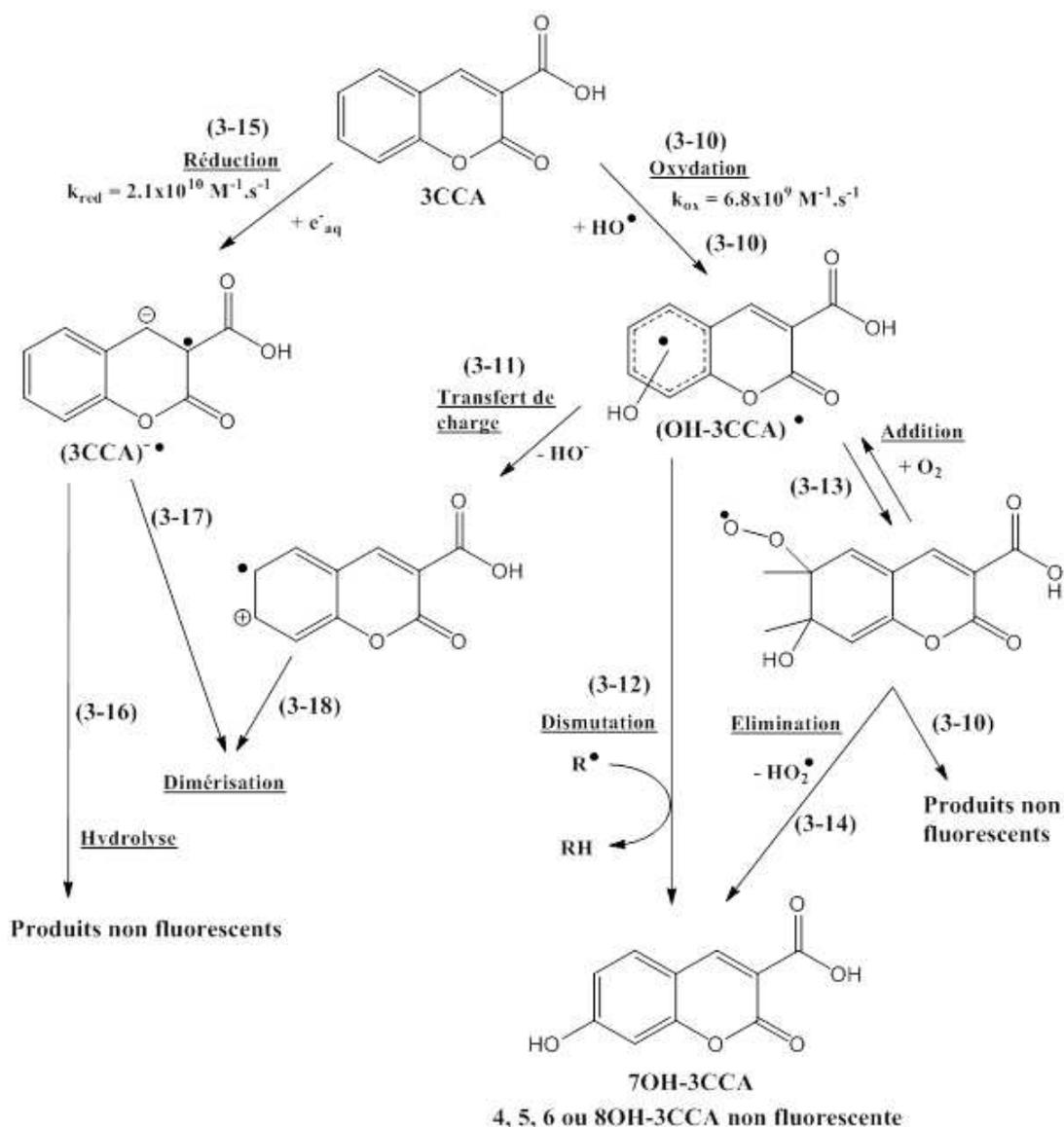


Figure 3-1 : Formule chimique de la coumarine et de l'acide 3-coumarine carboxylique.

De nos jours, les coumarines sont utilisées dans la parfumerie et sont présentes dans l'alimentation. De plus, elles motivent encore la recherche pour leurs nombreuses propriétés biologiques : antitumoral, anti-HIV, des activités anticoagulantes, anti-inflammatoires ou encore des propriétés antimicrobiennes ou antioxydantes (Borges et al., 2005). Au-delà de ces propriétés, la structure aromatique des coumarines éveillât l'intérêt pour des études spectroscopiques. Il a été remarqué que l'ajout d'une fonction hydroxyle en position 7 (Figure 3-1), notamment par métabolisation sur la coumarine simple, lui conférait de nouvelles propriétés de fluorescence ce qui fit d'elle une candidate idéale pour la dosimétrie (Ashawa et al., 1979). Par la suite, la coumarine a été utilisée dans diverses applications en tant que capteur de HO• comme pour la mesure de constante de vitesse de réaction avec le radical hydroxyle par compétition (Louit et al., 2009). Pour envisager l'utilisation des composés de type coumarine comme scavenger, il est nécessaire de pouvoir varier leur concentration en solution pour moduler le temps de capture statistique du radical. Or la coumarine simple est faiblement soluble, c'est pourquoi l'utilisation

de la 3CCA, plus soluble, a été envisagée. Cette dernière avait déjà permis de mettre en évidence la présence du radical hydroxyle en milieu naturel comme dans la décomposition du bois par des champignons. La réaction de la 3CCA conduit également à la formation d'un produit stable et fluorescent après hydroxylation en position 7 (Figure 3-1) (Iakovlev et al., 2003; Tornberg and Olsson, 2002).

2) La 3CCA comme capteur du radical HO•



Équations 3-10 à 3-18 : Schéma de radiolyse de la 3CCA en solution aqueuse. Figure adaptée d'après (Yamashita et al. 2012)

Pour utiliser la 3CCA comme sonde du radical hydroxyle, il était nécessaire de bien étudier la chimie du système. Dès lors, un schéma réactionnel complet de sa radiolyse en solution aqueuse

a été proposé par Yamashita et al. sur la base des réactions connues avec d'autres composés aromatiques et d'autres coumarines. Ainsi, la 3CCA réagit efficacement avec les espèces issues de la radiolyse de l'eau, l'électron hydraté et le radical hydroxyle (Equations 3-15 et 3-10). En condition aérée, l'électron hydraté est capté par le dioxygène présent en solution (Chap 1. II.) ce qui empêche cette voie de réduction de la 3CCA. Par la réaction avec HO•, on observe la formation d'un radical intermédiaire : OH-3CCA•, ce dernier pouvant conduire à la formation de 7OH-3CCA par deux voies réactionnelles différentes. La première est une voie de réaction radicalaire, par dismutation (Equation 3-12) ; la seconde se fait par réaction avec l'oxygène (Equations 3-13 et 3-14).

Parmi toutes les espèces produites par hydrolyse, dimérisation, fragmentation ou hydroxylation, une seule est fluorescente, la 7OH-3CCA. Son rendement de production a été mesuré à 4,7% (\pm 0,6%) par rapport à l'addition du radical hydroxyle considérée comme totale en l'absence de compétition. Ce rendement a été mesuré d'abord sous irradiation gamma (Newton and Milligan, 2006) et retrouvé sous irradiation par 7 types d'ions différents (Maeyama et al., 2011). Ces travaux ont permis de montrer que celui-ci est constant en fonction du TEL (0,5 à 2000 eV/nm).

Ainsi, la facilité de détection de la 7OH-3CCA, sa disponibilité dans le commerce, sa spécificité de production par réaction avec HO• et son rendement de production constant et connu en fonction du TEL, font du système chimique 3CCA une sonde particulièrement adaptée pour notre étude avec des ions correspondants aux énergies du pic de Bragg.

II. Méthode expérimentale

Dans cette partie, sont décrits la préparation des solutions de 3CCA, les conditions d'irradiation et les conditions d'analyse de la 7OH-3CCA.

A. Préparation des solutions

Les solutions aqueuses sont préparées à partir d'eau ultra pure provenant d'un appareil Milli-Q (résistivité à 25°C : 18.2 M Ω .cm⁻¹). Les produits chimiques du Tableau 3-1 ont été utilisés sans traitement/purification supplémentaire .

Pour l'irradiation de solution de 3CCA, le pH a été fixé à 6,8 par l'utilisation de tampon phosphate ce qui correspond à un pH d'intérêt biologique. Typiquement, les solutions mères de phosphate monosodique (NaH₂PO₄.2H₂O) et dipotassique (K₂HPO₄) à 0,2 mol · L⁻¹ sont préparées, puis stockées jusqu'à plusieurs mois à 4°C. Le tampon phosphate, 66mM à pH = 6.8 est réalisé le jour même à partir des deux solutions mères. Pour 1L de solution tampon à 66mM, pH=6.8 : 163.2mL de NaH₂PO₄ à 0,2M + 170mL K₂HPO₄ à 0,2M. Le pH du mélange est contrôlé au pH-mètre périodiquement.

Tableau 3-2 : Produits chimiques pour les expériences « radical hydroxyle ».

No. CAS	Produit chimique	Pureté	Fournisseur
531-81-7	Acide 3-coumarine carboxylique (3CCA)	≥99%	Sigma-Aldrich
779-27-1	Acide 7-hydroxy-3-coumarine carboxylique (7OH-3CCA)	≥98%	Sigma-Aldrich
13472-35-0	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	≥98%	Sigma-Aldrich
7758-11-4	K ₂ HPO ₄	≥99%	Sigma-Aldrich
75-05-8	Acétonitrile	≥99,9%	Fisher Scientific
64-18-6	Acide formique	≥99,5%	Fisher Scientific

Les concentrations utilisées en 3CCA vont 2×10^{-2} à 1×10^{-4} M ce qui ramène à des temps de capture de 7 à 1430 ns (Tableau 3-3). Pour une irradiation, il est nécessaire de disposer d'un volume d'échantillon d'environ 50ml. La plus grande partie de l'échantillon (typiquement 40mL) est utilisée pour le rinçage et le conditionnement du circuit à circulation (Chap 2). Le volume irradié est celui de la « réserve » (typiquement 10mL) plus le volume du circuit, préalablement conditionné. Les solutions de 3CCA préparées sont conservées à l'abri de la lumière qui peut initier la formation de 7OH-3CCA.

Tableau 3-3 : Concentrations et temps de capture caractéristiques 3CCA. $k = 6.8 \times 10^9$ mol/L/s.

Concentration 3CCA (mol.L ⁻¹)	Temps de capture caractéristiques (ns)
2×10^{-2}	7
8×10^{-3}	18
2×10^{-3}	71
5×10^{-4}	286
1×10^{-4}	1428

B. Irradiations réalisées

Dans le but d'obtenir des informations sur la production du radical hydroxyle sous différentes conditions de radiolyse, différents types de rayonnements ont été utilisés (Tableau 3-4).

Tableau 3-4 : Faisceaux d'ions pour les expériences d'irradiation de 3CCA.

Type de rayonnement	Energie en solution (MeV)	TEL dans l'eau (eV/nm)
H ⁺	0.5 à 5	24 à 7,5
	210	0.44
He ²⁺	3 à 21	130 à 30
C ⁶⁺	4 à 41	940 à 380
Gamma	0.662	Equivalent 0.91

C. Quantification de la 7OH-3CCA

1) Propriétés spectroscopiques de la 7OH-3CCA

La 7OH-3CCA a une fluorescence très intense avec un maximum d'émission à 447nm pour un maximum d'absorbance à 388 (Figure 3-2). Son absorbance dans l'UV proche et son émission dans le visible la rendent facilement analysable par fluorescence. Ses propriétés dépendent du pH, il est donc nécessaire de travailler en solution tampon pour une analyse par fluorescence. La 3CCA, quant à elle, est faiblement fluorescente dans la même gamme en comparaison avec la 7OH-3CCA (Figure 3-2).

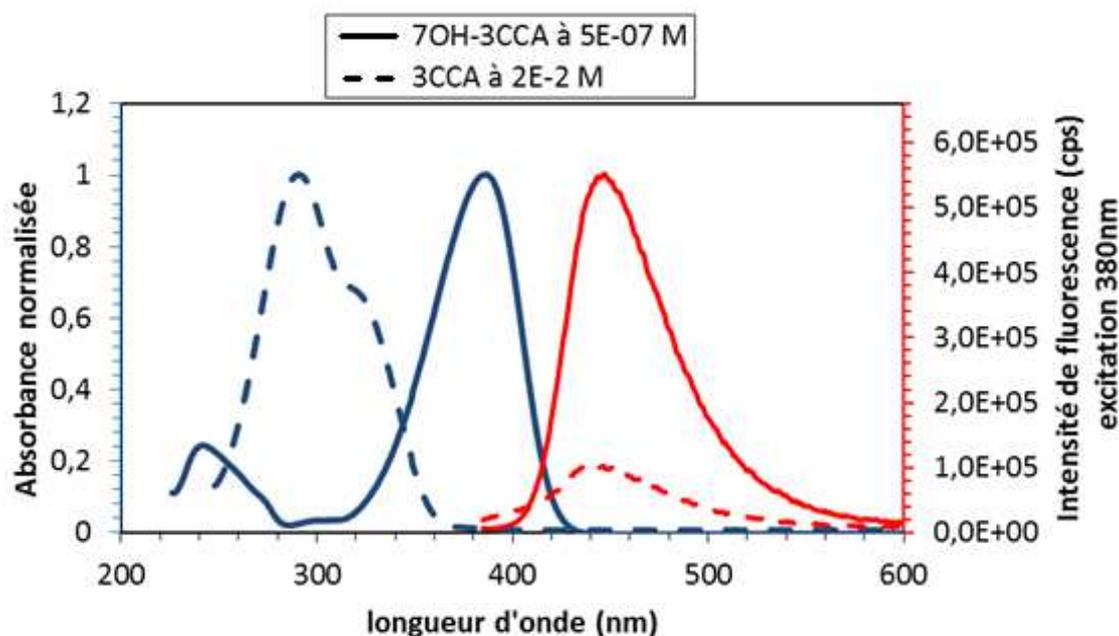


Figure 3-2 : Absorbance normalisée et Fluorescence de la 7OH-3CCA et de la 3CCA dans du tampon phosphate 66 mM à pH=6,8.

2) Analyses en ligne

La fluorescence de la 7OH-3CCA ne peut être analysée simplement dans les solutions irradiées. En effet, l'intensité de fluorescence de la 7OH-3CCA varie en fonction de la concentration en 3CCA en solution (Figure 3-3). Il n'est pas possible d'avoir de la réabsorption de l'émission de fluorescence de 7OH-3CCA par la 3CCA au vu de son spectre d'absorption (Figure 3-2). Ainsi, la diminution de fluorescence observée doit résulter d'un transfert de l'excitation de la 7OH-3CCA vers la 3CCA aussi appelé phénomène de « quenching ». Au vu de l'importance de ce phénomène, il n'est pas possible de réaliser une analyse en ligne des solutions irradiées. Pour une quantification précise 7OH-3CCA formée, il est essentiel de la séparer de la 3CCA. C'est pourquoi, la chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à un détecteur de fluorescence (HPLC-Fluo) est une méthode particulièrement adaptée. De même, la chromatographie permet également de s'affranchir de la production d'autres espèces de radiolyse qui pourraient être faiblement fluorescentes.

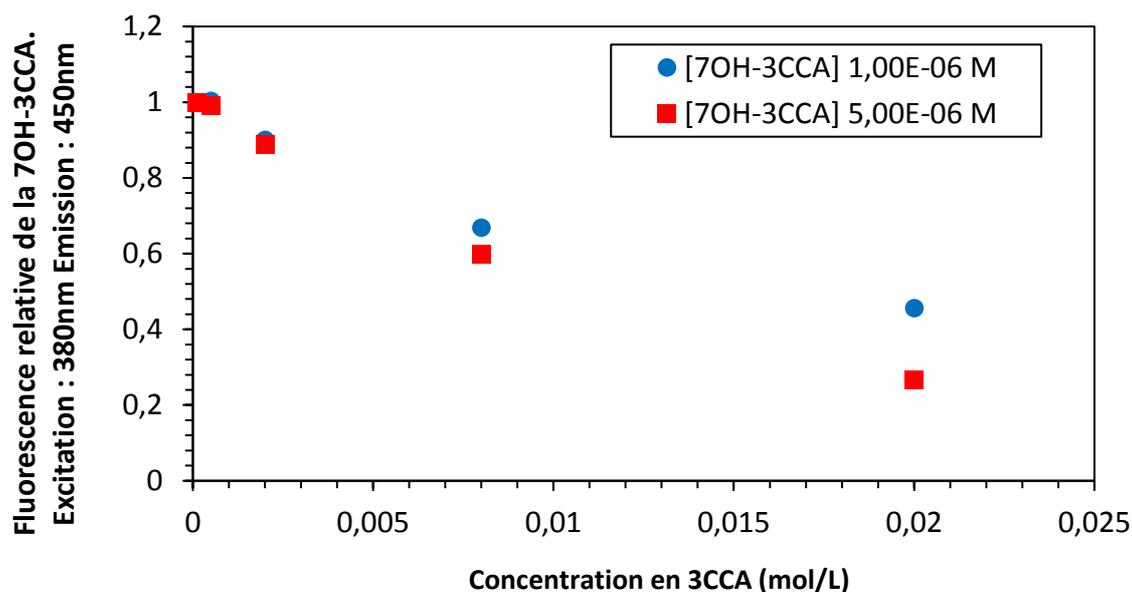


Figure 3-3 : Evolution de l'intensité de fluorescence normalisée de la 7OH-3CCA en fonction de la concentration en 3CCA.

3) Analyses par HPLC-Fluo

Les analyses ont été réalisées sur deux systèmes différents, le premier à Strasbourg et le second au HIMAC à Chiba. A Strasbourg, une HPLC Thermo Fisher Dionex Ultima 3000 RS équipée d'un passeur automatique WPS et couplée à un détecteur de fluorescence JASCO FP4020 a permis la quantification de la 7OH-3CCA. A Chiba, les analyses ont été réalisées sur un système

HPLC Hitachi L-2450 couplé à un spectrofluorimètre Hitachi F-2700 (en mode cinétique) à l'aide d'une cellule à circulation Firefly de 20 μ L pour HPLC.

Les conditions de séparation sont les mêmes sur les deux systèmes. Le débit de l'éluant a été fixé à 0.8 ml/min et la température à 20°C sur une colonne C18 Hypersyl Gold (250x4.6mm, d.i. 5 μ m) avec une colonne de garde hypersyl gold. La séparation est réalisée en condition isocratique : 42% ACN / 58% H₂O / 0.15% Acide Formique. Ces conditions permettent la bonne séparation des composés en 7 min, le temps de rétention de la 7OH-3CCA est de 5,5 min et celui de la 3CCA de 6,4 min (Figure 3-4). Les longueurs d'onde de travail retenues sont 370 nm en excitation et 440 nm en émission, les fentes d'ouverture et l'alimentation du photomultiplicateur peuvent être modifiées sur les deux systèmes pour optimiser les mesures. L'identification des produits a été réalisée par l'analyse de leur standard.

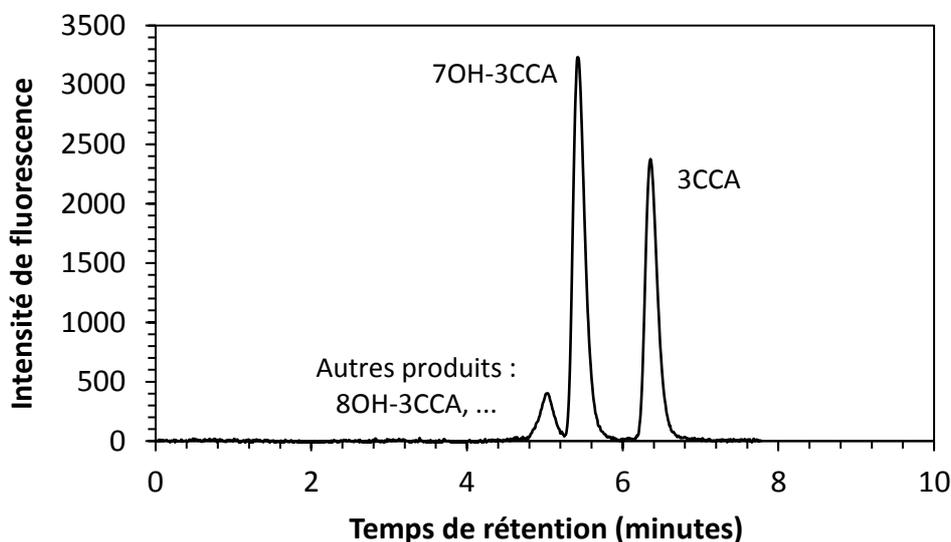


Figure 3-4 : Chromatogramme typique d'un échantillon de 3CCA irradié.

Un étalonnage de la 7OH-3CCA à partir du produit commercial est réalisé dans les conditions d'analyse identiques à celles des échantillons irradiés. Sur le système d'analyse du HIMAC, il est recommandé de réaliser un étalonnage à chaque série d'expériences pour tenir compte des variations de signal liées au montage. La cellule d'irradiation est remontée à chaque campagne d'irradiation. En effet, la position de la cellule pouvant varier, des modifications de ligne de base et donc de réponse sont observées entre les séries d'échantillons. Ce problème n'est pas rencontré à Strasbourg où l'étalonnage est valable à long terme. De manière systématique, les blancs de 3CCA non irradiés sont analysés car la 7OH-3CCA se forme en faible quantité suite à une exposition des solutions à la lumière. Les quantités mesurées dans les blancs sont alors soustraites aux quantités de 7OH-3CCA formées par irradiation.

4) Calcul des rendements de production du radical hydroxyle

Le rendement radiolytique dépend de deux paramètres : la quantité d'espèces produites et de l'énergie déposée en solution. Dans notre cas, la production en radical hydroxyle est déterminée à partir de la production de 7OH-3CCA en considérant un rendement de 4,7% (Maeyama et al., 2011). L'énergie déposée en solution correspond quant à elle à la dose mesurée sous irradiation. Les rendements en radical hydroxyle sont alors calculés à partir des équations 3-19 et 3-20. Son unité dans le système international est le mol/J mais on lui préférera l'unité esp/100eV dans cette étude.

$$G_{HO\cdot}(\text{mol/J}) = \frac{[OH\cdot]}{D} = \frac{100}{4,7} \times \frac{[7OH-3CCA]}{D} \quad (3-19)$$

$$G_{HO\cdot}(\text{esp/100eV}) = 9,63 \times 10^6 \times G_{HO\cdot}(\text{mol/J}) \quad (3-20)$$

$G_{HO\cdot}$	Rendement intégral (mol/J ou esp/100eV)
$[HO\cdot]$	Concentration en radical hydroxyle (mol/L)
$[7OH-3CCA]$	Concentration en 7OH-3CCA (mol/L)
D	Dose en (Gy : J/kg)

Équations 3-19 à 3-20 : Equations relatives au calcul des rendements en radical hydroxyle avec le système de capture par la 3CCA.

III. Détermination des rendements de production du radical hydroxyle

A. Validation de la méthode par mesure des rendements sous irradiation par des rayons gamma

La technique de la capture par la 3CCA a été utilisée de nombreuses fois dans la littérature, elle a montré son efficacité pour la détermination des rendements en radicaux hydroxyles pour plusieurs types de rayonnements (Baldacchino et al., 2009). Toutefois, avant de procéder aux mesures sous faisceau d'ions, les rendements de production du radical hydroxyle ont été mesurés dans nos conditions expérimentales sous rayonnements gamma, pour lesquels ces rendements sont bien établis. Un très bon accord a été trouvé entre nos mesures et les données de la littérature en fonction du temps (Figure 3-5). Ces rendements ont été mesurés avec différents rayonnements à bas TEL pour lesquels il est admis qu'ils ont des rendements similaires en radiolyse de l'eau.

On retrouve des rayonnements gamma (Baldacchino et al., 2009; Draganic and Draganic, 1973) et des électrons rapides (Jonah and Miller, 1977). Différentes techniques de quantification ont également été mises en œuvre, des mesures directes par UV-Visible par Jonah et Miller, des mesures indirectes par capture dont notamment avec la 3CCA l'utilisation de la 3CCA par Baldacchino et al. Une étude par modélisation Monte-Carlo a également été menée avec des protons de 300 MeV (Frongillo et al., 1998).

Le très bon accord entre nos mesures et la littérature valide l'utilisation de notre méthode expérimentale pour la détermination des rendements de production du radical hydroxyle avec la 3CCA.

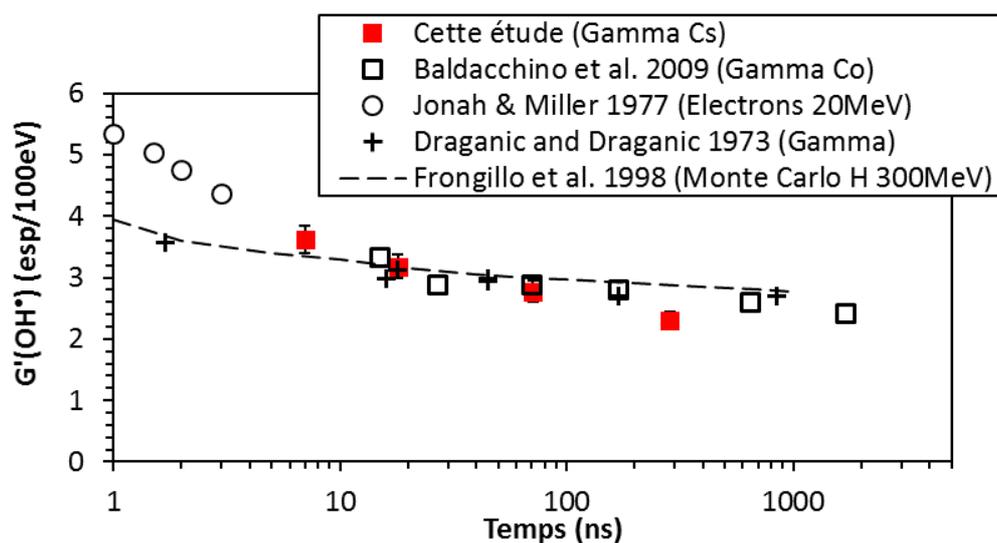


Figure 3-5 : Rendements de production du radical hydroxyle mesurés sous irradiation gamma. Comparaison aux données de la littérature.

B. Des mesures intégrales aux rendements différentiels avec des ions de basses énergies

Une fois la méthode expérimentale validée, les mesures de rendements de production en radical hydroxyle ont pu être réalisées sous faisceau d'ions. Nous allons voir maintenant la méthodologie mise en œuvre avec des particules de basses énergies au travers des expériences avec des faisceaux de protons. Aux énergies employées, ces ions s'arrêtent totalement en solution et le TEL des ions varie fortement dans les échantillons. Les mesures correspondent alors à des rendements de production intégraux (Figure 1-5 p28). Pour comparer les rendements mesurés entre les différentes particules et avec la littérature, il est nécessaire d'estimer les rendements différentiels avec ces particules.

1) Mesure des rendements intégraux sous protons

A partir des expériences de radiolyse de solution de 3CCA à différentes concentrations par des protons d'énergies variables, on obtient les rendements intégraux en HO• (Figure 3-6). Les différentes concentrations de 3CCA correspondent à des temps de capture statistique après la passe de l'ion et la formation de la trace allant de 7 à 1428 ns (Tableau 3-3). Ces données proviennent de mesures réalisées à la fois sur la plateforme ACAIA et au HIMAC. Ces deux plateformes permettent d'étudier une plus large gamme d'énergie de protons. Concernant les rendements mesurés, une diminution au cours du temps est observée. De même, les rendements mesurés diminuent avec l'énergie initiale de la particule.

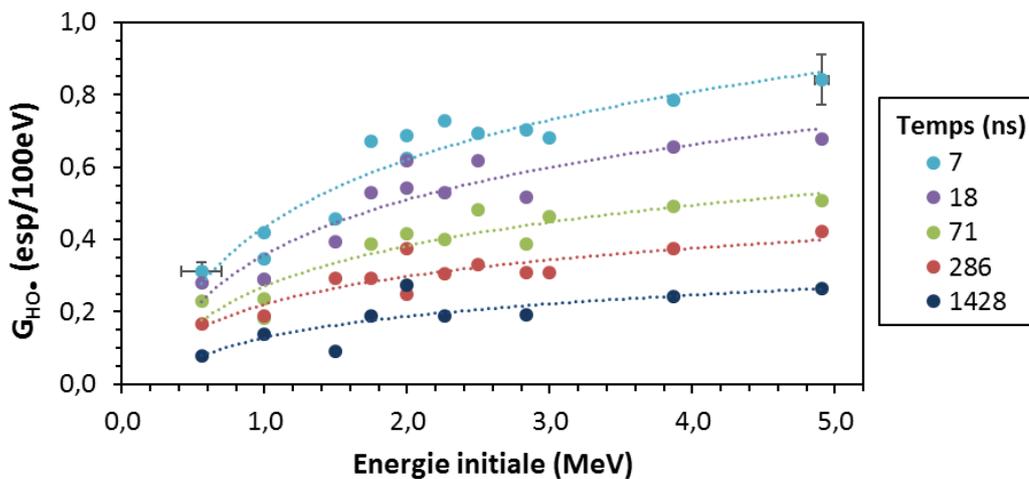


Figure 3-6 : Rendements intégraux de production du radical hydroxyle sous irradiation par des protons de basses énergies (0,5 à 5 MeV).

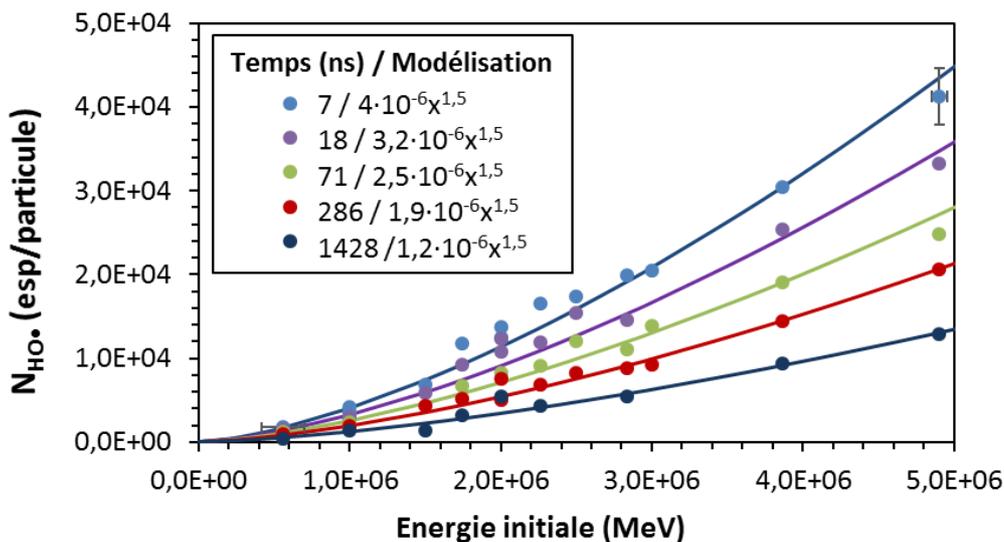


Figure 3-7 : Nombre de radicaux hydroxyles produits par particule pour des protons d'énergie initiale de 0,5 à 5 MeV.

A partir de ces mesures, il est nécessaire de déterminer le nombre de radicaux hydroxyles produits par particule afin de calculer les rendements différentiels correspondants. Ces derniers peuvent être obtenus en multipliant les rendements intégraux mesurés par l'énergie initiale des particules (Figure 3-7). On observe alors le nombre de molécules de radical hydroxyle produites par ion augmenté avec l'énergie initiale de celui-ci. Ces courbes peuvent être modélisées à l'aide de fonctions puissances de type ax^b . Une valeur constante de la puissance, à 1,5 aboutit à de bons ajustements pour l'ensemble des données obtenues avec des protons de basses énergies. En dérivant ces courbes, il est alors possible d'obtenir les rendements différentiels pour ces particules. (Equation 1-5 à 1-8 p28).

2) Rendements différentiels avec des protons de basses énergies

Les rendements différentiels de production du radical hydroxyle, calculés pour les protons de basses énergies, sont présentés en fonction du temps de capture et du TEL dans la Figure 3-8

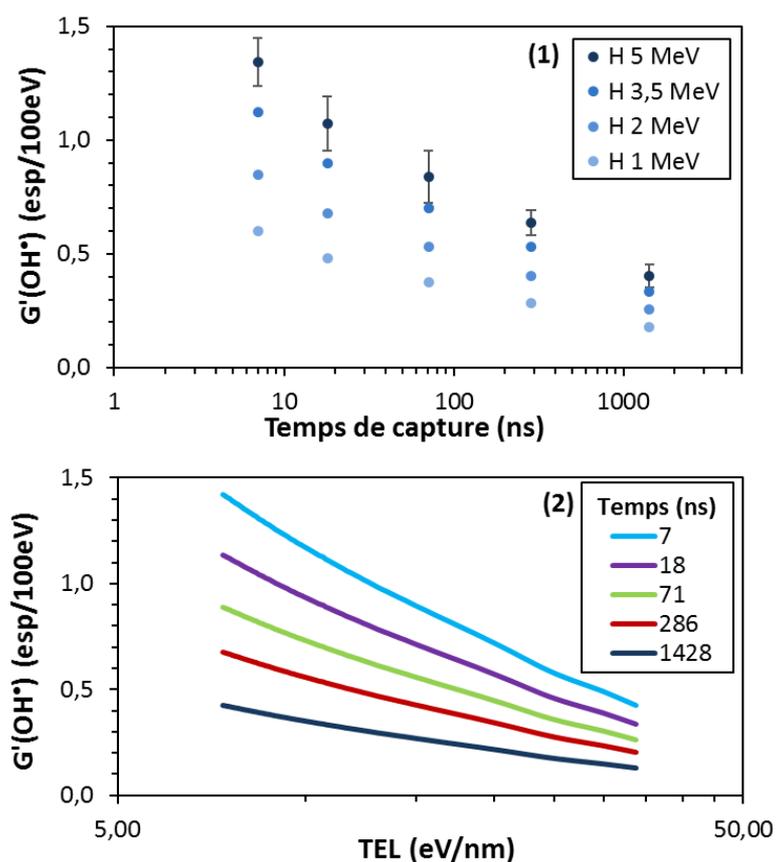


Figure 3-8 : Rendements différentiels de production du radical hydroxyle sous irradiation par des protons de basses énergies (0,5 à 5 MeV) en fonction du temps de capture (1) et TEL (2). L'intervalle de confiance sur ces rendements est estimé à partir de l'erreur sur la modélisation par temps de capture (Figure 3-7). Il est représentatif pour un même temps de capture.

On observe alors une diminution des rendements différentiels en fonction du temps de capture du radical hydroxyle mais également, en fonction de l'énergie de la particule ce qui est reflété par l'augmentation de son TEL. Ces deux graphiques illustrent les deux dépendances de ces rendements directement liées à la nature de la trace de l'ion. En effet, suite au dépôt d'énergie de l'ion dans l'eau, la radiolyse de l'eau est initiée ce qui va conduire à la formation d'espèces radicalaires dans la trace de l'ion, dont le radical hydroxyle. A ce stade, des recombinaisons inter-radicalaires ont lieu dans la trace ce qui est en accord avec la dépendance temporelle mesurée pour les rendements (Figure 3-8 (1)). Plus de recombinaisons ont lieu au cours du temps ce qui diminue les rendements en radicaux hydroxyles « survivants » aux recombinaisons dans la trace. L'effet de TEL, quant à lui, est également lié à la nature de la trace de l'ion. A TEL élevé, l'énergie est déposée de façon plus dense, les radicaux hydroxyles (et les autres espèces de la radiolyse) sont alors produits de manière plus dense ce qui va favoriser leurs recombinaisons inter-radicalaires. Ainsi, plus la trace est dense, plus les rendements en radicaux hydroxyles diminuent car plus de réactions inter-radicalaires ont lieu (Figure 3-8 (2)).

3) Mesures avec des particules alpha et des ions carbone

Des mesures ont également été réalisées avec des particules alpha et des ions carbone de basses énergies afin d'évaluer leurs variations pour des particules différentes et d'autres gammes de TEL. Lors des expériences menées sous faisceau de particules alpha, les mêmes courbes en nombre de radicaux produits par particule ont été tracées qu'avec les protons (Figure 3-9 (1)). Ces courbes ont ensuite été modélisées suivant une fonction ax^b en fixant le coefficient de puissance à 1,3 (Figure 3-9 (2)) ce qui permet d'avoir un bon ajustement. Il faut préciser que lors de ces mesures, le calcul ultérieur des doses après révélation des CR39 a montré des doses réelles assez fortes de l'ordre de 500 à 600 Gy. A de telles doses, des effets de sur-irradiation des échantillons peuvent apparaître et influencer les rendements mesurés. Toutefois la quantification par HPLC de la coumarine de départ, la 3CCA, ne semble pas indiquer une dégradation trop importante de cette dernière. Ceci pourrait indiquer que nos mesures ont été réalisées dans de bonnes conditions malgré les fortes doses. Tenant compte de ces informations, il faudra vérifier les rendements obtenus par de nouvelles irradiations.

Les rendements différentiels obtenus par dérivation des courbes modélisées sont présentés dans la Figure 3-9 (3)). On observe une bonne cohérence interne des rendements et les tendances sont similaires à celles observées sous irradiation par des protons. Les valeurs de rendements sont, quant à elles, plus faibles qu'avec les protons.

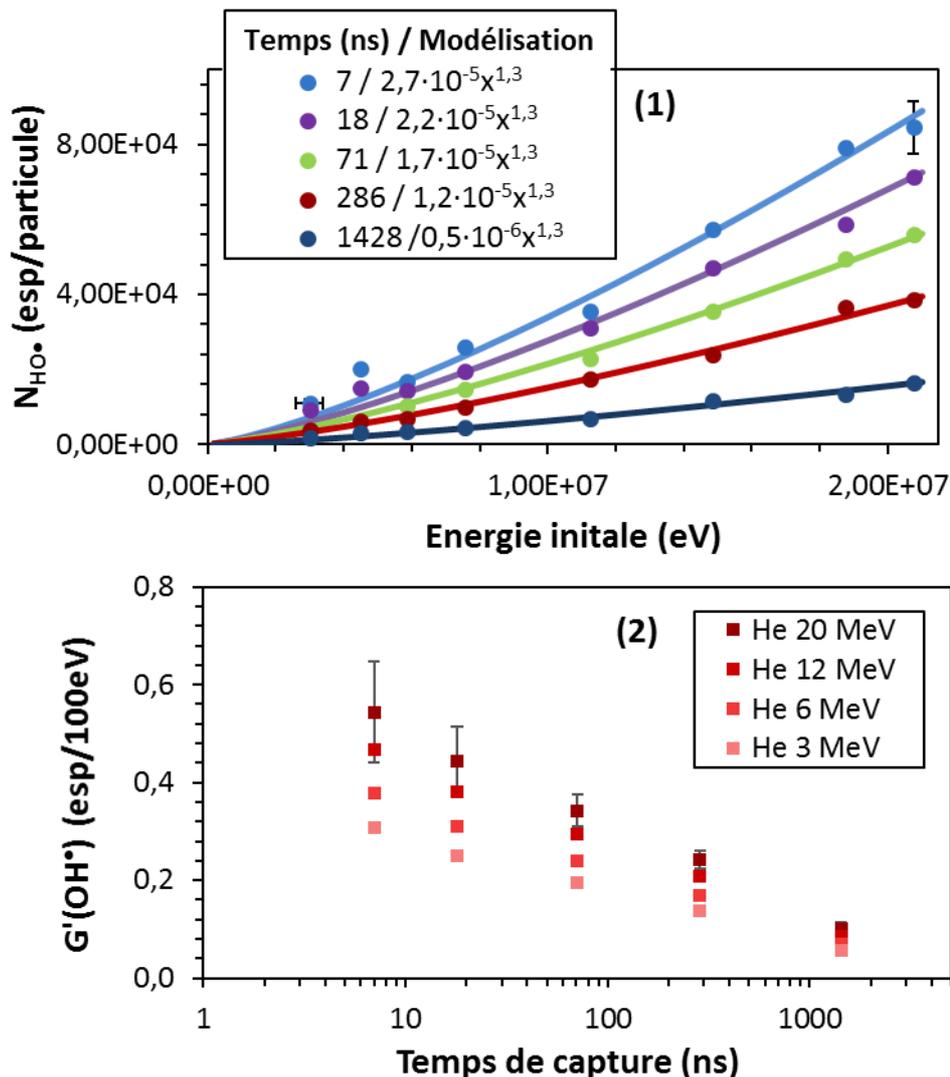


Figure 3-9 : (1) Nombre de radicaux hydroxyles produits par particule alpha d'énergie initiale de 3 à 20,7 MeV. (2) Rendements différentiels calculés pour des particules alpha représentés en fonction du temps de capture. L'intervalle de confiance sur ces rendements est estimé à partir de l'erreur sur la modélisation par temps de capture. Il est représentatif pour un même temps de capture.

La Figure 3-10 (1) présente les résultats obtenus avec les ions carbone. Dans ce cas, les courbes en nombre de radicaux produits par particule en fonction de l'énergie initiale ne passent pas par l'origine. Chaque temps caractéristique a ainsi été modélisé avec une courbe en puissance de type $ax^b + c$ et un facteur de puissance b fixé 1,2. On note également la diminution du facteur c avec le temps. Une explication possible à l'allure de ces courbes pourrait être l'existence de phénomènes différents de ceux observés avec des ions plus légers à très basse énergie. Des signaux mesurés après l'arrêt des ions carbone pourraient également faire penser à de la fragmentation des ions carbone. Toutefois, aux énergies mises en jeu, la fragmentation devrait être négligeable.

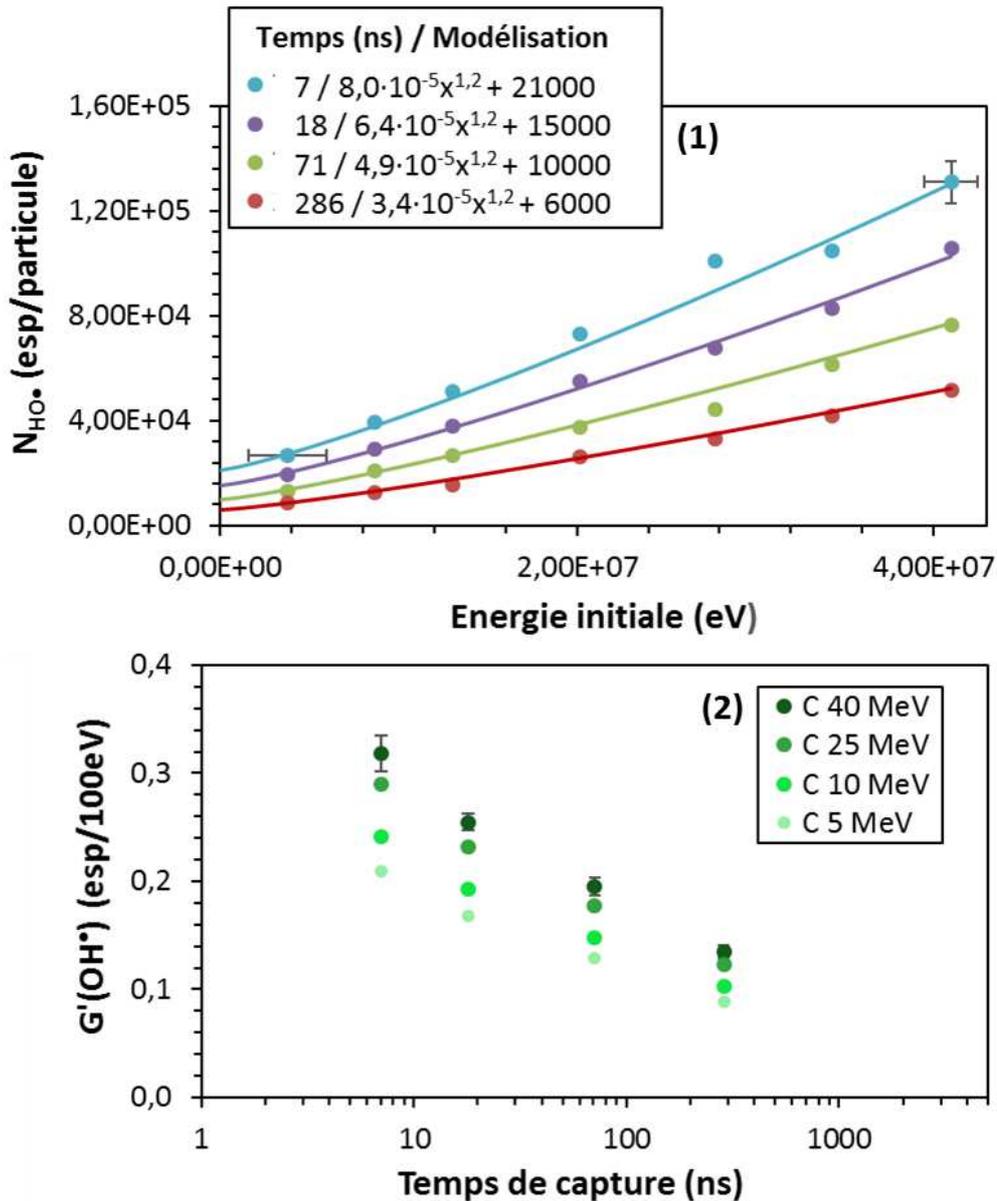


Figure 3-10 : (1) Nombre de radicaux hydroxyles produits par des ions carbone d'énergie initiale de 3,7 à 41 MeV. (2) : Rendements différentiels calculés pour ions carbone représentés en fonction du temps de capture. L'intervalle de confiance sur ces rendements est estimé à partir de l'erreur sur la modélisation par temps de capture. Elle est donc représentative pour un même temps de capture.

Les rendements différentiels calculés à partir de ces mesures sont présentés dans la Figure 3-10 (2). A nouveau, on observe une bonne cohérence interne des rendements et des dépendances similaires à celles mesurées sous irradiation par des protons et particules alpha. Les valeurs de ces rendements étant les plus faibles des trois.

C. Effets de la nature des particules sur les rendements de production en radical hydroxyle

1) Etude en fonction du TEL

Les rendements différentiels de production du radical hydroxyle mesurés pour les ions des basses énergies (protons, particules alpha et ions carbone) sont très cohérents entre eux (Figure 3-11 (1)). Comme vu précédemment, ils suivent les mêmes tendances et les rendements avec les protons sont supérieurs à ceux mesurés avec les particules alpha qui sont eux-mêmes supérieurs aux rendements des ions carbone. Cette observation est en bon accord avec le TEL de ces particules comme on peut l'observer sur la Figure 3-11 (3). En effet, on observe une évolution très régulière avec le TEL des mesures avec les ions de basses énergie à un temps de capture donné. Toutes ces observations coïncident avec les recombinaisons inter-radicalaires ayant lieu dans la trace des ions favorisés avec l'augmentation de dépôt d'énergie et en fonction du temps.

Aux données précédentes, on peut ajouter les mesures réalisées à faible TEL sous irradiation par des rayonnements gamma et des protons de 210 MeV. Ces rendements sont mesurés de façon différentielle car leur TEL est quasi-constant dans les échantillons.

Un bon accord entre les rendements pour tous les rayonnements est trouvé (Figure 3-11 (2)). En effet, les rendements obtenus avec les gamma et les protons de 210 MeV sont bien supérieurs à ceux mesurés avec les particules de basses énergies (Figure 3-11 (3)). A TEL très faible, les radicaux hydroxyles sont créés de manière très diffuse et subissent peu de recombinaisons radicalaires intra-traces. En effet, en dessous de 1,5 eV/nm, les grappes produites lors de la radiolyse de l'eau sont formées de manière assez distante pour qu'il n'y ait plus d'interaction entre deux grappes (Yamashita et al., 2011). Ceci est cohérent avec la Figure 3-5 et également pour ces deux sets de données qui sont proches.

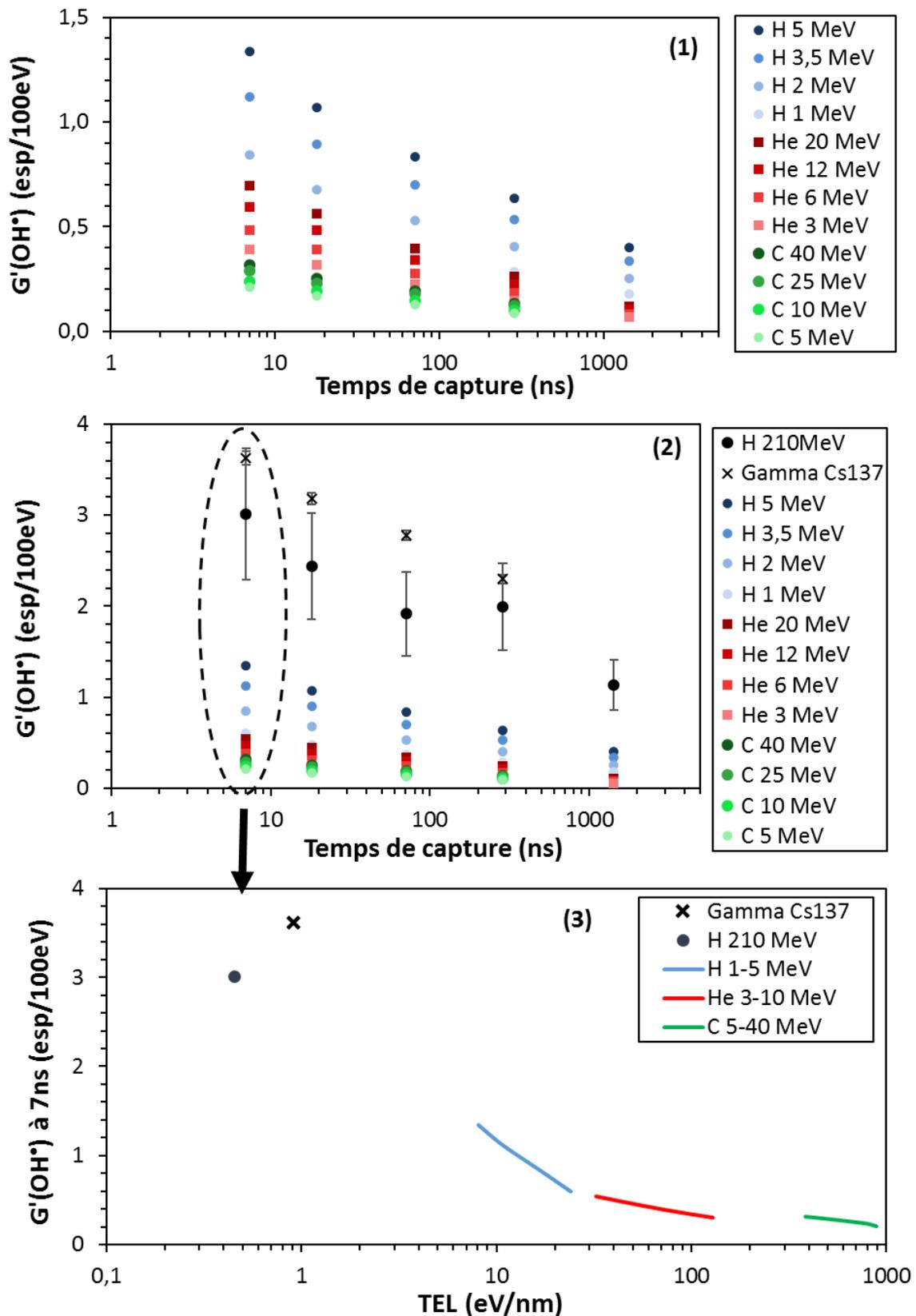


Figure 3-11 : Comparaison des rendements de production du radical hydroxyle mesurés pour les ions de basses énergies (1), associés aux rendements sous gamma et sous protons de hautes énergies (2) en fonction du temps de capture. La série de données à 7ns est représentée en fonction du TEL (3).

D. Comparaison à la littérature : cas des protons

Une compilation des rendements de production du radical hydroxyle de la littérature et de nos expériences sous irradiation par des protons est représentée dans la Figure 3-12. Frongillo et al. ont modélisé par Monte Carlo ces rendements avec des protons de 5 MeV équivalents à ceux mesurés par Burns et al. pour des protons de 38 MeV. De même, Chitose et al. ont mesuré des rendements en radical hydroxyle pour des protons de 5,2 MeV équivalents à ceux mesurés par Burns et al. pour des protons de 10 MeV. Ces derniers se rapprochent également de la modélisation de Uehara et Nikjoo à 1 MeV pour les temps de capture les plus faibles. On observe alors une forte disparité des données disponibles dans la littérature sur la production des radicaux hydroxyles par des protons. De telles différences rendent la comparaison avec nos données expérimentales difficile, toutefois nos mesures semblent en bon accord avec les expériences menées par Burns et al. L'extrapolation de nos mesures à basses énergies est cohérente avec les données de cette équipe avec des protons de 10 MeV. De même, leurs protons de 38 MeV donnent des rendements très proches de ceux obtenus avec nos expériences sous faisceau de protons de 210 MeV, les TEL de ces deux particules étant relativement proches (H 38 MeV : 1,57 eV/nm ; H 210 MeV : 0,44 eV/nm). En considérant que les effets de TEL s'estompent en dessous de 1,5 eV/nm, ces mesures sont très cohérentes.

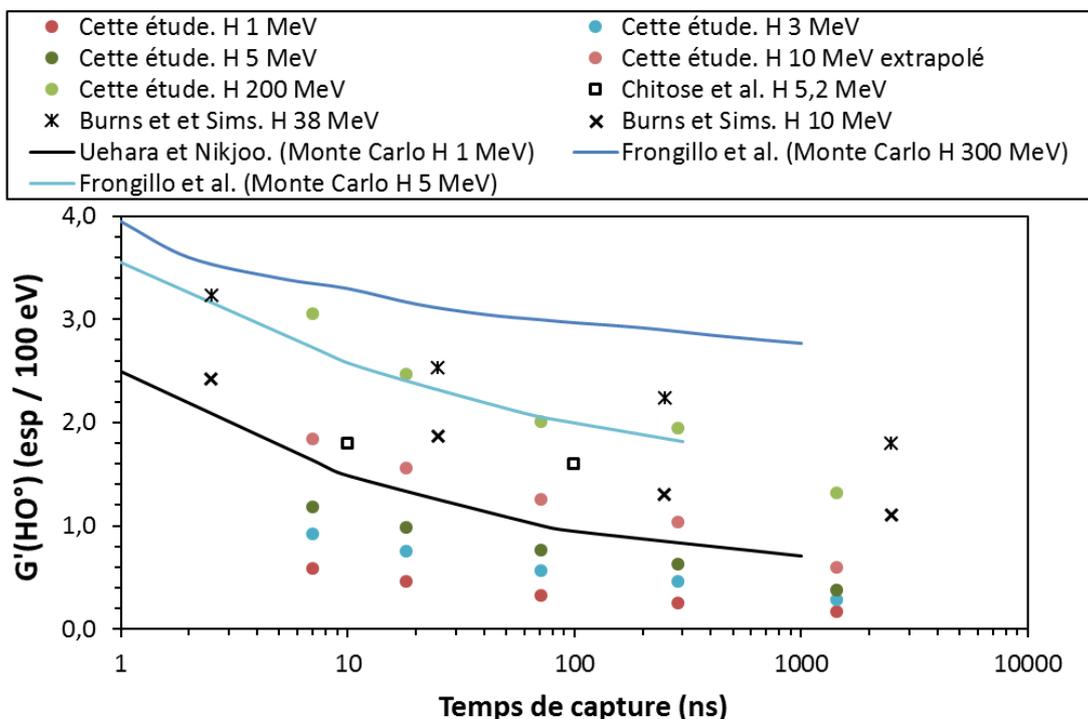


Figure 3-12 : Comparaison avec la littérature des rendements de production du radical hydroxyle avec nos expériences pour les irradiations avec des protons. Données expérimentales de 1 à 5 MeV et à 200 MeV. Données extrapolées des basses énergies pour 10 MeV. (Burns and Sims, 1981; Chitose et al., 2001; Frongillo et al., 1998; Uehara and Nikjoo, 2006)

IV. Conclusion

L'utilisation de l'acide 3-coumarine carboxylique a permis la quantification des radicaux hydroxyles produits par radiolyse de l'eau par une méthode de capture. Après validation de la méthode expérimentale sous irradiation gamma avec un très bon accord avec les données de la littérature, les rendements de production du radical hydroxyle ont été mesurés systématiquement avec des protons, des particules alpha et des ions carbone de 1 à 5 MeV/u pour la première fois. Ces données ont également été comparées aux mesures réalisées avec des protons de 210 MeV. Une bonne cohérence interne pour les expériences réalisées a été observée mettant en évidence la diminution des rendements en radicaux avec le temps et avec le TEL des particules. Ces évolutions s'expliquent par les réactions inter-radicalaires se produisant au cours du temps après formation de la trace qui sont également favorisées par la densité de celle-ci, donc par des TEL élevés.

Maintenant les rendements expérimentaux déterminés, des collaborations sont en cours avec le groupe DeSis de l'IPHC pour leur implémentation dans des codes de calcul Geant4-DNA. Les derniers résultats, après introduction des recombinaisons radicalaires, sont très prometteurs et en bon accord avec les mesures présentées dans ce chapitre. Toutefois, ces résultats sont encore trop préliminaires pour être présentés.

Les rendements mesurés seront également d'une grande utilité dans l'étude des dégâts indirects de radiolyse sur les biomolécules (notamment dans l'étude sur la phénylalanine). Nous verrons quelle sera l'influence des variations mesurées des quantités de HO• présentes en solution sur la modification chimique de dégâts aux biomolécules

Chapitre 4: Radiolyse d'acides aminés en solution aqueuse : la phénylalanine

I. Etat de l'art de la radiolyse de la phénylalanine

Au vu de leur teneur, les protéines seront statistiquement très impactées par les rayonnements ionisants lors de l'irradiation de l'organisme. C'est alors tout naturellement que la radiolyse de leurs briques de base, les acides aminés, est étudiée pour la compréhension des mécanismes fondamentaux de radiolyse des molécules du vivant. Tout milieu biologique étant constitué majoritairement d'eau, de nombreuses études ont décrit ces phénomènes de radiolyse des acides aminés en solution aqueuse.

A. La phénylalanine parmi les acides aminés

Parmi la diversité des acides aminés du vivant, les vingt acides aminés protéinogènes constituant le corps humain sont particulièrement intéressants pour des études de radiobiologie. Ils peuvent être classés en fonction de leur taille, de leur chaîne latérale, de leur point isoélectrique ou encore, de leur polarité (Figure 1-16 p49). Lors de leur radiolyse en milieu aqueux, c'est leur structure qui permet de les regrouper en différentes classes correspondant aux réactions susceptibles de se produire (Garrison, 1987). Parmi ces classes, on distingue les composés aliphatiques, les composés soufrés ou encore les composés aromatiques. Elles ont chacune leur réactivité propre et leurs mécanismes spécifiques. L'étude développée dans le cadre de ma thèse n'a pas vocation à comparer tous les acides aminés et tous les différents types de mécanismes. Pour étudier l'effet des ions et donc, du type de rayonnement, il est nécessaire de se focaliser sur quelques cibles et d'identifier les mécanismes spécifiques propres aux ions. Ainsi, dans un premier temps, il a fallu choisir les cibles lors des irradiations et notre choix s'est tourné vers les acides aminés aromatiques et plus spécifiquement, la phénylalanine.

Lors d'irradiation en solution aqueuse aérée, le radical hydroxyle est la principale source de dégâts aux biomolécules en solution. En effet, les $H\cdot$ et les e_{aq}^- sont efficacement captés par l'oxygène pour former $O_2^{\cdot-}$, lui-même peu réactif avec les molécules organiques en solution. Ainsi, la réactivité avec le radical hydroxyle est un paramètre clé pour choisir une cible. Les acides aminés aromatiques et soufrés ont les constantes de réaction avec le radical hydroxyle les plus élevées, de l'ordre de 10^9 à 10^{10} $L\cdot mol^{-1}\cdot s^{-1}$ (Tableau 1-4 p54). C'est pourquoi, ils ont été beaucoup étudiés pour comprendre les phénomènes de radiolyse. De plus, de nombreuses études de radiolyse se sont tournées en premier lieu vers les acides aminés aromatiques pour leurs propriétés d'absorption ou de fluorescence (Getoff, 1992). Dans notre cas, un système simple et bien connu est essentiel pour identifier d'éventuels mécanismes spécifiques aux ions. Ceci, additionné à la possibilité d'utiliser des détections basées sur les spectroscopies optiques, a motivé le choix de la phénylalanine. En effet, c'est le plus simple des acides aminés aromatiques, elle n'est pas composée d'un hétérocycle comme le tryptophane et l'histidine ou d'une fonction phénol comme la tyrosine qui ont une radiolyse plus complexe. De plus, la radiolyse de la phénylalanine a déjà

été largement étudiée sous rayonnement gamma et électrons ce qui servira de base pour une étude avec des ions.

B. La L-Phénylalanine

La phénylalanine (code Phe ou F) est un acide aminé α (amine en α du carbonyle) comme les dix-neuf autres acides aminés protéinogènes constituant les protéines du corps humain (Figure 4-1). Ce centre carboné est également un centre stéréogène et le stéréo-isomère L (ou S) est celui présent dans le vivant. A pH biologique, elle est sous forme zwitterion. Cependant, elle est le plus souvent représentée sans charges ponctuelles, cette notation sera donc utilisée par la suite dans ce manuscrit. Ses pKa sont de 1,83 pour la fonction acide et de 9,13 pour la fonction amine. Lorsque la phénylalanine est incluse dans une protéine, les groupements carbonyle et amine forment des liaisons peptidiques avec les acides aminés voisins ce qui constitue la chaîne principale. Son substituant (souvent appelé R) correspond alors à un groupement phényle qui lui confère ses propriétés hydrophobes mais aussi spectroscopiques. En effet, la phénylalanine absorbe dans l'UV à 260nm mais possède également un spectre de fluorescence, comme il sera vu dans la partie expérimentale par la suite.

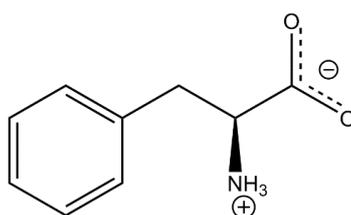


Figure 4-1 : Structure de L-Phénylalanine à pH biologique sous forme Zwitterion.

Sa première observation remonte à 1879 où elle a été isolée à partir de graines de Lupin jaunes par Schultze et Barbieri. Par la suite, elle a été formellement décrite comme brique de base du corps humain lors de la célèbre expérience de Nirenberg et Matthaei, en 1961, qui furent récompensés d'un prix Nobel. Ils identifièrent pour la première fois un codon génétique d'ADN, celui codant pour l'introduction d'une phénylalanine dans la fabrication d'une protéine. Cette dernière est aujourd'hui connue pour être un acide aminé essentiel, c'est-à-dire non synthétisé par le corps humain. Elle est ainsi absorbée par le corps dans l'alimentation et on la retrouve dans la plupart des aliments communs comme les céréales, les légumes, les fruits, les viandes, etc. Dans le corps humain, elle représente 3,5% de l'abondance totale en acides aminés dans les protéines (Bruice, 2004). La phénylalanine est également métabolisée pour conduire notamment à la formation de tyrosine, de dopamine, de dihydroxyphénylalanine ou encore d'adrénaline (Lindemann and Hoener, 2005).

En raison de sa simplicité et de ses propriétés spectroscopiques, les mécanismes fondamentaux de sa radiolyse ont été très étudiés sous rayonnement à faible TEL et sont maintenant bien connus, comme nous le verrons par la suite. Ainsi, comme application, la phénylalanine a été proposée comme sonde *in vivo* de radicaux hydroxyles. Cette technique est basée sur la production des espèces d'hydroxylation de la phénylalanine : les tyrosines. Cependant, cette procédure est limitée par la métabolisation de la phénylalanine par le corps qui conduit à la formation des mêmes produits. Dans ce cadre, la D-phénylalanine peut être utilisée comme capteur de HO• car cette dernière ne sera pas métabolisée mais comporte toujours les mêmes mécanismes de radiolyse que son isomère (Biondi et al., 2001).

A. Radiolyse de la phénylalanine

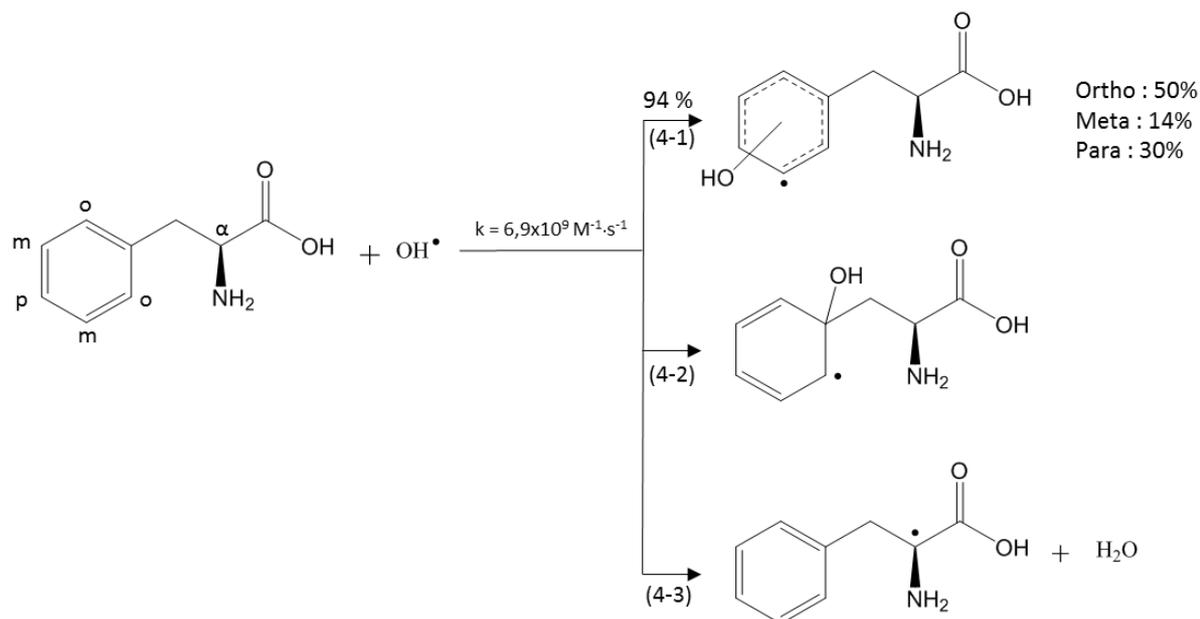
1) Mécanisme de radiolyse à faible TEL

La plupart des études menées sur les mécanismes fondamentaux de radiolyse de la phénylalanine ont été réalisées sous irradiation gamma ou avec des électrons rapides. Une synthèse de ces études est faite dans cette partie.

a) Attaque du radical hydroxyle

En milieu biologique, le radical hydroxyle est la principale source de dégâts aux biomolécules en solution aérée. Dans le cas de solution de phénylalanine, ce radical réagit avec une constante de réaction de $6,9 \times 10^9 \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ pour conduire à la formation d'espèces radicalaires intermédiaires (Solar, 1985). Dans 94% des cas, la réaction conduit à la formation de radicaux de type hydroxy-cyclohexadiényle avec un adduit OH en position ortho, para ou méta (réaction 4-1) (Solar, 1985). Une étude de radiolyse pulsée, menée par Solar, a permis de déterminer les proportions en radicaux hydroxy-cyclohexadiényles suivant la position de l'adduit par mesures résolues en temps du spectre UV Visible. Ainsi, les proportions formées seraient de 50% pour l'adduit en ortho, 30% en para et 14% en méta (Solar, 1985). Les 6% de radical HO• restants conduisent à la formation de l'adduit ipso, également par cycloaddition du radical (réaction 4-2). De même, celui-ci peut capter le proton du carbone alpha pour conduire à la formation du radical intermédiaire de type benzyle (réaction 4-3). Si cette dernière voie de réaction est classique dans les protéines ou polypeptides (Garrison, 1987), elle se produit de manière anecdotique dans le cas de la phénylalanine (Solar, 1985; Wang et al., 1993). Par la suite, seuls les intermédiaires de réactions formés par la réaction 1 seront considérés. Cette voie, largement majoritaire, conduit notamment à la formation des tyrosines qui sont donc les principaux produits de radiolyse de la phénylalanine à faible TEL. Ces radicaux intermédiaires vont également réagir suivant des voies de réaction très dépendantes des conditions physico-chimiques du milieu. Dans un premier temps, les

conditions physiologiques seront abordées c'est-à-dire à pH neutre en condition aéré. Par la suite, l'influence de l'oxygène, du pH ou d'agents chimiques sera discutée.



Équations 4-1 à 4-3 : Voies de réaction du radical hydroxyle avec la phénylalanine. Figure adaptée d'après (Solar 1985).

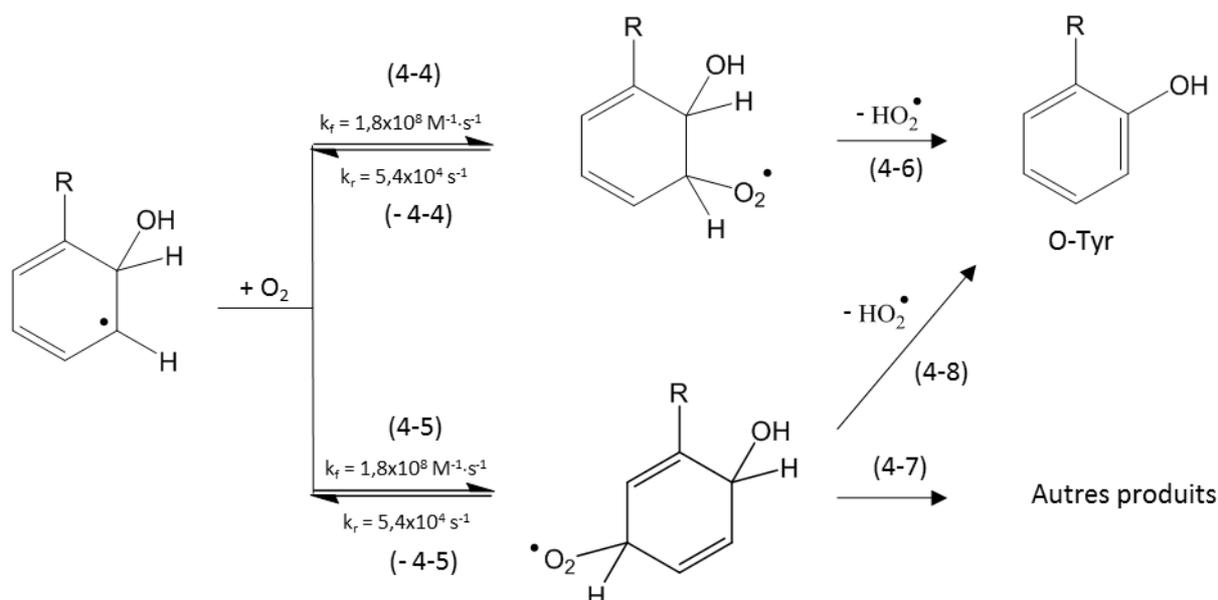
b) Milieu oxygéné, pH neutre

Après formation du radical hydroxy-cyclohexadiényle par la réaction 4-1, l'électron célibataire peut se délocaliser sur le système aromatique. En milieu aéré, le dioxygène dissous a une concentration maximale de 0,24 mM et réagit avec le radical suivant un équilibre réversible selon les réactions 4-4 et 4-5 (Wang et al., 1993). S'en suit alors la formation du radical hydroxy-cyclohexadiényle avec un adduit peroxyde. Si le peroxyde est situé en ortho du groupement hydroxyle, la tyrosine correspondante se forme par élimination de HO_2^\bullet (réaction 4-6). En revanche, lorsque le peroxyde est à l'opposé du groupement hydroxyle, la réaction peut conduire à la formation d'autres produits de radiolyse (réaction 4-7)(Wang et al., 1993). ou également, à la formation de la tyrosine par le même moyen (réaction 4-8)(Krajnik et al., 1995). De cette manière, se forment les trois isomères de tyrosine, ortho, méta et para. Plusieurs études décrivent les quantités relatives produites pour les isomères ortho/méta/para à pH neutre :

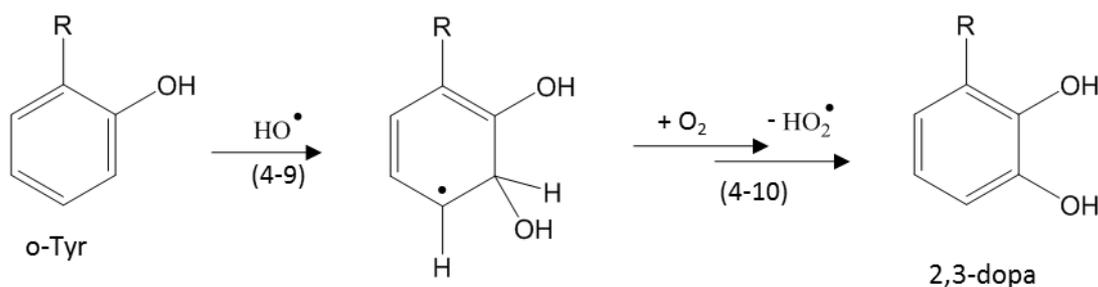
- 0,8/0,8/1 sous air à une concentration de phénylalanine de 5mM (Maskos et al., 1992).
- 1/0,9/1 en milieu $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$ (Concentration non précisée)(Wang et al., 1993).
- 1/0,6/0,8 à 1/0,8/1 sous air pour des concentrations en phénylalanine de 0.25 à 2.5mM (Krajnik et al., 1995).

Ces proportions varient en fonction de la concentration en phénylalanine mais ne correspondent pas aux proportions d'additions du radical hydroxyle sur le cycle aromatique (1/0,3/0,6) décrites par Solar pour des concentrations de 5 μM à 5mM en phénylalanine. Ces différences sont

attribuées à des réorganisations du système après addition du radical hydroxyle (réaction 4-4 et 4-5) ou à des réactions annexes (réaction 4-7). Dès lors, la somme des rendements de production des tyrosines varie de 44 à 52% par rapport à la production initiale en radical hydroxyle en fonction des concentrations en phénylalanine (0,25 à 5mM)(Krajnik et al., 1995; Maskos et al., 1992).



Équation 4-4 à 4-8 : Réaction du radical hydroxy-cyclohexadiényle avec le dioxygène. L'exemple est pris pour l'adduit OH en position ortho, mais les mécanismes sont similaires pour les adduits méta ou para. R = NH₂-CH(CH₂)-COOH. (Garrison, 1987)

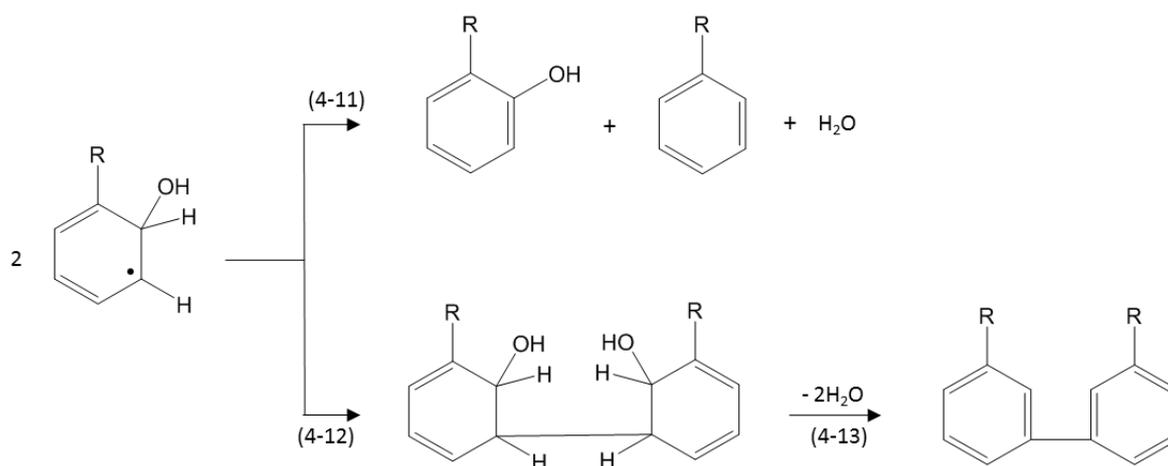


Équation 4-9 et 4-10 : Réaction de la o-tyrosine avec le radical hydroxyle conduisant à la formation 2,3-dopa. Mécanisme valable également pour les autres isomères de tyrosine, avec des additions de radical en méta du groupe hydroxyle. R=NH₂-CH(CH₂)-COOH. (Garrison, 1987).

Dans des cas d'irradiation à haute dose (>1000 Gy), la production de dihydroxyphénylalanine a également été observée en faibles proportions (Krajnik et al., 1995; Maskos et al., 1992). Cette formation a été attribuée à une sur-irradiation et donc, à la radiolyse des tyrosines déjà formées. Elle se fait par un mécanisme similaire à celui décrit précédemment à partir de la phénylalanine et selon les réactions 4-9 et 4-10.

a) Milieu désoxygéné, pH neutre

Afin de rester dans les mêmes conditions de radiolyse, les expériences en milieu désoxygéné sont généralement réalisées sous atmosphère N_2O qui réagit avec l'électron hydraté pour aboutir à une « conversion » de celui-ci en radical hydroxyle. L'atome d'hydrogène, quant à lui, a un rendement de formation bien plus faible que celui du radical hydroxyle et de l'électron hydraté et n'interagit que très marginalement. Ainsi, les radicaux hydroxy-cyclohexadiényles résultants de la réaction 4-1 sont bien formés et vont réagir entre eux en milieu désoxygéné pour conduire à la formation des tyrosines selon la réaction de dismutation 4-11. Cependant, dans ces conditions, seuls 10% des radicaux hydroxyles sont convertis pour former les tyrosines en proportions 1/1.4/1.5 (Wang et al., 1993). Le deuxième type de produit de radiolyse, observé dans ces conditions, est la formation de dimères qui se fait selon les réactions 4-12 et 4-13 après réaction de deux hydroxy-cyclohexadiényles puis élimination de deux molécules d'eau.



Équation 4-11 à 4-13 : Réaction de dismutation ou de dimérisation du radical hydroxy-cyclohexadiényle. L'exemple est pris pour l'adduit OH en position ortho, mais les mécanismes sont similaires pour les adduits méta ou para. $R = NH_2-CH(CH_2)-COOH$. (Garrison, 1987).

b) Variations du pH et additifs

Comme énoncé précédemment, le pH va jouer un rôle prépondérant sur les mécanismes de radiolyse. En effet, dans le cas de la phénylalanine, si la formation de tyrosines est stable sur une gamme de pH allant de 5 à 7, elle semble diminuée pour les faibles pH et elle s'effondre brusquement à pH 8 pour ensuite remonter (Figure 4-2, A) (Maskos et al., 1992). Cette brusque diminution de la production de tyrosines a été corrélée par les auteurs avec des solutions devenant jaunes ainsi que l'apparition d'un précipité noir de type mélanine. Ceci a été attribué à l'instabilité des produits d'hydroxylation à ce pH et à leur polymérisation.

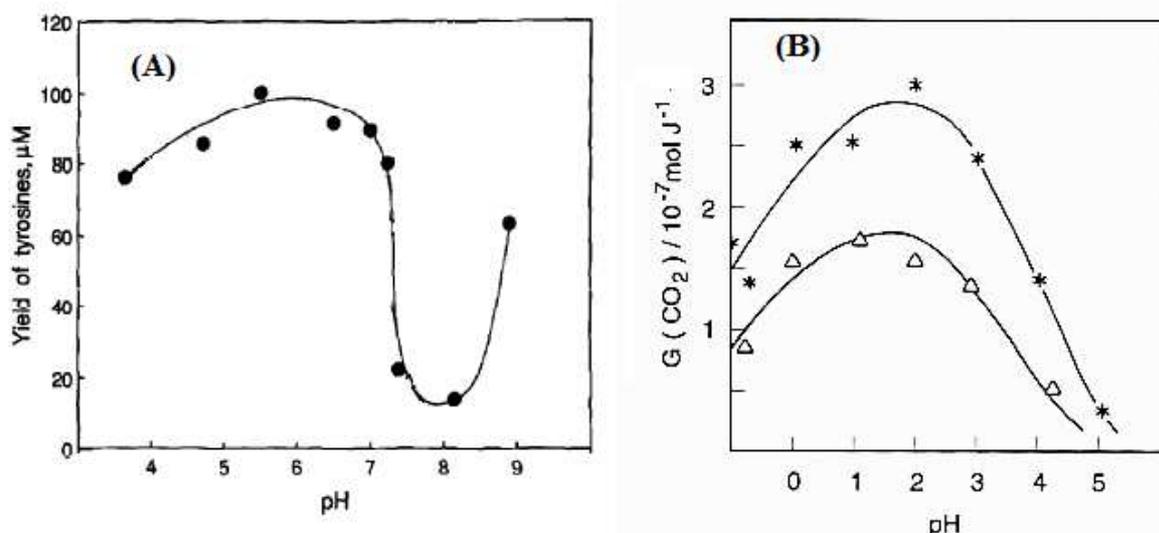
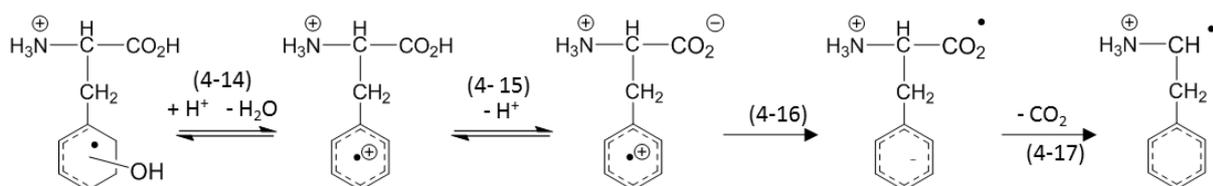


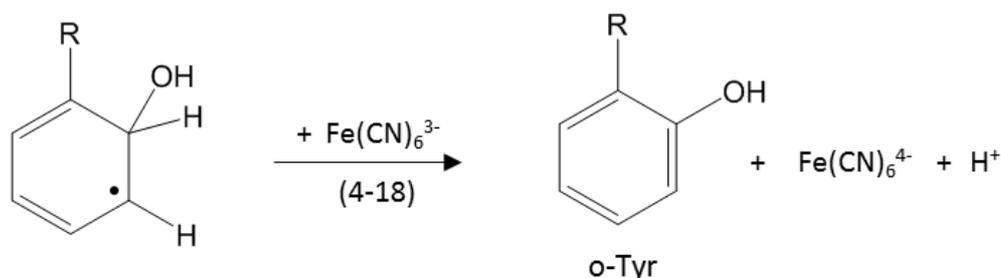
Figure 4-2 : A : Production des tyrosines en fonction du pH pour des irradiations gamma ⁶⁰Co à 570Gy de phénylalanine à 5mM en milieu aéré. Figure provenant de (Maskos et al., 1992). B : Production de CO₂ résultant de la décarboxylation de la phénylalanine en fonction du pH sous irradiation gamma ⁶⁰Co à différents débits de dose. (*) 4,6x10⁻³ Gy/s, (Δ) 0.37 Gy/s. Figures provenant de (Wang et al., 1993).

A faible pH, la production de tyrosines diminue. Ceci est a priori corrélé avec l'augmentation de la production de CO₂ (Figure 4-2, B) et dépend également du débit de dose. Le mécanisme qui conduit à la décarboxylation de la phénylalanine est également initié par l'addition d'un radical hydroxyle sur le cycle aromatique aboutissant à la formation d'un radical hydroxycyclohexadiényle (réaction 4-1). Après équilibre acido-basique (réactions 4-14 et 4-15), un radical cation est formé, c'est par un transfert d'électron intramoléculaire vers le carbonyle (réaction 4-16) que la décarboxylation est initiée (réaction 4-17). Cette décarboxylation présente un optimum à pH 2 car à très faible pH, la réaction 4-15 n'a plus lieu. Celle-ci est complètement déplacée dans le sens inverse. Le même type de mécanisme a pu être observé lors de l'introduction du radical SO₄^{•-} en solution à pH neutre lors d'irradiations gamma d'une solution de K₂S₂O₈. Ce radical est connu pour oxyder les composés aromatiques en formant un cation radicalaire. La décarboxylation a alors lieu de la même façon suivant la réaction 4-16 et 4-17.



Équation 4-14 à 4-17 : Réaction de décarboxylation lors de la radiolyse de la phénylalanine en milieu acide. (Wang et al., 1993).

Un autre composé régulièrement introduit en solution lors d'expériences de radiolyse est un oxydant fort, le ferricyanure : $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. Dans le cas d'irradiation de la phénylalanine, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ convertit quantitativement les radicaux hydroxy-cyclohexadiényles produits par la réaction 1 en tyrosines et est donc plus efficace que les réactions 4-4 et 4-6 d'addition de l'oxygène sur ce composé. Ceci résulte d'une réduction du fer(III) de l'ion $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ en fer(II) selon la réaction 4-18.



Équation 4-18 : Réaction entre un radical hydroxy-cyclohexadiényle et le ferricyanure.
(Buxton et al., 1986)

2) Effets de TEL

A notre connaissance, il n'existe qu'une étude de la radiolyse de la phénylalanine par des ions accélérés, celle menée par Tagushi et al. en 2001. Dans celle-ci, les auteurs mesurent des rendements différentiels de production des tyrosines sous faisceau d'ions carbone, néon et xénon de plusieurs centaines de MeV (Figure 4-3). Ces ions correspondent à des TEL allant de 100 à 3000 eV/nm. Les solutions de phénylalanine irradiées étaient de concentration 13mM à pH 5.7 en milieu désoxygéné (purgées à l'hélium). La courbe de rendement de production des tyrosines de chaque particule décroît en fonction de l'augmentation du TEL, ce qui traduit les recombinaisons radicalaires intra-traces ayant lieu à fort TEL. Ainsi, à TEL plus fort, moins de radicaux hydroxyle seront disponibles en solution. A TEL équivalent, pour deux particules différentes, un très fort effet de Z de la particule est observé. Cet effet est attribué à la production d'électrons secondaires énergétiques capables de réaliser leur propre trace secondaire en solution et ainsi, d'augmenter la production en radical hydroxyle (Chap 1. I et II.). De même, les auteurs ont calculé les rendements attendus en tyrosines, ceci en tenant compte des rendements de production de $\text{HO}\cdot$ pour les mêmes particules et de l'estimation que seuls 10% de ces radicaux sont convertis en tyrosines en milieu désoxygéné. Cependant, des rendements trois fois supérieurs ont été mesurés, et même supérieurs à ceux obtenus avec des rayons gamma dans les mêmes conditions pour les particules les plus énergétiques. Les auteurs ont attribué cette surproduction de tyrosines à fort TEL à la production d'oxygène intra trace qui permettrait de convertir plus efficacement les radicaux hydroxyles en tyrosines. Si cette étude montre un fort effet de TEL sur la radiolyse de ce système, elle ne s'intéresse qu'à la production des tyrosines. Nous avons vu précédemment que d'autres mécanismes peuvent exister lors de la radiolyse de la phénylalanine,

c'est pourquoi une étude plus complète des produits formés est nécessaire pour pleinement comprendre les effets de TEL sur ce système.

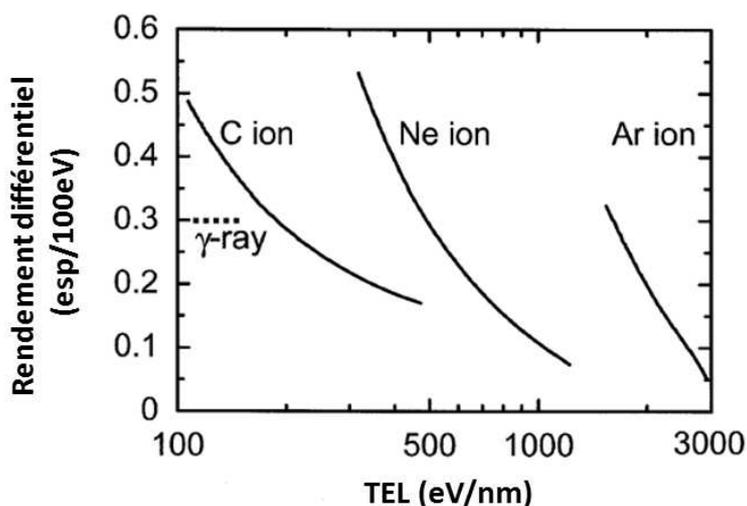


Figure 4-3 : Rendement différentiel de production des tyrosines en fonction du TEL pour des ions carbone, néon et argon. Figure provenant de (Taguchi et al., 2001).

II. Méthode expérimentale

Dans cette partie, le déroulement des irradiations est présenté. Les techniques analytiques mises en œuvre ainsi que leurs modes opératoires seront également décrits.

A. Irradiation de solutions diluées de phénylalanine

1) Produits chimiques utilisés

Les solutions aqueuses sont préparées à partir d'eau ultra pure provenant d'un appareil Milli-Q (résistivité à 25°C : 18,2 M Ω .cm⁻¹). Les produits chimiques sont utilisés sans traitement ou purification supplémentaire (Tableau 4-1).

Tableau 4-1 : Produits chimiques pour les expériences de radiolyse de la phénylalanine.

No. CAS	Produit chimique	Pureté	Fournisseur
63-91-2	L-Phénylalanine	≥99%	Sigma-Aldrich
778-06-4	DL-m-Tyrosine	≥95%	TCI
2370-61-8	DL-o-Tyrosine	≥96%	Sigma-Aldrich
60-18-4	L-Tyrosine	≥99%	Sigma-Aldrich
59-92-7	3,4-dihydroxy-L-Phénylalanine	≥98%	TCI
73-22-3	L-Tryptophane	≥98,5%	TCI
4350-09-8	5-Hydroxy-L-Tryptophane	≥98%	TCI
13472-35-0	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	≥98%	Sigma-Aldrich
7758-11-4	K ₂ HPO ₄	≥99%	Sigma-Aldrich
75-05-8	Acétonitrile	≥99,9%	Fisher Scientific
64-19-7	Acide acétique	≥100%	MERCK
75-65-0	tertio-butanol	≥99,5%	Sigma-Aldrich
1310-73-2	NaOH	≥97%	Sigma-Aldrich
12030-88-5	KO ₂	ns	ACROS
13746-66-2	K ₃ Fe(CN ₆).3H ₂ O	≥99%	Sigma-Aldrich
9001-05-2	Catalase	2000 à 5000 units/mg	Sigma-Aldrich
7722-84-1	H ₂ O ₂	30% dans H ₂ O (w/w)	MERCK
10024-97-2	N ₂ O	Alphagaz 1 <2ppm O ₂	Air liquide
7440-37-1	Argon	Alphagaz 1 <2ppm O ₂	Air liquide

2) Conditions d'irradiation

Les solutions de phénylalanine ont toutes été préparées à une concentration de 2×10^{-3} M, ce qui garantit un temps de capture du radical hydroxyle de 72 ns ($k = 6,9 \times 10^9$ (Solar, 1985)). Le pH a été fixé à 6,8 par l'utilisation de tampon phosphate ce qui correspond à un pH d'intérêt biologique. Typiquement, les solutions mères de phosphate monosodique (NaH₂PO₄.2H₂O) et dipotassique (K₂HPO₄) à 0,2 mol · L⁻¹ sont préparées, puis stockées jusqu'à plusieurs mois à 4°C. Le tampon phosphate, 66mM à pH = 6.8 est réalisé le jour même à partir des deux solutions mères. Pour 1L de solution tampon à 66mM, pH=6.8 : 163.2mL de NaH₂PO₄ à 0,2M + 170mL K₂HPO₄ à 0,2M. Le pH du mélange est contrôlé au pH-mètre périodiquement.

A partir de ces solutions de phénylalanine, deux types d'expériences d'irradiation ont été menées pour étudier la radiolyse de la phénylalanine. Dans le premier cas, les conditions chimiques des échantillons sont restées inchangées et seul le type de rayonnement a été modifié. D'autre part, en utilisant un rayonnement de référence (H⁺, 2MeV), les conditions chimiques d'irradiation ont

été modifiées. (Teneur en O₂, capteurs radicalaires, oxydants, ...). Dans la plupart des cas, le volume des échantillons préparés pour l'irradiation était de 50mL : 40mL servaient au rinçage et au conditionnement des circuits à circulation et les 10mL restants servaient de réservoir pour l'irradiation. Le volume total irradié est alors de 10mL plus le volume du circuit, soit environ 15mL. Ce réservoir permet de réaliser plusieurs prélèvements au cours de l'irradiation (typiquement 1mL) afin de suivre l'évolution des produits avec la dose

a) Rayonnements utilisés

Tableau 4-2 : Rayonnements utilisés pour les expériences « phénylalanine ». Les TEL des ions sont estimés par SRIM (Ziegler et al., 2010). Le TEL équivalent des rayons gamma a été estimé dans la référence (Meesungnoen et al., 2001).

Type de rayonnement	Energie en solution (MeV)	TEL dans l'eau (eV/nm)
H ⁺	0.5 à 5	24 à 7,5
	210	0,44
He ²⁺	3 à 21	130 à 30
C ⁶⁺	4 à 40	940 à 380
	4300	11,3
Gamma	0.662	Equivalent 0.91

Des irradiations avec différents types de rayonnements ont été réalisées dans le cas de la solution de référence de phénylalanine à 2x10⁻³ M dans du tampon phosphate 66mM à pH=6,8. Le but de ces expériences est de déterminer les rendements de production des espèces de radiolyse en fonction de l'énergie et du type de rayonnement (Tableau 4-2).

b) Variation des conditions chimiques d'irradiation

Lors des études mécanistiques de la formation des produits de radiolyse de la phénylalanine, des agents chimiques ont été introduits dans l'échantillon dans le but d'influencer la radiolyse. De cette manière, il est possible de modifier la radiolyse de l'eau et/ou d'influencer la radiolyse de la phénylalanine (Tableau 4-3).

Tableau 4-3 : Principe, conditions et but de l'utilisation d'agents chimiques pour étudier les mécanismes de radiolyse de la phénylalanine.

Agents chimiques	Conditions	Objectif	Principe de mise en œuvre
Tertio-butanol	Soluté, 0,05 mM	Tester l'influence de HO•	Capte HO• produit par la radiolyse de l'eau. Dans nos conditions 70% des HO• sont captés.
H ₂ O ₂	Soluté, 0,3 mM	Tester l'influence de H ₂ O ₂	Introduction du produit pendant, après ou hors irradiation
Catalase	Soluté, 5 μM		Dismute H ₂ O ₂ produit par la radiolyse de l'eau
Argon	Saturation en gaz (30min)	Tester l'influence de O ₂	Supprime O ₂ en désoxygénant la solution
N ₂ O		Tester l'influence de O ₂ ^{•-}	Convertit e _{aq} ⁻ issu de la radiolyse de l'eau, en HO• et empêche la formation de O ₂ ^{•-} (via e _{aq} ⁻ + O ₂ → O ₂ ^{•-})
KO ₂ à pH=12	Soluté, 0,5 mM		Génère O ₂ ^{•-} stable plusieurs minutes à pH=12
H ₂ ¹⁸ O	Solvant	Tester l'origine des hydroxylations	Différencie les hydroxylations provenant des HO• ou de O ₂ par analyse en spectrométrie de masse
K ₃ Fe(CN ₆).3H ₂ O	Soluté, 0,2 mM	Tester les voies de réaction O ₂	Compétition d'oxydation avec O ₂

Tous les agents chimiques ont été introduits en solution avant irradiation pour être actifs pendant la radiolyse. Le tertio-butanol, la catalase, la superoxyde dismutase et K₃Fe(CN₆).3H₂O ont simplement été ajoutés en solution lors de la préparation. Ils ont donc également été introduits dans la solution de rinçage pour le conditionnement du montage d'irradiation. Les études comportant H₂O₂, N₂O, et KO₂, ont, quant à eux, nécessité des conditions expérimentales plus spécifiques :

- H₂O₂ a également été ajouté hors ou après irradiation pour tester son influence et son pouvoir oxydant.
- Un bullage d'au moins 30 minutes des gaz N₂O ou Argon dans la solution a permis de désoxygéner cette dernière. Pour ce faire, un système de septum a été adapté sur un tube

corning afin d'isoler l'échantillon de l'atmosphère pour le conditionnement et pour l'irradiation. (Figure 4-4).

- KO_2 a été dissous dans une solution à $\text{pH}=12$ au plus proche de l'irradiation. En effet, $\text{O}_2^{\cdot-}$ n'est pas stable et se dismute en solution. Dans les conditions utilisées ($500\mu\text{M}$ à $\text{pH}=12$), son temps de demi-vie est estimé à 6,6min (Bielski and Arudi, 1983).



Figure 4-4 : A gauche : dégazage d'un échantillon de solution de phénylalanine sous N_2O . A droite : irradiation d'un échantillon de phénylalanine sous atmosphère N_2O .

B. Suivi en ligne

Pendant les expériences d'irradiation, les montages utilisés permettent le suivi en ligne de l'irradiation des solutions diluées de phénylalanine (Chap 2. III.). Ainsi, des analyses d'UV-Visible et de fluorescence ont pu être réalisées en continu (Figure 4-5 et Figure 4-6).

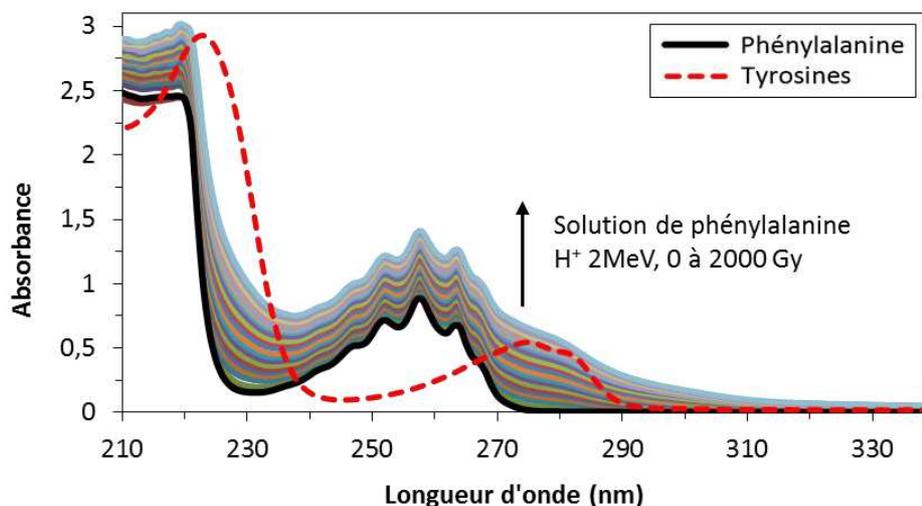


Figure 4-5 : Suivi en ligne d'une irradiation de solution diluée de phénylalanine par UV-Visible. $[\text{Phe}] = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$. $\text{pH} = 6,8$, tampon phosphate 66mM .

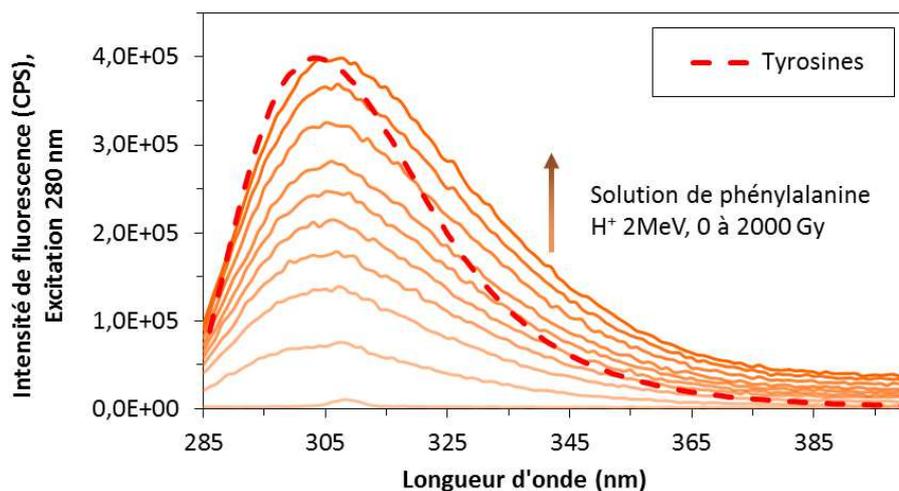


Figure 4-6 : Suivi en ligne d'une irradiation de solution diluée de phénylalanine par fluorescence. $[Phe] = 2 \times 10^{-3} M$. $pH = 6.8$, tampon phosphate 66mM.

Dans un premier temps, ces analyses ont permis de vérifier la linéarité des modifications observées en fonction de la dose déposée en solution ainsi que de confirmer la formation des tyrosines dans nos conditions. Malheureusement, en raison du recouvrement des propriétés spectroscopiques de ces produits, il est impossible de les quantifier par ces analyses en ligne. De même, au vu du déplacement dans les fortes longueurs d'onde des spectres mesurés par rapport aux signaux des tyrosines de référence, d'autres produits sont certainement présents mais ne peuvent être décrits formellement. Comme dans les cas des expériences sur la 3CCA, une technique d'analyse plus complète est nécessaire. La HPLC est une méthode de choix pour la séparation des mélanges complexes formés sous radiolyse. Celle-ci ayant permis une détermination complète des produits formés et leur quantification, nous n'avons pas cherché à exploiter plus en avant les spectres par déconvolution.

C. Analyses post-irradiation HPLC-DAD-Fluo-CAD-MS

Dans cette partie, les détails techniques des analyses par HPLC seront présentés. De même, la façon dont les produits de radiolyse de la phénylalanine ont été identifiés et quantifiés sera présentée.

1) Appareillage et conditions d'analyse

Les analyses ont été menées sur deux systèmes différents, le premier à Strasbourg et le second au HIMAC à Chiba. A Strasbourg, une HPLC Thermo Fisher Dionex Ultima 3000 RS équipée d'un passeur automatique WPS a été utilisée. Cette HPLC est couplée à un détecteur DAD (UV-visible à barrette de diodes) Thermo Scientific Ultima 300, un détecteur de fluorescence JASCO

FP4020, un détecteur d'aérosol chargé (CAD) Veo RS et un spectromètre de Masse LTQ Orbitrap XL Thermo Electron (MS) équipé d'une source d'ionisation par électronébulisation.

L'analyse est réalisée sur la gamme 200-600 nm sur le détecteur DAD et un suivi est privilégié à 270nm. Le détecteur de fluorescence a une valeur d'excitation de 280nm et d'émission de 310 avec un gain 100 puis 10 pour les produits plus fortement concentrés. A la sortie du DAD, l'éluant est séparé et une fraction est analysée par CAD. Le reste est analysé par spectroscopie de masse en mode positif. L'azote est utilisé comme gaz vecteur de nébulisation et desséchant, la température du tube transfert est fixée à 300°C et les voltages appliqués à l'électronébuliseur, au capillaire et aux multipôles sont optimisés pour la transmission de masses moléculaires relativement hautes. Les analyses sont réalisées sur une gamme 120-500 m/z. L'identification peut être assistée par des mesures de MS². L'ion précurseur est alors isolé et fragmenté par dissociation induite par collision.

A Chiba, les analyses ont été réalisées sur une HPLC-DAD Hitachi F-2700. Les analyses UV sont réalisées sur une gamme de 200 à 600nm et le suivi est enregistré à 270nm.

2) Séparation et identification des produits de radiolyse

Les produits ont été séparés sur une colonne Hypersil Gold C18 (250 x 4.6 mm, d.i. 5µm) équipée d'une colonne de garde Hypersil Gold. La séparation se fait par un gradient de solution A (0.2% acide acétique dans l'eau) et de solution B (0.1% acide acétique dans l'acétonitrile) : de 0 à 26 min : 99% A, 27 à 33 min : 50% A, 34 à 48 min : 99% A. Le débit en éluant est fixé à 0.8 mL.min⁻¹ et la séparation est réalisée à 10°C. Pour les échantillons classiques de phénylalanine après irradiation, le volume injecté est de 100µL. Un chromatogramme typique des irradiations est présenté ci-dessous (Figure 4-7). La 3,4-dihydroxyphénylalanine (3,4-dopa), la para-tyrosine (p-tyr), la méta-tyrosine (m-tyr), l'ortho-tyrosine (o-tyr) et la phénylalanine ont été identifiées par l'injection de leur standard dans les mêmes conditions de séparation. Ce sont les produits 1, 4, 5, 6 et 7 sur le chromatogramme présenté ci-dessous (Figure 4-7). L'identification de ces produits a également été confirmée par leur masse respective (Figure 4-8). Les produits 2 et 3 ont en premier lieu été identifiés comme étant très probablement des dihydroxyphénylalanines grâce à leur spectre de masse haute résolution. Les structures exactes de ces isomères ont été déterminées grâce à leur spectre UV-Visible respectif décrit dans la littérature (Žegota et al., 2005). Le produit 2 correspond à la 2,5-dihydroxyphénylalanine (2,5-dopa) et le produit 3 à la 2,3-dihydroxyphénylalanine (2,3-dopa). Leurs longueurs d'onde d'absorption maximales sont respectivement de 292 et de 276 nm pour leurs bandes aromatiques (Figure 4-9). Les analyses HPLC-MS ont mis en évidence que la bande 8 du chromatogramme correspond principalement à des dimères de type Phe-Phe, cependant la présence de dimères de type Phe-Tyr a également été observée (Figure 4-8). Ces derniers n'ont pu être séparés ni en fonction de leur masse, ni en fonction de leur structure. En effet, la nature de la liaison Phe-Phe ou Tyr-Phe n'a pas pu être déterminée. Par la suite, ces produits seront présentés comme un seul sous le nom de dimères et calibrés avec la masse Phe-Phe, espèce largement majoritaire, soit 328 g/mol.

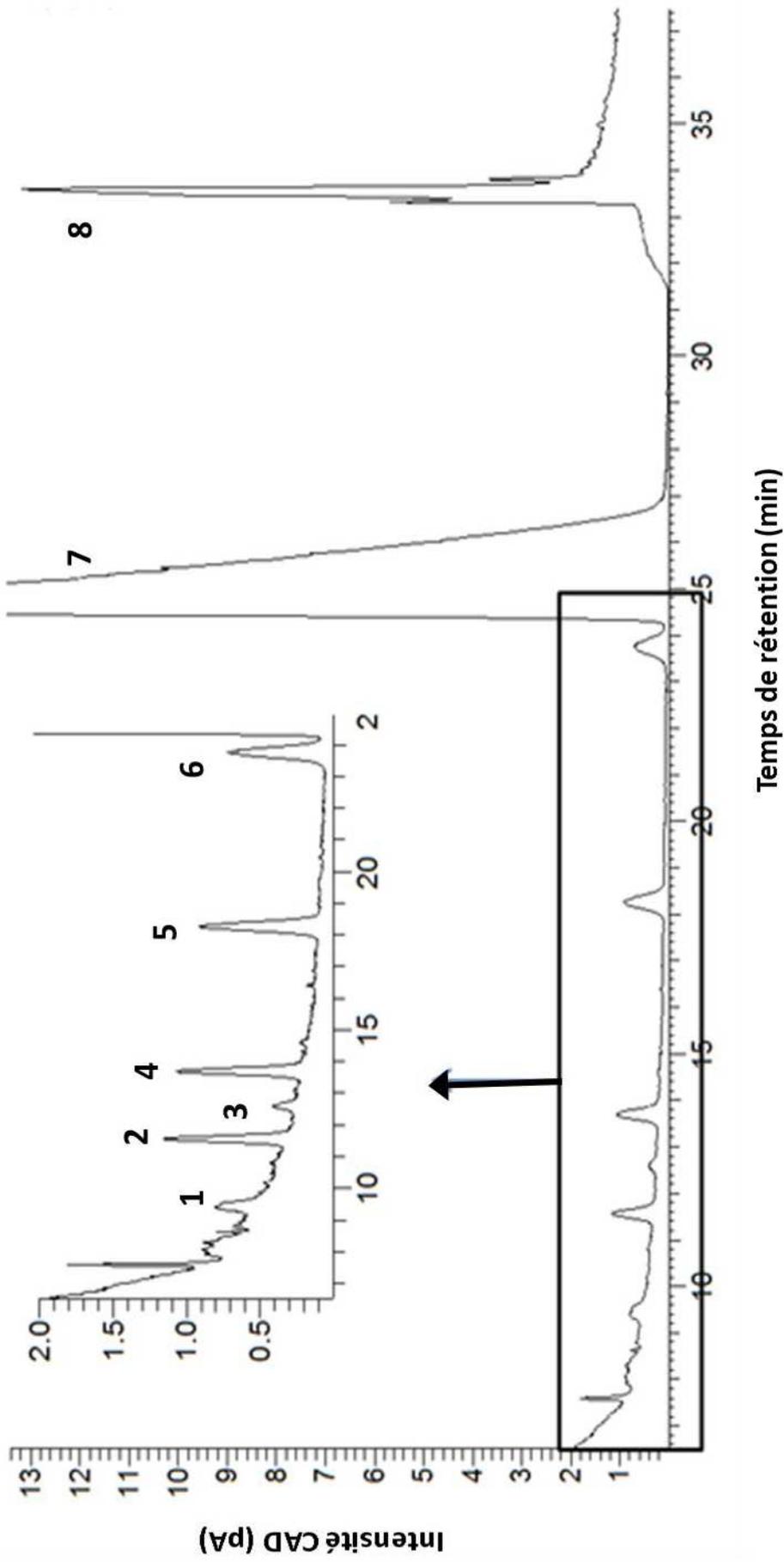


Figure 4-7 : Chromatogramme obtenu par le CAD pour un échantillon typique de phénylalanine irradié. H^+ 2 MeV, 200 Gy, $[Phe] = 2 \times 10^{-3}$ M, $pH = 6.8$, tampon phosphate 66mM. **1:** 3,4-dihydroxyphénylalanine (3,4-dopa) ; **2:** 2,5-dihydroxyphénylalanine (2,5-dopa) ; **3:** 2,3-dihydroxyphénylalanine (2,3-dopa) ; **4:** para-tyrosine (p-tyr) ; **5:** méta-tyrosine (m-tyr) ; **6:** ortho-tyrosine (o-tyr) ; **7:** phénylalanine ; **8:** dimères.

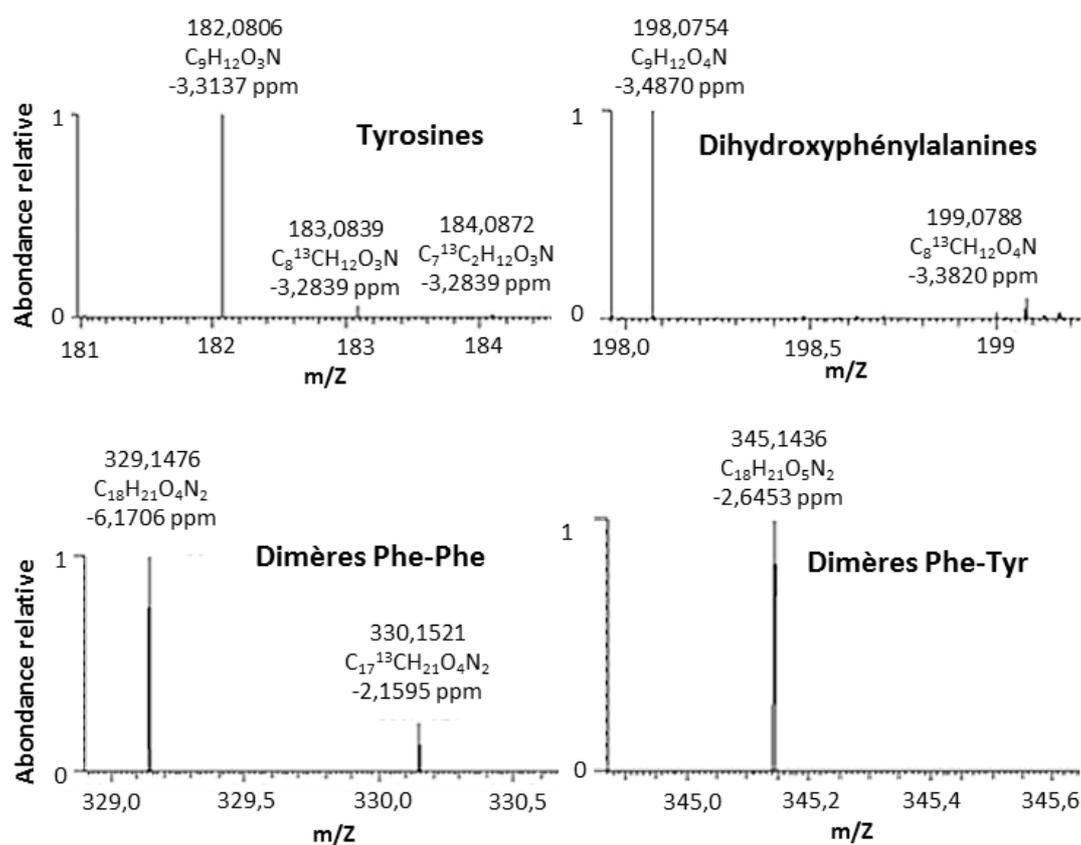


Figure 4-8 : Analyse isotopique et comparaison aux masses théoriques par spectrométrie de masse des produits de radiolyse de la phénylalanine : les tyrosines, les dihydroxyphénylalanines et les dimères. [Phe] = 2×10^{-3} M, pH= 6.8, tampon phosphate 66mM

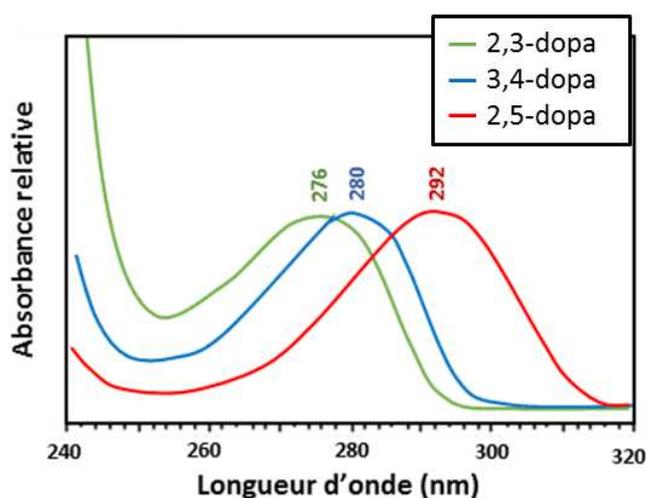


Figure 4-9 : Schéma des absorbances relatives des trois dihydroxyphénylalanines réalisé à partir des mesures sur le DAD de la HPLC du montage HIMAC. Le maxima d'absorption de chaque espèce est décrit dans la littérature et correspond respectivement à 277,4, 281,0 et 292,8 pour la 2,3-dopa, 3,4-dopa et la 2,5-dopa. (Žegota et al., 2005), les maxima mesurés sont 276, 280 et 292 ± 1 .

3) Quantification des produits de radiolyse

Comme les standards de la 2,3-dopa, la 2,5-dopa et des dimères sont introuvables dans le commerce, des étalonnages simples n'ont pas pu être réalisés pour la quantification des produits issus de la radiolyse. La technique mise en œuvre est alors basée sur le détecteur CAD. Ce dernier a une réponse proportionnelle à la masse dans les mêmes conditions d'éluant indépendamment de la structure des produits (Ligor et al., 2013). Après avoir vérifié que le CAD a une réponse identique pour des composés similaires, des étalonnages en masse ont été réalisés pour les deux conditions d'éluant (1% et 50%) à partir des molécules similaires disponibles commercialement (Figure 4-10). La phénylalanine, les tyrosines et le 5-hydroxy-tryptophane ont été utilisés pour calibrer le CAD avec 1% d'ACN. Le tryptophane a été utilisé dans le cas de l'éluant à 50% d'ACN.

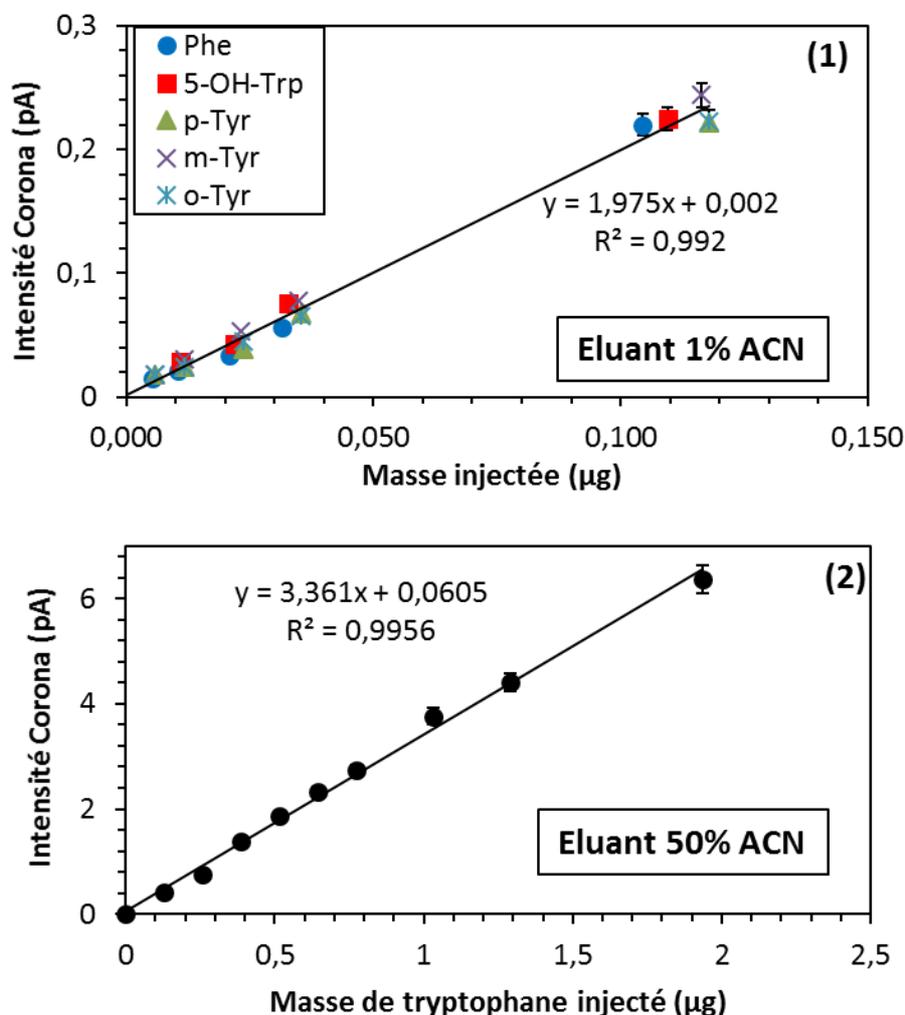


Figure 4-10 : Etalonnage en masse pour le détecteur Corona dans les conditions d'éluant 1% et 50% en Acétonitrile, respectivement (1) et (2). Les standards ont été choisis parmi des acides aminés aromatiques et leurs dérivés en fonction de leur temps d'éluant dans les conditions d'analyse.

La sensibilité du détecteur CAD est relativement basse mais ne permet pas des mesures précises en dessous des concentrations massiques de l'ordre de 0,1 mg/L, soit des concentrations correspondant au micromolaire pour des composés de type acide aminé. Ainsi, pour de faibles doses irradiées, donc de faibles quantités de produit, la précision sur la quantification directe est faible. Parmi les détecteurs disponibles à Strasbourg, le détecteur de fluorescence est de loin le plus sensible. Des irradiations à hautes doses ont permis de calibrer la détection par fluorescence (excitation : 280nm, émission : 310nm, gain10) en fonction du signal de Corona pour chacun des produits (Tableau 4-4). La détection par fluorescence est ensuite utilisée comme technique de routine (Equation 4-20).

Tableau 4-4 : Facteur de convention utilisés entre les mesure d'UV à 270nm et de fluorescence (excitation : 280, émission : 310, gain10) par rapport au signal du Corona pour les produits de radiolyse de la phénylalanine.

Produits	Masse molaire	Aire UV270 Stras/Corona		Aire FluoStras_G10/Corona	
		Conversion	Erreur	Conversion	Erreur
3,4-dopa	197	3,90	12%	1,49E+07	3,%
2,5-dopa	197	1,98	3%	3,19E+06	8%
2,3-dopa	197	3,93	6%	6,98E+06	5%
p-tyr	181	2,49	4%	8,44E+06	1%
m-tyr	181	3,51	3%	1,07E+07	1%
o-tyr	181	4,34	5%	1,53E+07	2%
dimères	328	2.98	4%	1,50E+07	5%

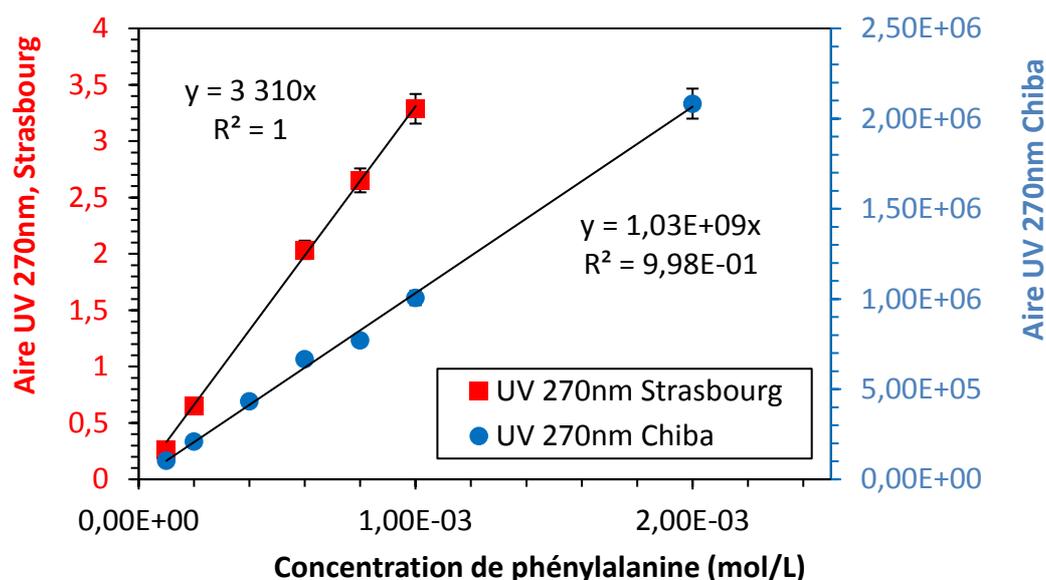


Figure 4-11 : Etalonnage de la détection UV à Chiba par rapport à la détection UV à Strasbourg à 270nm. Rapport UVchiba/UVstras = $3,12 \times 10^{-5}$.

Pour les expériences réalisées à Chiba, la seule détection possible est l'UV-Visible. Ainsi, en utilisant la quantification absolue du Corona à Strasbourg et en faisant le parallèle entre l'UV à Strasbourg et à Chiba suivant la longueur d'onde 270 nm, il est possible de quantifier tous nos produits. Ainsi, la phénylalanine a été utilisée pour réaliser un étalonnage sur les deux appareils à 270nm afin de pouvoir utiliser les courbes d'étalonnage du détecteur CAD. (Tableau 4-4) (Figure 4-11) (Equation 4-19).

En ce qui concerne la production de la 2,5-dopa, elle évolue fortement sur des temps longs après l'irradiation (Figure 4-12). En effet, elle se forme jusqu'à plusieurs heures après la fin de l'irradiation avant d'atteindre un plateau au bout d'environ 10h. Pour sa bonne quantification, les analyses sont réalisées systématiquement sur le plateau allant de 10 à 40 heures après l'irradiation. Les autres produits sont stables sur toute cette plage temporelle.

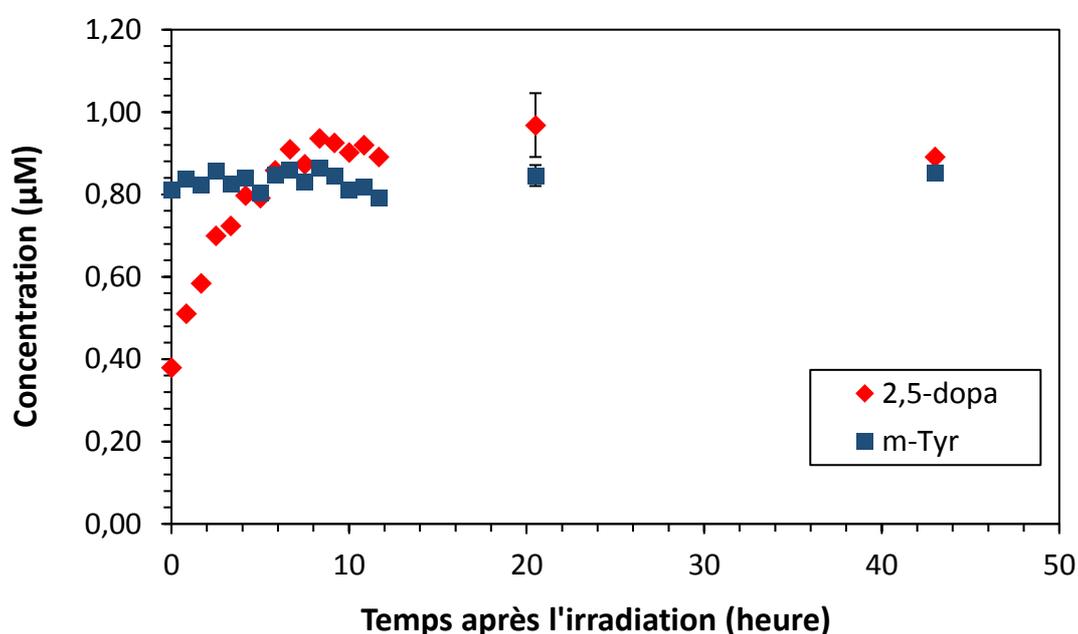


Figure 4-12 : Domaine de stabilité de la formation de 2,5-dopa après irradiation en comparaison avec la m-tyr, H^+ 1 MeV, 200Gy, $[Phe] = 2 \times 10^{-3}$ M, pH= 6.8, tampon phosphate 66mM.

III. Résultats et discussion

A. Mesures intégrales et rendements différentiels

Les mesures réalisées visent à quantifier les espèces produites en fonction de la dose déposée. Ainsi, pour chaque échantillon, les concentrations sont déduites des mesures HPLC et il est possible d'obtenir le rendement de production de chaque espèce en connaissant précisément la

dose déposée. Les mesures réalisées avec des particules de faibles énergies correspondent à des mesures intégrales car les particules sont totalement stoppées en solution, et donc leur TEL varie fortement dans l'échantillon. L'objectif est alors de revenir aux rendements différentiels à TEL constant correspondant à des pertes d'énergie infinitésimales de la particule en solution. Ces rendements différentiels peuvent être obtenus en multipliant les mesures intégrales. Dans le cas des rayons gamma ou des faisceaux de particules de hautes énergies, les rendements obtenus sont directement les rendements différentiels car ces rayonnements sont très pénétrants et traversent nos échantillons avec un TEL quasi-constant.

Les données brutes et leurs traitements sont d'abord détaillés dans cette partie et seront exploités au cas par cas par la suite.

1) Protons de basses énergies

Les expériences d'irradiation avec des protons de basses énergies ont été menées sur la plateforme ACACIA de Strasbourg et dans la medium energy room du HIMAC. Des résultats très corrélés ont été obtenus pour les espèces de radiolyse de la phénylalanine (Figure 4-13).

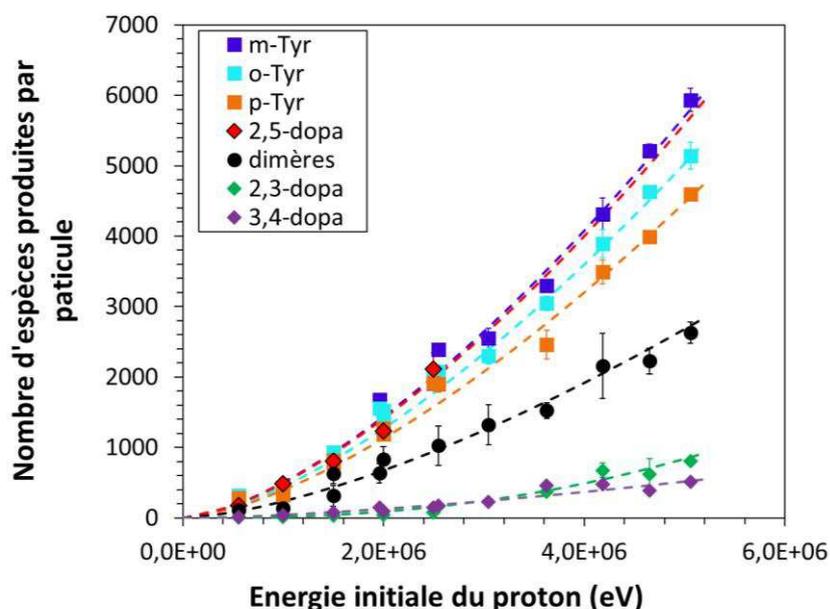


Figure 4-13 : Mesure du nombre d'espèces produites par particule en fonction de l'énergie initiale pour des protons de basses énergies en milieu oxygéné. Mesure réalisée sur la MEXP-Chiba (1,4; 1,9 ; 2,55; 3,05; 3,63; 4,18 ; 4,65, Et 5,06 MeV) et à Strasbourg (0,56 ; 1 ; 1,5 ; 1,7 ; 2. 2,5 MeV). [Phe] = 2×10^{-3} M, pH= 6.8, tampon phosphate 66mM. Les intervalles de confiance sont estimés à partir de plusieurs mesures pour chaque point.

Parmi ceux-ci, on retrouve la formation en proportion importante des produits d'hydroxylation, les trois isomères de la tyrosine : ortho, meta et para. On observe également les espèces de double hydroxylation, la 2,3-dopa et la 3,4-dopa en faible quantité. De façon plus inattendue, on

remarque la formation importante de dimères qui, dans la littérature, était décrite uniquement en condition désoxygénée à faible TEL. Le second produit très intéressant est un autre produit de double hydroxylation, la 2,5-dopa. Cette dernière est formée en très forte quantité et est équivalente ou supérieure à la formation des tyrosines, ce qui la différencie fortement des 2,3-dopa et 3,4-dopa. A noter que pour un souci de cohérence, les mesures de la 2,5-dopa provenant du HIMAC ne sont pas présentées car elles n'ont pas pu être réalisées dans des conditions analytiques satisfaisantes. A cette période, le temps d'analyse optimal de la 2,5-dopa n'était pas alors connu (Figure 4-12). Il serait intéressant de refaire ces points pour des protons de 2 à 5,5 MeV.

2) Particules alpha et ions carbone de basses énergies

De la même manière que décrit précédemment, les espèces issues de la radiolyse ont été quantifiées pour les expériences d'irradiation sous particules alpha et sous ions carbone (Figure 4-14 & Figure 4-15). On retrouve les mêmes espèces que celles observées pour les irradiations sous protons. Les tendances en fonction de l'énergie initiale des particules sont toujours similaires. Si l'on retrouve en quantité très importante la formation de dimères avec des particules alpha, elle s'effondre lors des expériences avec les ions carbone. La 2,5-dopa reste, quant à elle, produite majoritairement avec les deux types d'ions suivis par les tyrosines. Les autres produits de double hydroxylation, la 2,3-dopa et 3,4-dopa sont minoritaires pour ces deux types d'ions. Toutes les expériences avec ces ions ont été réalisées dans la medium énergie room du HIMAC.

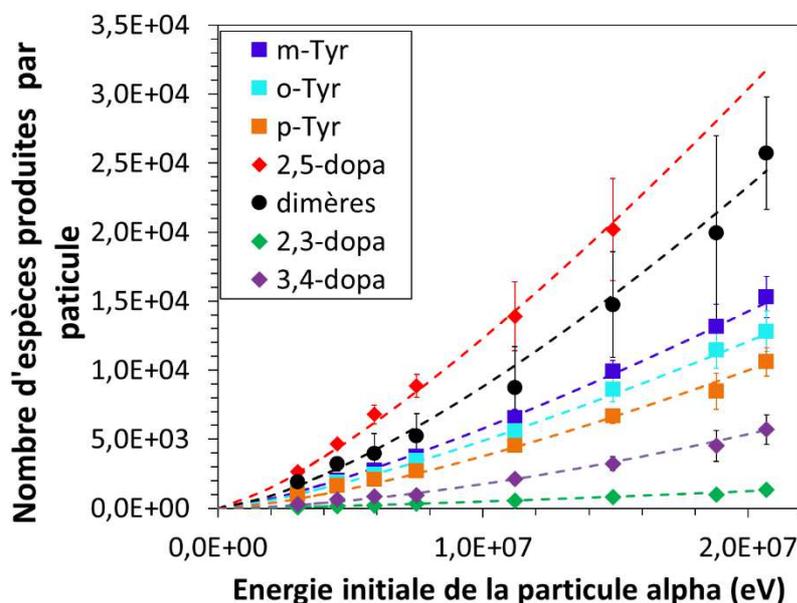


Figure 4-14 : Mesure du nombre d'espèces produites par particule en fonction de l'énergie initiale des particules alpha de basses énergies en milieu oxygéné. Mesures réalisées à la MEXP-Chiba (3 ; 4,5 ; 5,9 ; 7,5 ; 11,2 ; 14,9 ; 18,8 et 20,7 MeV). [Phe] = 2×10^{-3} M, pH= 6,8, tampon phosphate 66mM. Les intervalles de confiance sont estimés à partir de plusieurs mesures pour chaque point.

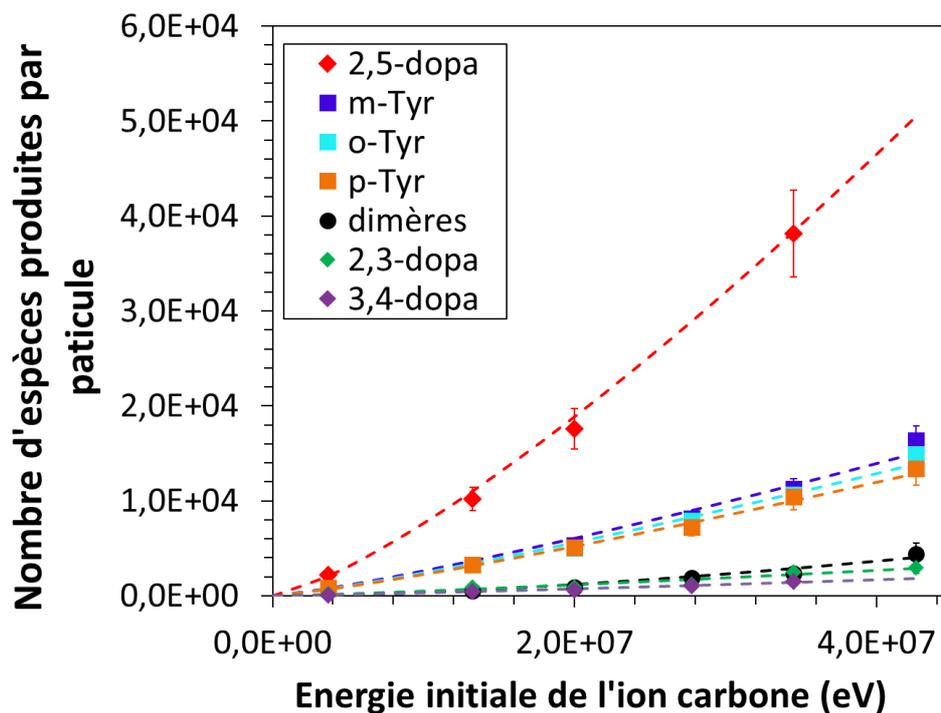


Figure 4-15 : Mesure du nombre d'espèces produites par particule en fonction de l'énergie initiale des ions carbone de basses énergies en milieu oxygéné. Mesures réalisées sur la MEXP-Chiba (3,6 ; 13,2 ; 20,0 ; 27,7 ; 34,5 et 42,6 MeV). $[\text{Phe}] = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pH} = 6.8$, tampon phosphate 66mM. Les intervalles de confiance sont estimés à partir de plusieurs mesures pour chaque point.

3) Rendements différentiels avec ions de basses énergies

Les rendements différentiels dans les expériences précédentes sont calculés comme cela a été expliqué précédemment dans le chapitre 1 (Figure 1-5, Equation 1-6 à 1-9, p28). Les données des figures 4-14, 4-15 et 4-16 sont ajustées à l'aide de courbes de tendance de type ax^b comme pour les rendements de production en HO^\bullet (Tableau 4-5). La dérivation de ces courbes de tendance permet d'estimer les rendements différentiels de chaque espèce pour chaque type d'ion.

Tableau 4-5 : Paramètres de reconstruction des courbes du nombre d'espèces produites par particule en fonction de l'énergie initiale de la particule pour les protons, les particules alpha et les ions carbone (Figure 4-13 ; Figure 4-14 ; Figure 4-15).

	Protons		Particules alpha		Ions carbone	
	a	b	a	b	a	b
3,4-dopa	$4,6 \times 10^{-8}$	1,5	$1,1 \times 10^{-8}$	1,6	$1,3 \times 10^{-6}$	1,2
2,5-dopa	$5,0 \times 10^{-7}$	1,5	$9,8 \times 10^{-6}$	1,3	$6,1 \times 10^{-6}$	1,3
2,3-dopa	$7,0 \times 10^{-14}$	2,4	$4,0 \times 10^{-7}$	1,3	$2,0 \times 10^{-6}$	1,2
p-Tyr	$4,0 \times 10^{-7}$	1,5	$6,0 \times 10^{-7}$	1,4	$9,0 \times 10^{-6}$	1,2
m-Tyr	$5,1 \times 10^{-7}$	1,5	$4,6 \times 10^{-6}$	1,3	$1,1 \times 10^{-5}$	1,2
o-Tyr	$4,5 \times 10^{-7}$	1,5	$3,9 \times 10^{-6}$	1,3	$9,7 \times 10^{-6}$	1,2
dimères	$2,4 \times 10^{-7}$	1,5	$1,4 \times 10^{-6}$	1,4	$2,5 \times 10^{-9}$	1,6

Les rendements différentiels obtenus sont alors comparés dans la Figure 4-16. Les produits d'hydroxylation (ortho, para et méta-tyrosine) décroissent quasi régulièrement avec le TEL. Cette décroissance n'est pas sans rappeler les tendances observées avec la formation du radical hydroxyle. En revanche, la formation de dimères et de 2,5-dopa semble très dépendante du TEL. En effet, leurs proportions par rapport aux tyrosines sont très variables. Pour finir, les espèces minoritaires restent la 2,3-dopa et la 3,4-dopa. Toutefois, il semble que pour les particules alpha, des effets notables soient observés sur les proportions de formation de la 3,4-dopa.

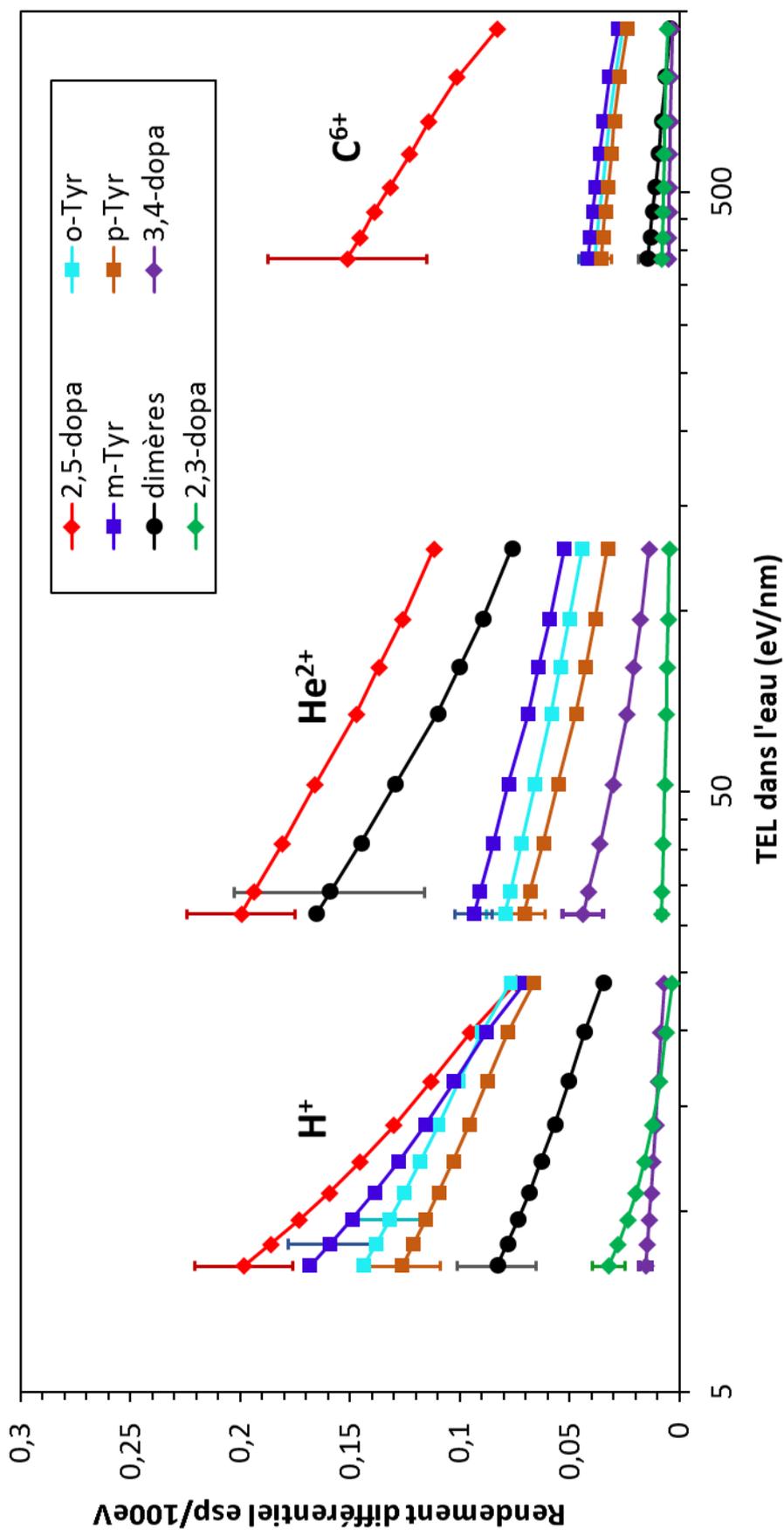


Figure 4-16 : Rendements différentiels de production des espèces de radiolyse de la phénylalanine avec des protons, des particules alpha et des ions carbone de 0,5 à 6 MeV/u en milieu oxygéné. [Phe] = 2×10^{-3} M, pH= 6.8, tampon phosphate 66mM. Les intervalles de confiance sont estimés à partir des courbes d'ajustement et des erreurs sur la mesure en N_{esp} (Figure 4-13, Figure 4-14 Figure 4-15). Ils sont représentatifs pour la même espèce et le même ion.

4) Rendements avec des ions de hautes énergies et gamma

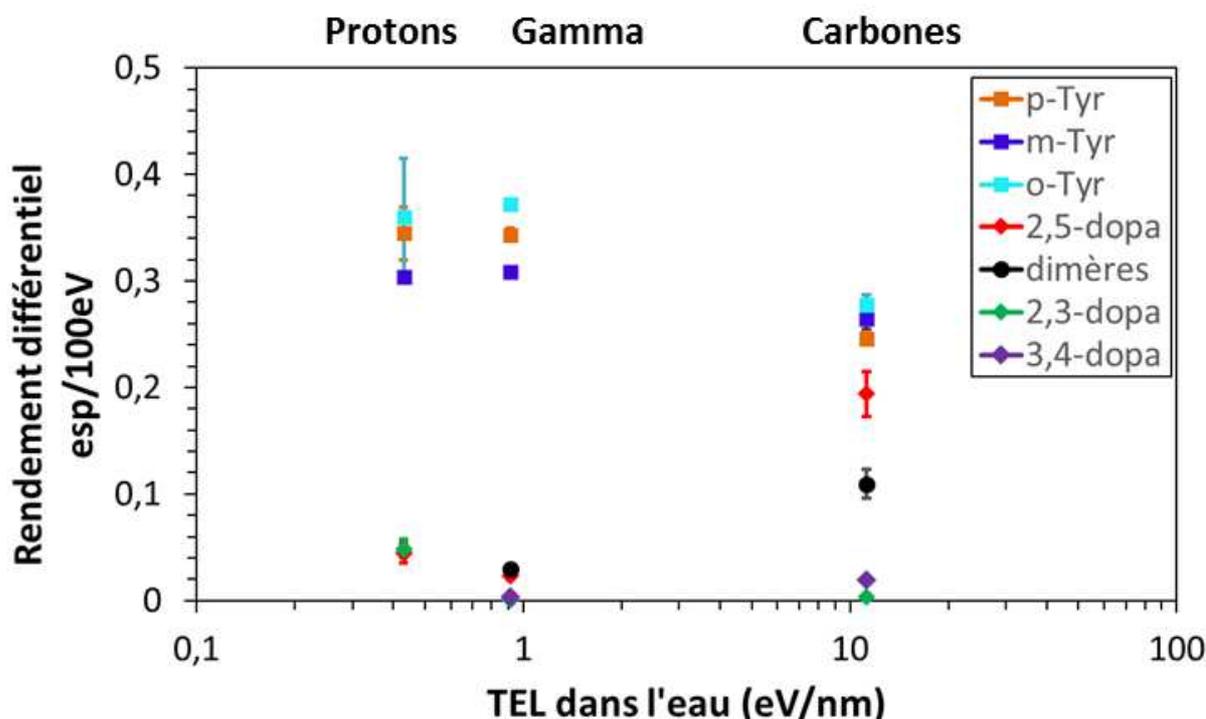


Figure 4-17 : Rendement différentiel de production des espèces de radiolyse de la phénylalanine sous irradiation avec des protons de 210 MeV, des ions carbone de 4,3 GeV et des gamma en milieu oxygéné. [Phe] = 2×10^{-3} M, pH= 6.8, tampon phosphate 66mM. Les intervalles de confiance sont estimés à partir de plusieurs mesures sur chaque point.

Dans le cadre des expériences d'irradiation avec des gamma et avec des ions de hautes énergies (H^+ 210 MeV et C^{6+} de 4,3 GeV), les mesures réalisées sont directement des rendements différentiels (Figure 4-17). On retrouve à nouveau les mêmes espèces produites que lors des expériences avec des ions de faibles énergies. Le rendement de production de dimères et de 3,4-dopa n'a pas pu être mesuré avec les protons car les faibles doses obtenues lors de ces irradiations n'ont pas permis leur détermination. Les tyrosines sont largement majoritaires. La 2,5-dopa et les dimères sont peu représentés avec ces faibles TEL mais deviennent toutefois plus importants lors de la radiolyse avec des ions carbone.

5) Classes de produits de radiolyse

Au vu des mesures présentées dans les parties précédentes, plusieurs classes de produits peuvent être identifiées. Ils seront traités par la suite classe par classe, ces dernières étant les suivantes :

- Les tyrosines, ou produits de simple hydroxylation, sont des produits présents en quantité importante lors des mesures. Ils étaient également les plus attendus au vu de la littérature. Leur production décroît en fonction du TEL à l'image du radical hydroxyle dans les mêmes conditions (chap 3).
- Les dimères semblent présents en quantité très variable en fonction du TEL des particules et deviennent même prépondérants dans le cas de la radiolyse sous particules alpha. Ceci doit être dû à leur mode de formation bi-radicalaire qui peut fortement influencer leur production en fonction de la densité de dépôt d'énergie et donc de la densité en radicaux.
- La 2,5-dopa, un produit quasiment insignifiant en radiolyse gamma, devient prépondérant lors d'irradiation sous ions de basses énergies. A l'image des dimères, le mécanisme de formation doit certainement être de type bi-radicalaire.
- La 3,4-dopa et 2,3-dopa sont les autres produits de double hydroxylation. Elles sont dans la plupart des expériences très minoritaires, ce qui pourrait convenir avec une hydroxylation des tyrosines. Mais des quantités particulièrement importantes en 3,4-dopa ont tout de même été mesurées lors de la radiolyse par des particules alpha.

B. Première hydroxylation : production des tyrosines

1) Mécanismes de formation des tyrosines

Les tyrosines étant les produits les plus décrits dans la littérature à faible ou fort TEL, leurs mécanismes de formation ont été dans un premier temps testés en fonction de ceux décrits dans la littérature. Ainsi, des solutions de phénylalanine ont été irradiées à haute dose sous proton de 2 MeV en faisant varier les conditions chimiques (Figure 4-18). Lors d'irradiation sous air, la production en tyrosines perd sa linéarité après 1000Gy ce qui peut être imputé à une dégradation des tyrosines formées en grande quantité. L'ajout de tertio-butanol, un capteur spécifique du radical HO[•], a été introduit de manière à réagir avec 70% de celui-ci. Dans ce cas, la production en tyrosines mesurée correspond encore à 36% des quantités sous air. Ceci est cohérent avec une première étape de formation des tyrosines qui correspondrait à l'addition du radical hydroxyle sur le cycle aromatique de la phénylalanine pour former un radical intermédiaire hydroxy-cyclohexadiényle (réaction 4-1). De même, l'irradiation de solutions de phénylalanine a été réalisée en milieu désoxygéné sous argon. Sans oxygène, la production en tyrosines est réduite environ de moitié par rapport aux conditions aérées. Ceci est cohérent avec l'existence de deux voies de réaction du radical hydroxy-cyclohexadiényle qui conduisent à la formation de la tyrosine : la voie « oxygène » (réaction 4-6) et la voie radicalaire (réaction 4-11). Dans ce cas, il est difficile d'obtenir des informations quantitatives sur ces voies réactionnelles car les mécanismes de radiolyse sont ici modifiés dû à la présence de l'électron hydraté et de l'atome d'hydrogène qui ne sont plus captés par l'oxygène en solution et qui vont réagir avec la phénylalanine. En effet, leur constante de réaction respective avec la phénylalanine est de $1,2 \times 10^8$

et 7×10^8 L/mol/s (Lichtin and Shafferman, 1974; Mittal and Mittal, 1986). Pour réaliser une étude quantitative, des irradiations sous N_2O pourraient être envisagées.

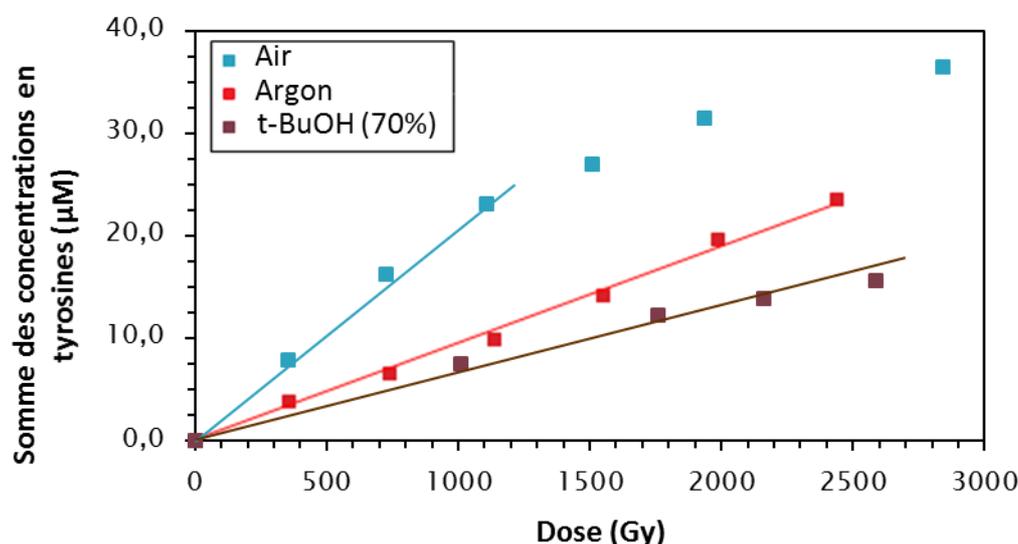


Figure 4-18 : Concentration en tyrosines produites en fonction de la dose et des conditions d'irradiation. Proton de 2MeV, ACACIA. $[Phe] = 2 \times 10^{-3}$ M, pH= 6,8, tampon phosphate 66mM. $[t-BuOH] = 50 \times 10^{-3}$ M.

2) Effets de TEL et parallèle avec le radical hydroxyle

Une claire diminution des rendements de production des tyrosines est observée quand le TEL des rayonnements augmente en allant des rayons gamma jusqu'aux ions carbone de faibles énergies (Figure 4-19 (1)). Cette diminution est fortement corrélée à la diminution des rendements de production du radical hydroxyle à un temps statistique similaire (70ns) après passage du rayonnement ionisant. Quand le TEL augmente, l'énergie est déposée de façon plus dense, les espèces produites par la radiolyse de l'eau sont de plus en plus proches et leurs interactions vont être plus importantes. Ces interactions aboutissent à des recombinaisons radicalaires intra-traces entre les espèces issues de la radiolyse de l'eau et notamment, le radical hydroxyle. Ceci conduit à une diminution de la quantité de radical hydroxyle disponible en solution en fonction du TEL à temps de capture constant. Si moins de radicaux hydroxyles sont disponibles pour réagir avec la phénylalanine, la production en radicaux hydroxy-cyclohexadiényles et donc en tyrosines sera plus faible (réaction 4-1). Il est communément accepté que, pour des TEL inférieurs à environ 1,5 eV/nm, les grappes issues de la radiolyse de l'eau sont suffisamment éloignées les unes des autres pour ne plus interagir entre elles (Yamashita et al., 2011). Ainsi, les rendements en HO^\bullet deviennent quasi-constants en dessous de ce palier. Dans le cas de la production des tyrosines sous gamma, la comparaison avec la littérature des rendements obtenus est cohérente. Les rendements de production plus élevés que ceux mesurés de notre étude peuvent être expliqués en partie par l'utilisation de conditions expérimentales (pH et concentration en phénylalanine)

légèrement différentes. De plus, il est possible que même en l'absence d'effets de TEL pour des valeurs inférieures à 1,5 eV/nm sur la production de radical hydroxyle, des mécanismes à temps plus long comme ceux faisant intervenir le radical hydroxy-cyclohexadiényle peuvent eux être impactés par cette différence de TEL (gamma ^{60}Co : 0,3 eV/nm ; gamma ^{137}Cs : 0,91 eV/nm).

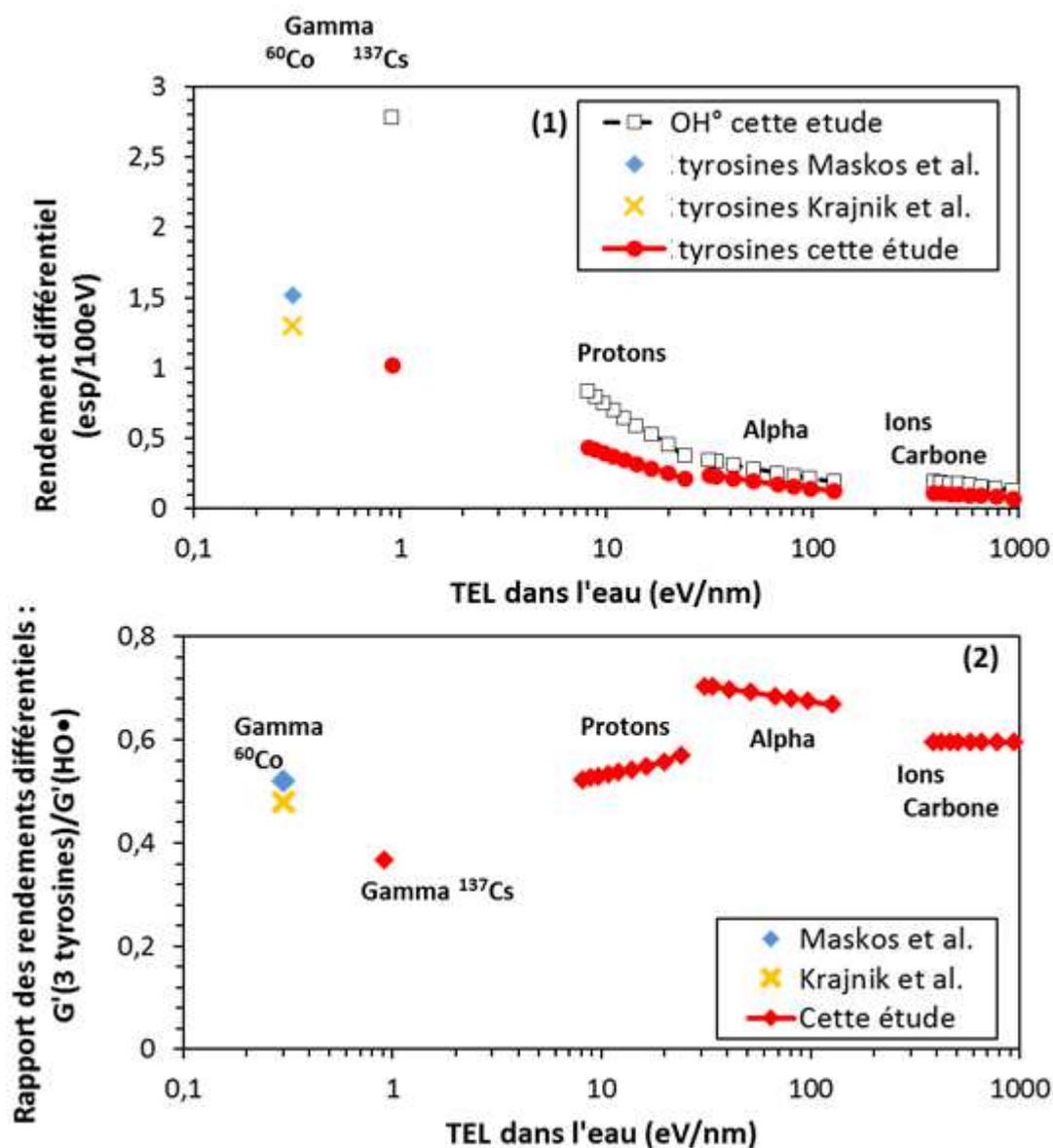


Figure 4-19 : (1) : Comparaison des rendements différentiels de production de la somme des tyrosines avec la littérature et avec les rendements mesurés pour le radical hydroxyle en milieu aéré à un temps similaire de 70ns (chap 3) (2) : Comparaison du taux de conversion de radical hydroxyle en tyrosines avec la littérature en milieu oxygéné. Cette étude : [Phe] = 2×10^{-3} M, pH= 6,8, tampon phosphate 66mM, HO• cf chap 3. Krajnik et al. 1995 : [Phe] = $2,5 \times 10^{-3}$ M. Maskos et al. 1992 : [Phe] = 5×10^{-3} M, pH ~ 6,8.

Dans des conditions proches des nôtres, Maskos décrit une conversion des radicaux hydroxyles en tyrosines de l'ordre de 52%. Krajnik, quant à lui, décrit une conversion de l'ordre de 46 à 50%.

Une conversion de 50% est mesurée lors des expériences avec les protons de hautes énergies qui ont des TEL très proches des gamma de la littérature (Figure 4-19 (2)). Lors de nos expériences gamma, uniquement 37% des HO[•] conduisent à la formation des tyrosines, cette valeur est considérablement plus basse que toutes les autres. Une conversion de 50 à 60% des HO[•] est également observée avec les protons et les ions carbone et de 65 à 70% avec les particules alpha de basses énergies. On semble observer une légère augmentation de cette conversion avec le TEL, mais rappelons que les rendements mesurés avec les particules alpha en radical hydroxyle sont peut-être sous-estimés en raison d'une dose trop importante (chap 3).

3) Effets de charge de la particule

Le TEL est une manière de décrire le rayonnement, mais il ne représente qu'une vision linéaire du dépôt d'énergie suivant une seule dimension. Deux particules peuvent avoir le même TEL mais induire des interactions avec la matière différente. C'est le cas d'un proton de 3,3 MeV et d'un carbone de 4,3 GeV. Leurs TEL sont de l'ordre de 11,3 eV/nm mais les rendements de production en tyrosines mesurés dans nos expériences sont sensiblement différents (Figure 4-20).

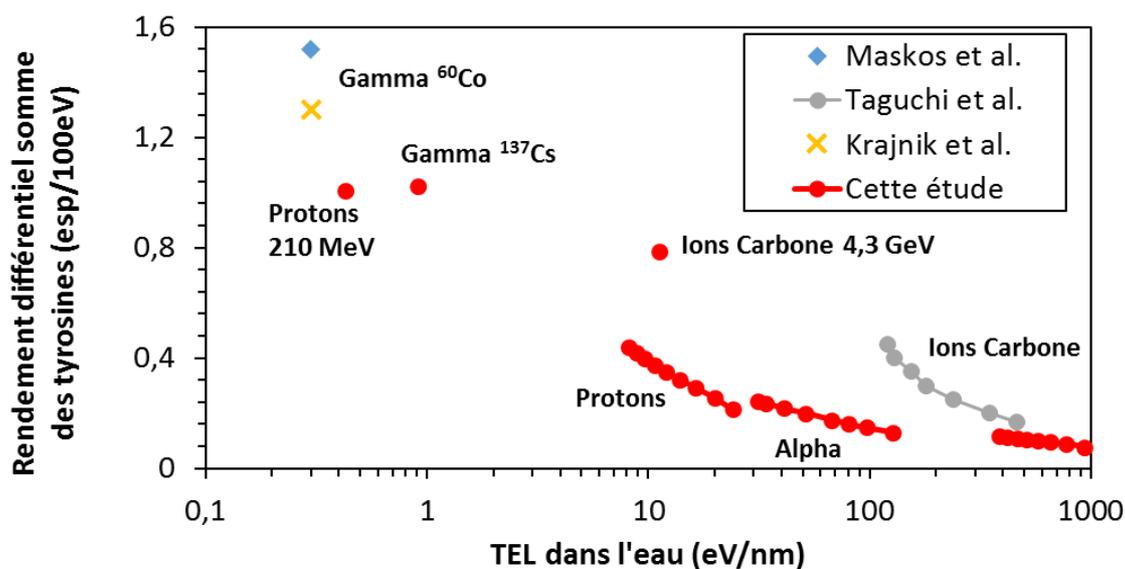


Figure 4-20 : Effets de charge sur les rendements différentiels de production des tyrosines. Comparaison du taux de conversion de radical hydroxyle en tyrosines avec la littérature. Cette étude : [Phe] = 2x10⁻³ M, pH= 6.8, tampon phosphate 66mM, milieu oxygéné. Krajnik et al. 1995 : [Phe] = 2,5x10⁻³ M, milieu oxygéné. Maskos et al. 1992 : [Phe] = 5x10⁻³ M, pH ~ 6.8, milieu oxygéné. Tagushi et al. 2001 : [Phe] = 13x10⁻³ M, pH ~ 5.7, milieu désoxygéné.

Ce phénomène est fortement corrélé à la production en radical hydroxyle supérieure pour des particules plus chargées. Des électrons secondaires énergétiques sont produits et engendrent des traces secondaires d'autant plus importantes que leur énergie est élevée. Ces électrons secondaires vont engendrer à leur tour des radicaux hydroxyles. Ces résultats sont également en très bon

accord avec les mesures réalisées par Taguchi et al. sous faisceau d'ions carbone. Dans leur étude, les mesures ont été réalisées en milieu désoxygéné avec de la phénylalanine plus concentrée. Toutefois, dans sa discussion, Taguchi avance que la production de dioxygène intra-trace lors de ses mesures conduit à des valeurs équivalentes à celles attendues en milieu oxygéné. De même, un effet de charge de la particule très marqué avec l'utilisation de faisceaux d'argon ou de néon avait été observé. (Figure 4-20 & Figure 4-3).

C. Production de dimères

La proportion de formation des dimères varie fortement avec le TEL (Figure 4-16). Cependant, toutes les espèces de radiolyse produites dépendent également de la production du radical hydroxyle. Ainsi, pour s'affranchir de ce premier effet de TEL, la production de dimères a été normalisée par la production de HO• (Figure 4-21).

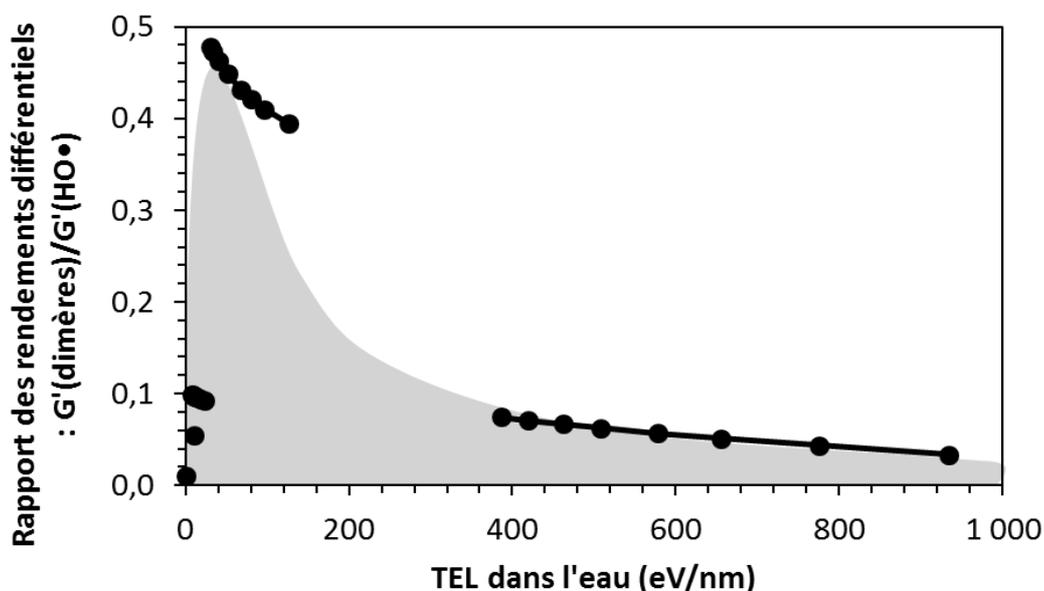


Figure 4-21 : Proportions de formation des dimères normalisés par la formation du radical hydroxyle en fonction du TEL, en milieu oxygéné. [Phe] = 2×10^{-3} M, pH= 6,8, tampon phosphate 66mM.

De cette manière, il apparaît qu'un optimum de formation des dimères se situe à des TEL intermédiaires correspondant aux particules alpha. A faible TEL, l'énergie est déposée de façon très diffuse, les radicaux hydroxyles produits autour de la trace sont très éloignés les uns des autres, ce qui conduira après réaction avec la phénylalanine à une production de radicaux hydroxy-cyclohexadiényles très dispersés en solution. A fort TEL, les radicaux sont produits de façon très dense, ainsi de nombreuses recombinaisons radicalaires auront lieu dans la trace. Il en résulte qu'à 70ns, les HO• survivants sont en faible quantité et dispersés en solution. Les radicaux hydroxy-cyclohexadiényles alors produits seront à nouveau espacés, ce qui engendrera une faible

production de dimères. Ainsi, l'optimum de formation de dimères à des TEL intermédiaires pourrait refléter une distance optimale pour les réactions inter hydroxy-cyclohexadiényles en milieu aéré.

D. Formation de la 2,5-dopa

1) Surproduction de 2,5-dopa et effet de TEL

La formation de 2,5-dopa n'avait jamais été décrite dans la littérature à faible TEL. Dans notre étude, elle est l'un des produits majoritaires formés lors de la radiolyse sous faisceau d'ions à fort TEL (Figure 4-16) et faiblement formée à faible TEL. Il semble que sa production trouve un maximum pour des TEL de 300 à 400 eV/nm pour ensuite décroître régulièrement. Cette tendance indiquerait un mécanisme de formation de type bi-radicalaire pour la formation de cette espèce comme pour les dimères. D'autant plus que de telles quantités de cette espèce ne sont pas compatibles avec la voie de formation la plus attendue des dopa à faible TEL qui correspond à une seconde hydroxylation des tyrosines déjà formées. On note également la spécificité de la formation de cette dihydroxyphénylalanine particulière. En effet, la 2,3-dopa et la 3,4-dopa restent des produits très minoritaires (Figure 4-16).

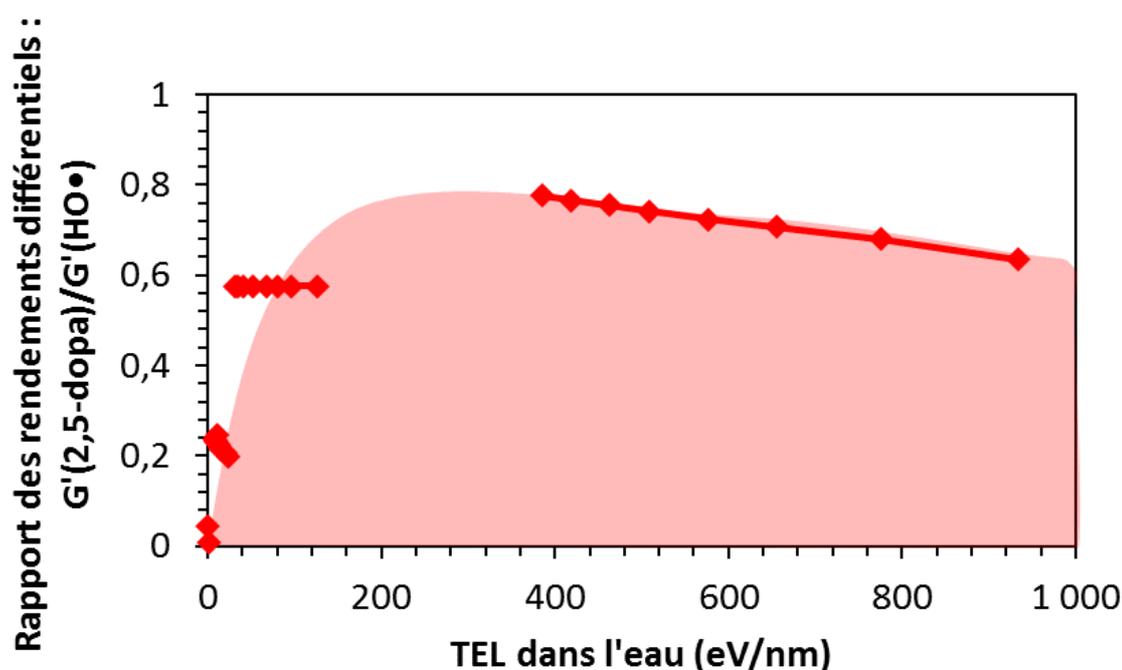
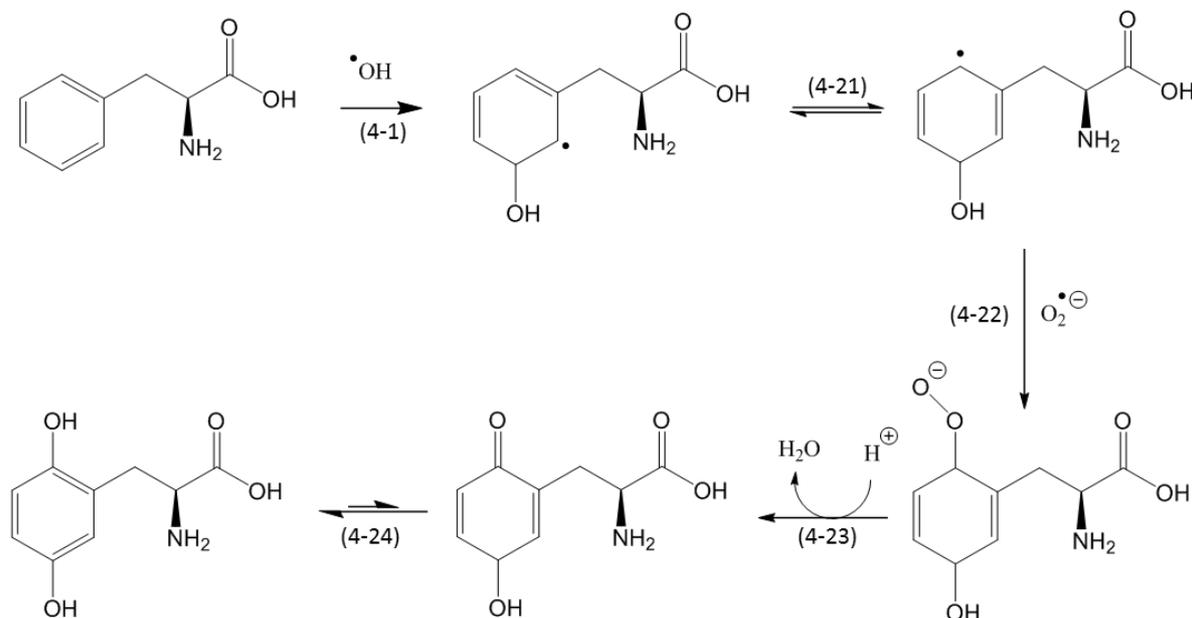


Figure 4-22 : Proportions de formation de la 2,5-dopa normalisées par la formation du radical hydroxyle en fonction du TEL, en milieu oxygéné. [Phe] = 2×10^{-3} M, pH= 6.8, tampon phosphate 66mM.

2) Mécanisme de formation de la 2,5-dopa

Pour arriver à la formation de la 2,5-dopa par un mécanisme de type bi-radicalaire, il est nécessaire d'avoir un deuxième radical oxygéné qui réagirait avec le radical hydroxy-cyclohexadiényle. A part le radical hydroxyle, le seul autre radical oxygéné présent en solution est le superoxyde issu de la réaction de l'électron hydraté ou de l'atome d'hydrogène avec le dioxygène. Ce radical est peu réactif aux espèces non radicalaires présentes en solution comme la phénylalanine ce qui expliquerait la spécificité d'une réaction bi-radicalaire l'impliquant.

Ainsi, pour remplir tous les critères spécifiques à la formation de la 2,5-dopa, un mécanisme bi-radicalaire impliquant le radical superoxyde a été proposé suivant les équations 4-21 à 4-24. La première étape de ce mécanisme résulte de la formation du radical hydroxy-cyclohexadiényle après addition du radical hydroxyle en position ortho ou méta (réaction 4-1). Suite à la délocalisation de la charge, le radical $O_2^{\bullet-}$ peut s'additionner sur le cycle par une réaction inter-radicalaire, selon l'équation 4-21 et 4-22. Cette addition après délocalisation peut être plus favorisée pour des raisons de gêne stérique. Après la réaction 4-23, un intermédiaire réactionnel de type peroxyde est formé. Ensuite, par élimination d'eau et équilibre tautomérique, la 2,5-dopa est formée (réactions 4-23 et 4-24). Dans le cas d'addition initiale en position ortho ou méta, cette réaction conduit à la formation de 2,5-dopa. En revanche, en position para, le radical délocalisé se situe en position ipso ce qui ne permet pas d'aboutir à une deuxième hydroxylation du cycle aromatique suivant ce mécanisme. Ceci est en accord avec une formation privilégiée de 2,5-dopa.



Équation 4-1, 4-21 à 4-24 : Mécanisme de formation proposé pour la formation de la 2,5-dopa en condition aérée. C'est la seule dopa pouvant être formée par un tel mécanisme.

L'idée de ce mécanisme s'appuie sur la mise en évidence de l'espèce peroxyde produite par la réaction 4-22 par spectroscopie de masse dans un temps court après irradiation (Figure 4-23). Cette espèce serait une espèce intermédiaire à temps de vie de plusieurs heures ce qui permet sa visualisation en HPLC-MS et expliquerait également la formation à temps long de la 2,5-dopa (Figure 4-12).

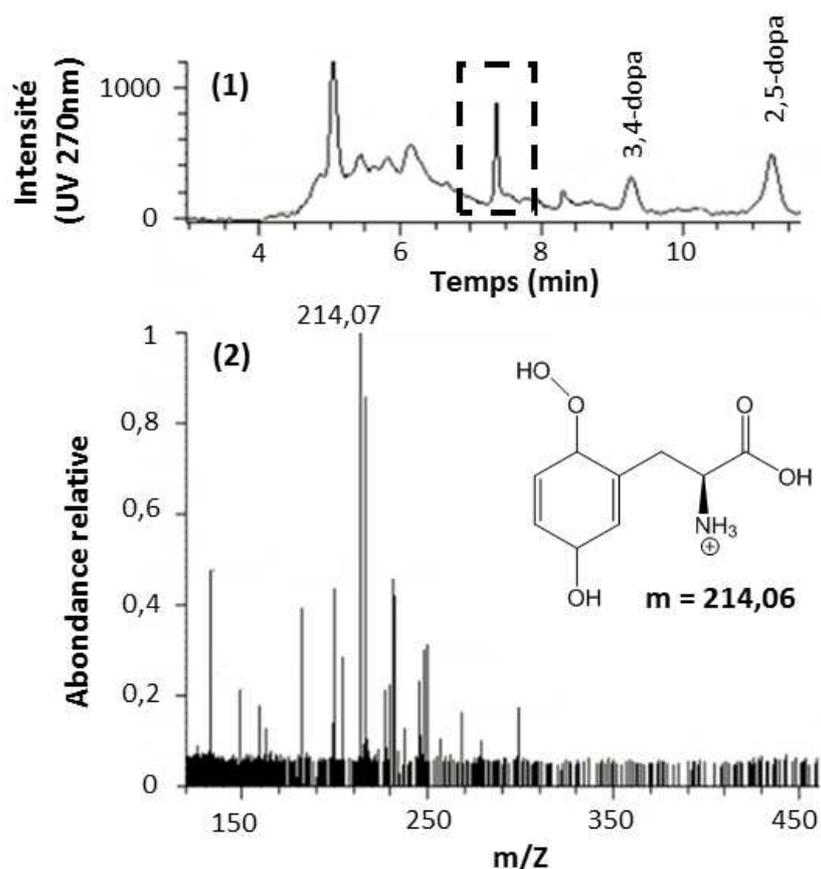


Figure 4-23 : Analyse HPLC-UV-MS d'un échantillon fraîchement irradié par des protons de 2 MeV. (1) : Chromatogramme UV à 270nm. Les bandes à temps courts sortent avec le front de solvant. (2) : Spectre de masse relatif à la bande à 7,4min du chromatogramme (1).

Pour tester le mécanisme de formation proposé, des expériences complémentaires furent réalisées (Figure 4-24). Dans un premier temps, l'influence de l'eau oxygénée a été testée. En effet, ce produit aurait pu être responsable d'un effet de TEL et également de la formation à temps long de la 2,5-dopa. Aucune augmentation de la production de 2,5-dopa n'a été notée lors de son ajout hors, pendant ou après irradiation à l'image de l'expérience (B) (Figure 4-24). De la même manière, l'ajout de catalase, une enzyme capable de catalyser la dismutation de H₂O₂ n'a également eu aucun effet notable sur les quantités de 2,5-dopa formées. Ainsi, tous ces résultats permettent d'éliminer l'eau oxygénée des sources potentielles de formation de cette espèce.

Le ferricyanure permet de convertir de manière quantitative les radicaux hydroxycyclohexadiényles en tyrosines en solution sous irradiation (réaction 4-18). Son ajout en solution lors d'irradiations devrait nous informer sur la participation de ce radical sur le mécanisme de formation de la 2,5-dopa. En effet, lors de l'expérience (C) (Figure 4-24), la formation de la 2,5-dopa n'est plus observée. Ceci confirme l'implication de ce radical dans le mécanisme de formation de la 2,5-dopa.

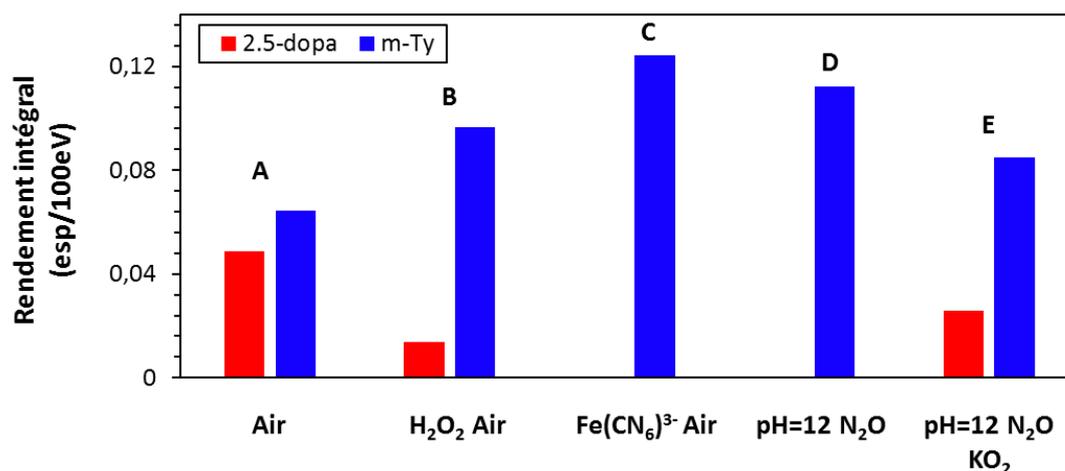


Figure 4-24: Rendement de formation de la méta-tyrosine et de la 2,5-dopa en fonction des conditions chimiques d'irradiation. H^+ 2MeV, $[Phe] = 2 \times 10^{-3}$ M. A : Milieu oxygéné, pH= 6.8 dans tampon phosphate 66mM. B : Milieu oxygéné, $[H_2O_2] = 200 \mu M$. C : Milieu oxygéné, $[Fe(CN_6)^{3-}] = 300 \mu M$. D : Milieu N_2O à pH 12, solution de soude, E : Milieu N_2O à pH 12, solution de soude et $[KO_2]: 500 \mu M$.

Pour tester l'implication du superoxyde, les irradiations ont également été menées en milieu désoxygéné, sous N_2O . La 2,5-dopa n'est alors plus observée dans ces conditions (D). Ce constat est cohérent avec une réaction faisant intervenir le radical O_2^{\bullet} produit par la réaction du dioxygène avec l'électron hydraté ou l'atome d'hydrogène. Les expériences de radiolyse ont été également réalisées à pH=12 afin de pouvoir introduire O_2^{\bullet} en solution par l'ajout de KO_2 . Dans ces conditions, ce radical a un temps de demi-vie de l'ordre de 6min, ce qui permet l'irradiation de la solution directement après ajout de KO_2 solide (Bielski and Arudi, 1983). Lors de l'introduction de O_2^{\bullet} en solution, la production de 2,5-dopa est à nouveau observée. Ce dernier constat confirme le mécanisme bi-radicalaire de formation de la 2,5-dopa impliquant O_2^{\bullet} .

3) Vers une dépendance au débit de dose

La 2,5-dopa semble donc spécifique aux rayonnements à fort TEL en raison de son mécanisme de formation bi-radicalaire. Toutefois, l'implication du radical superoxyde dans la formation de la 2,5-dopa peut entraîner la dépendance à un autre paramètre : le débit de dose. En effet, jusqu'à

présent, les additions radicalaires considérées ont été de type intra-trace, mais le temps de vie du radical $O_2^{\bullet-}$ de l'ordre de la milliseconde permet des réactions de type inter-trace, contrôlées par le débit de dose. Dans nos expériences, ce dernier est calculé en multipliant le flux d'ions à la milliseconde (ions/cm²/ms) par le TEL des particules pour donner une grandeur homogène à un débit de dose (eV/cm³/ms). En effet, en choisissant un temps de l'ordre de la milliseconde pour représenter nos données, on peut alors sonder ces mécanismes de type inter-trace faisant intervenir le radical superoxyde ayant un temps de vie de l'ordre de 2 ms dans nos conditions expérimentales (Bielski and Arudi, 1983). La Figure 4-25 présente les rendements de production de la 2,5-dopa, normalisés par rapport à la production de HO \bullet , en fonction du débit de dose et des différents rayonnements utilisés dans cette étude. Il n'a pas été possible de calculer les rendements différentiels dans le cadre des expériences complémentaires en fonction du débit de dose en raison du faible nombre d'irradiations. Les valeurs présentées correspondent aux rapports des rendements intégraux. Dans ce cas, un TEL moyen est considéré sur le parcours des ions dans l'eau pour le calcul du débit de dose. A titre comparatif, le même traitement est effectué sur la production de méta-tyrosine. (Figure 4-25)

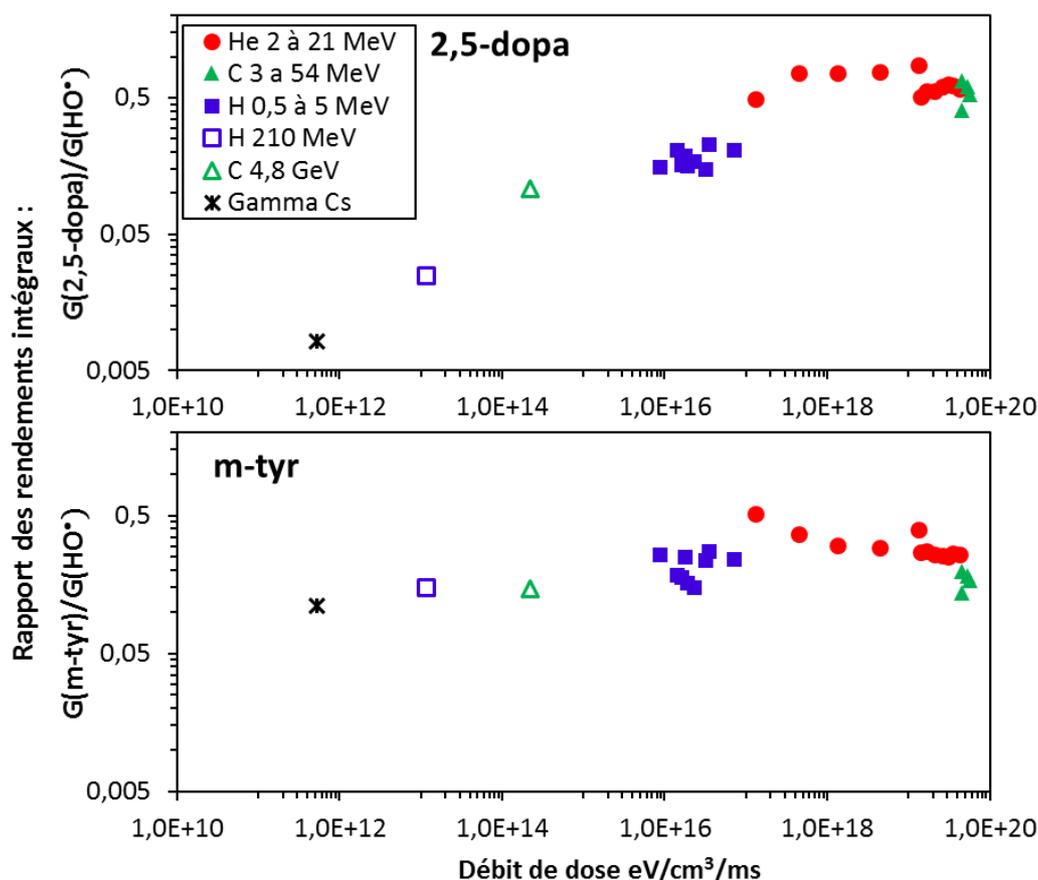


Figure 4-25 : Effet de débit de dose sur la production de la 2,5-dihydroxyphénylalanine (au-dessus) et de la m-tyrosine (au-dessous) normalisée par la production de radical hydroxyle.

[Phe] = 2×10^{-3} M, milieu oxygéné, pH= 6.8 dans tampon phosphate 66mM.

Ainsi, il est possible d'observer la forte dépendance de la 2,5-dopa en fonction du débit de dose. Cette dépendance est bien spécifique car elle n'est pas du tout observée dans le cas de la m-tyrosine. La 2,5-dopa semble croître très régulièrement jusqu'à un débit de dose limite où un plateau est observé. Ce plateau pourrait correspondre à la saturation en radical superoxyde par rapport aux radicaux hydro-cyclohexadiényles disponibles pour la formation en 2,5-dopa. Ce constat est une confirmation supplémentaire de l'implication du radical superoxyde dans ce mécanisme de formation.

E. Mécanismes de seconde hydroxylation

Dans la littérature, des mécanismes de seconde hydroxylation résultant d'une seconde attaque de radical hydroxyle étaient attendus et ont été observés lors d'irradiations gamma à haute dose (Equation 4-9 & 4-10). Dans les irradiations menées sous faisceau d'ions, il semble que la 2,3-dopa et 3,4-dopa suivent des formations de ce type. Dans la plupart des cas, ces produits sont formés en quantités significativement plus faibles que les tyrosines ce qui est cohérent avec une seconde hydroxylation (Figure 4-16 & Figure 4-17). Cependant, lors des irradiations sous particules alpha, la 3,4-dopa est produite en quantité plus importante ce qui ne peut résulter d'une simple sur-irradiation ou seconde hydroxylation. Etant donné que les irradiations réalisées sous alpha font partie de celles ayant les débits de dose les plus élevés, de l'ordre de 10^{19} à 10^{20} eV/cm³/ms, on peut alors imaginer qu'un mécanisme similaire à celui de la 2,5-dopa puisse être faiblement représenté. Ceci serait causé par l'addition initiale du radical hydroxyle en position para ou en position méta de la phénylalanine. Le radical hydroxy-cyclohexadiényle produit réagirait alors sans délocalisation du radical, ses plus faibles proportions s'expliquant par la gêne stérique pour l'addition du deuxième radical.

Des études complémentaires pourraient être réalisées pour confirmer cette hypothèse mais ceci nécessite d'utiliser des débits de dose encore plus forts. Il est étonnant de ne pas retrouver cette même tendance pour la 2,3-dopa.

F. Bilan des réactions de la phénylalanine avec le radical hydroxyle

A ce stade, tous les mécanismes de formation des espèces identifiées de la radiolyse de la phénylalanine ont été élucidés. La formation de toutes ces espèces passe par une première addition du radical hydroxyle sur le cycle aromatique qui conduit au dérivé hydroxy-cyclohexadiényle. A partir de ce radical, les tyrosines sont formées principalement par réaction avec l'oxygène et la 2,5-dopa par addition du radical superoxyde. La rencontre de deux dérivés hydro-cyclohexadiényles et élimination d'eau conduit à la formation de dimères et la 3,4-dopa et la 2,3-dopa sont formées par une seconde addition du radical hydroxyle sur la tyrosine. A partir de ces mécanismes, il est possible de réaliser un bilan des attaques du radical hydroxyle sur la

phénylalanine en considérant qu'il faut un radical pour former une tyrosine, un radical pour former une 2,5-dopa et deux radicaux pour former des dimères ou les 2,3 et 3,4-dopa (Equation 4-25). Il est alors intéressant de comparer ce bilan aux rendements en HO• mesurés dans le chapitre 3 au temps de capture 70ns (Figure 4-26).

Bilan des attaques HO• =

$$G'_{m-tyr} + G'_{o-tyr} + G'_{p-tyr} + G'_{2,5-dopa} + 2 \times G'_{dimères} + 2 \times G'_{2,3-dopa} + 2 \times G'_{3,4-dopa} \quad (4-25)$$

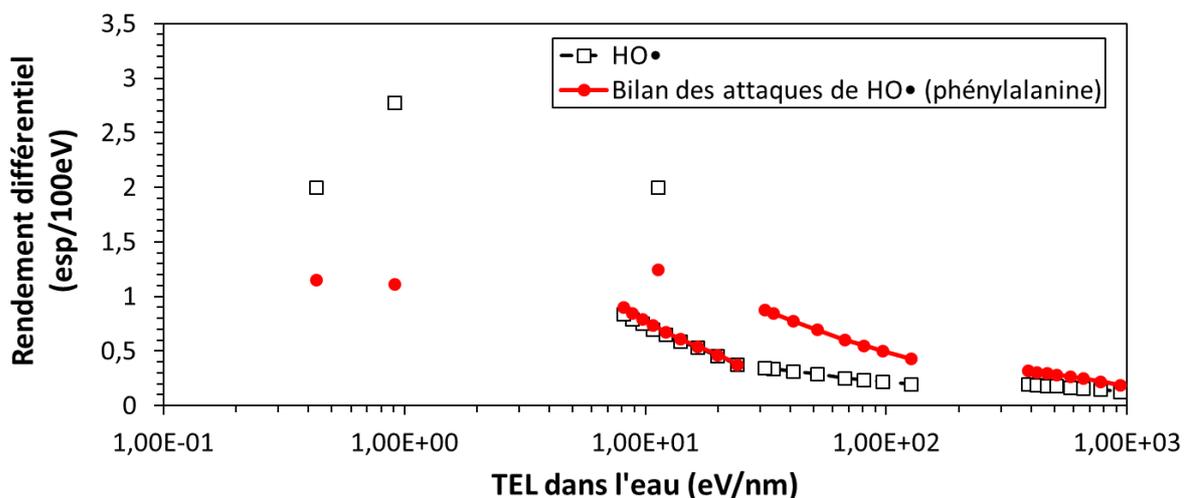


Figure 4-26 : Comparaison de la production du radical hydroxyle et des attaques de ce dernier sur la phénylalanine à un temps statistique de 70ns. [Phe] = 2×10^{-3} M, milieu oxygéné, pH= 6,8 dans tampon phosphate 66mM.

Dans le cas des irradiations par des rayons gamma et des ions de hautes énergies, davantage de HO• sont produits que d'espèces de radiolyse de la phénylalanine. Dans le cas des ions de basses énergies, la totalité des radicaux hydroxyles créés sont convertis en produits de radiolyse pour les protons et les ions carbone. Sur les mesures avec les particules alpha, les données sont en fort désaccord, près de deux fois plus de produits de radiolyse seraient produits par rapport à la quantité de radical hydroxyle disponible.

Ces résultats, à l'exception de ceux obtenus avec les particules, iraient dans le sens d'une forte influence du débit de dose. En effet, les mesures avec les ions de faibles énergies ont été réalisées à plus fort débit de dose (Figure 4-25) et une forte production de 2,5-dopa a été observée. Ceci semble indiquer qu'une partie des radicaux hydroxy-cyclohexadiényles produits à faible débit de dose dans les expériences menées avec des particules de faibles TEL (gamma, ions de hautes énergies) n'aboutiraient pas à la formation de l'un des produits de radiolyse de la phénylalanine détectés. En revanche, à fort débit de dose, ces radicaux hydroxy-cyclohexadiényles seraient convertis efficacement en 2,5-dopa, par réaction avec le radical superoxyde présent en grande quantité.

Le cas des particules alpha est très étonnant. Il est bien-sûr impossible d'avoir plus d'attaques du radical hydroxyle que de radical hydroxyde lui-même. Comme indiqué dans le chapitre 3 (p. 108), les mesures de rendement du radical hydroxyle sous irradiation par des particules alpha ont été réalisées à des doses importantes de plusieurs centaines de Gray. Ceci a probablement conduit à leur sous-estimation, ce qui devra être confirmé par des expériences complémentaires. Cependant, ceci semble insuffisant pour expliquer le facteur deux observé entre les produits de radiolyse et les quantités de radical hydroxyle.

IV. Conclusion

Une étude la plus exhaustive possible de la formation des produits de radiolyse de la phénylalanine sous irradiation par des ions a été menée. Les particules utilisées ont des TEL compris entre 0,4 et 1000 eV/nm et consistent en des ions de basses énergies (protons, particules alpha, et ions carbone), de hautes énergies (protons et ions carbone) ainsi que des rayons gamma. La production des trois isomères de la tyrosine, des 2,5-dopa, 2,4-dopa et 3,5-dopa et de dimères a été observée. Tous ces produits ont été quantifiés et leurs mécanismes de formation ont été confirmés, ou élucidés pour la 2,5-dopa, à partir des mesures réalisées. La production des tyrosines était décrite dans la littérature à faible TEL et a montré une forte dépendance à la quantité de HO• formé en solution sur toute la gamme étudiée.

Cette étude a permis de mettre en évidence pour la première fois une très forte production de dimères et de 2,5-dopa à moyen et fort TEL, qui s'expliquerait par leur mécanisme de formation impliquant la rencontre de deux radicaux, contrairement aux tyrosines, pour lesquelles un radical HO₂• est éliminé. Il semble également que la formation de 2,5-dopa, dont le mécanisme de réaction avec le radical superoxyde a été proposé, soit sensible au débit de dose. La production de 2,3-dopa et de 3,4-dopa a également été quantifiée et semble résulter principalement de l'hydroxylation des tyrosines formées, donc via un mécanisme tout à fait différent de celui de la 2,5-dopa. Les mécanismes à l'œuvre sur ce système et la spécificité aux ions sont résumés dans la Figure 4-27.

En conclusion, sur un système relativement simple et bien connu sous radiolyse à faible TEL comme la phénylalanine, il a été possible de mettre en évidence des mécanismes spécifiques aux ions qui deviennent prépondérants à fort TEL. Ces nouveaux mécanismes sont liés à la densité des radicaux créés au cours de la radiolyse de l'eau. Dans le cas de réactions faisant intervenir des radicaux à temps de vie long, le débit de dose semble également avoir un rôle prépondérant. L'apparition de certains de ces mécanismes à fort TEL et fort débit de dose rejoint l'existence de nouveaux phénomènes biologiques lors de l'irradiation du vivant par des ions. En effet, dans le cadre de l'hadronthérapie, les faisceaux utilisés se caractérisent par des plus forts TEL et des plus forts débits de dose qu'en radiothérapie classique.

V. Vers une généralisation aux acides aminés aromatiques : le tryptophane

Des expériences préliminaires d'irradiation de tryptophane ont été menées dans les mêmes conditions que celles de la phénylalanine (temps de capture similaire, pH = 6.8 mM, H⁺ 2MeV). Le mode opératoire des irradiations et des analyses est très proche de celui de la phénylalanine. En tenant compte de la constante de vitesse du tryptophane avec le radical hydroxyle, la concentration de celui-ci a été fixée à 1 mM, afin d'aboutir à un temps de capture de l'ordre de 70 ns, comme pour la phénylalanine.

Dans un premier temps, le but a été d'identifier tous les produits de radiolyse du tryptophane sous irradiation par des protons. On retrouve des produits de radiolyse analogues à ceux de la phénylalanine. Ainsi, plusieurs hydroxytryptophanes ont été détectés et comportent leur groupement hydroxyle en position 2, 4, 5, 6 ou 7 (Figure 4-28 & Figure 4-29). On note également la présence en grande quantité de dimères et d'un produit de double hydroxylation ((OH)₂-Trp), également en quantité importante, peu compatible avec une « sur-hydroxylation » du tryptophane. De même que dans le cas de la phénylalanine, la nature de la liaison Trp-Trp n'a pas pu être déterminée, mais les dimères sont les espèces majoritaires mesurées. Les positions d'hydroxylation de (OH)₂-Trp n'ont pas pu être déterminées à l'heure actuelle. Etant donné les quantités importantes mesurées, il est probable que sa formation puisse s'expliquer par un mécanisme similaire à celui déterminé pour la 2,5-dopa.

D'autres produits spécifiques au tryptophane ont été mis en évidence, issus de l'ouverture de sa fonction indole : la kynurénine et la N-formyl-kynurénine (NFK)(Figure 4-29). La kynurénine dérive probablement de l'hydrolyse de la NFK, laquelle se forme par rupture oxydante du cycle pyrrole. Le dernier produit observé est le Peak C qui correspond à la formation d'un deuxième hétérocycle après addition d'un radical hydroxyle en position 3 sur le tryptophane.

Bien que très préliminaire, cette étude montre de fortes similarités avec les résultats obtenus dans la radiolyse de la phénylalanine. Les produits dont la formation est très dépendante du TEL dans le cas de la phénylalanine, à savoir les dimères et la 2,5-dopa, ont leurs équivalents dans la radiolyse du tryptophane. Ces premiers travaux seront développés, afin de déterminer les rendements de production des différentes espèces en fonction du type de rayonnement et de leur énergie.

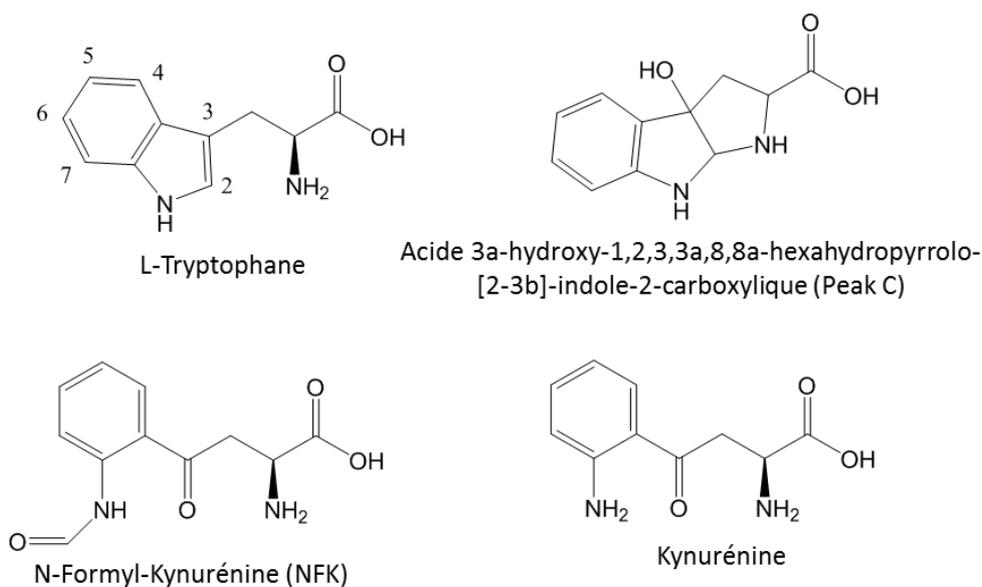


Figure 4-28 : Structure d'espèces identifiées comme produits de radiolyse du tryptophane.

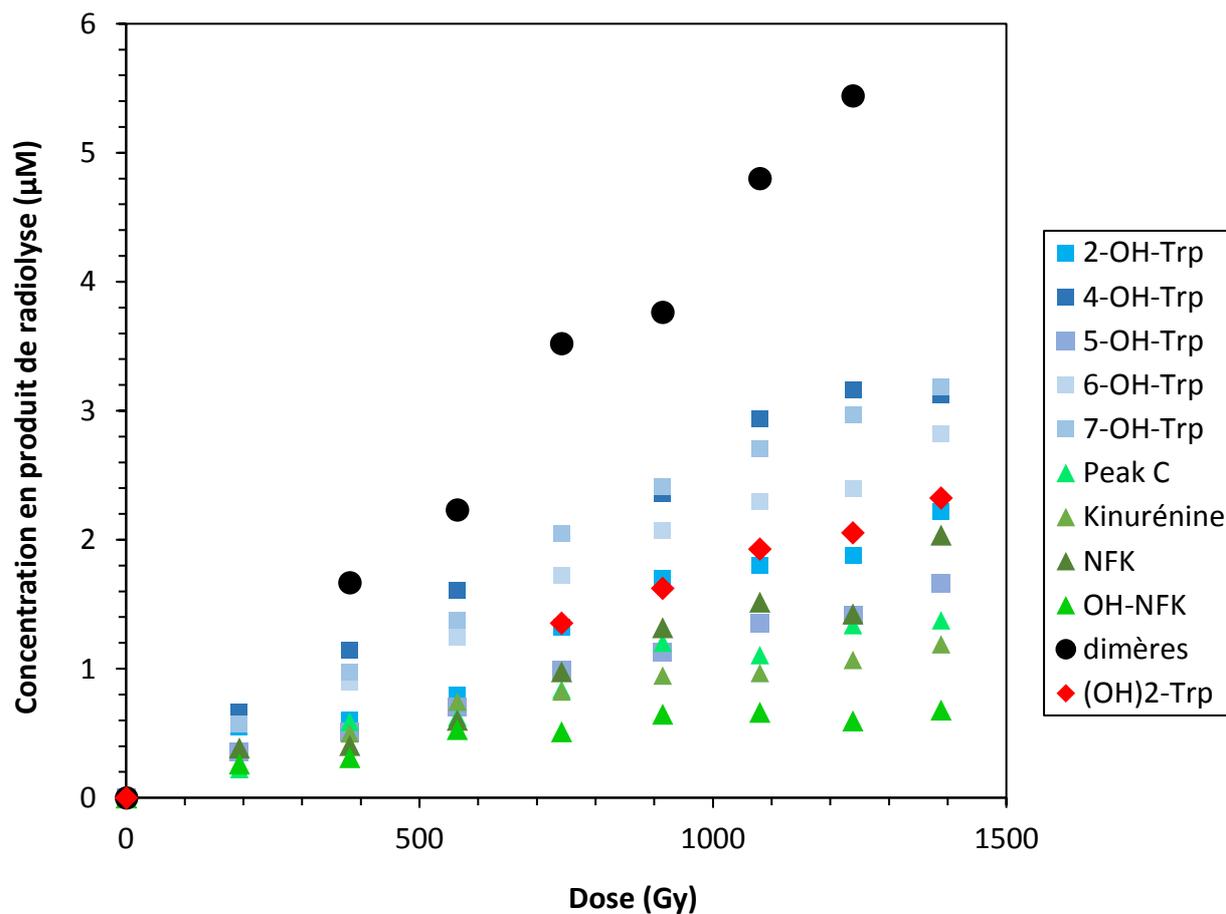


Figure 4-29 : Production des espèces de radiolyse du tryptophane en fonction de la dose, H⁺ 2MeV.

Chapitre 5: Effets directs et effets indirects sur la radiolyse des protéines : la myoglobine

I. La myoglobine : structure et propriétés

A. Choix de la myoglobine comme cible

La myoglobine est une protéine présente dans les muscles des vertébrés et, en particulier, chez les mammifères. Elle est de relativement petite taille et comporte environ 150 acides aminés en fonction de ses différentes formes chez les vertébrés. Sa structure secondaire est formée principalement d'hélices alpha et elle comporte un centre actif contenant un ion fer : l'hème. Comme son homologue l'hémoglobine, elle est impliquée dans le cycle de l'oxygène. Elle stocke ce dernier directement dans les muscles pour obtenir une source rapide d'oxygène en cas d'effort. Ainsi, à forte teneur, elle favorise l'apnée (Garry and Mammen, 2007). C'est cette protéine qui est à l'origine de la couleur rouge de la viande, via son hème.

En raison de ses caractéristiques, la myoglobine est l'une des protéines les plus étudiées en biologie et biochimie. C'est notamment la première protéine dont la structure tridimensionnelle a été élucidée par cristallographie aux rayons X par John Kendrew en 1958, ce qui lui valut de partager le prix Nobel de chimie de 1962. (Kendrew et al., 1958).

Dans notre étude, un système simple, bien connu et accessible dans des quantités importantes est essentiel pour déterminer l'effet des ions accélérés sur la radiolyse. Ainsi, la myoglobine s'est révélée être une cible de choix. En effet, cette protéine a été sélectionnée pour les raisons suivantes :

- Sa faible taille (17,5 kDa) va permettre une étude des mécanismes de dégradation chimique, notamment par spectroscopie de masse.
- Sa structure bien définie, principalement constituée d'hélices alpha, peut être considérée comme une structure modèle.
- Son centre actif, l'hème, définit son activité. On peut attendre une forte influence de l'hème sur la radiolyse de la protéine. Ce constat, associé à la possibilité d'enlever l'hème pour obtenir de l'apomyoglobine, rend l'étude de cette protéine d'autant plus intéressante.
- Sa radiolyse est décrite dans la littérature sous rayonnement à faible TEL.
- Les études envisagées, notamment en milieu concentré, nécessitent une protéine disponible en grande quantité (>mg) et donc à un prix raisonnable ce qui est le cas de la myoglobine.

Ainsi, la myoglobine de cœur de cheval (code PDB : 1WLA) a été utilisée comme cible pour cette étude.

B. De la structure primaire à la structure tertiaire

La myoglobine de cœur de cheval est constituée de 153 acides aminés dont la séquence est décrite dans la Figure 5-1. Par cristallographie, Maurus et al. ont déterminé en 1997 la présence de 8 hélices alpha qui sont identifiées de A à H en partant de l'origine de séquence (Figure 5-1 & Figure 5-2), les hélices C et D sont de petite taille. Mises en commun, elles représentent 73% de la structure, le reste correspondant à des structures de transition : structures courbées de type β ou coudées ou à des sections désorganisées. Les hélices s'organisent autour du site actif de la protéine contenant l'hème. Cette structure bien définie va lui conférer une réactivité et une activité bien particulière.

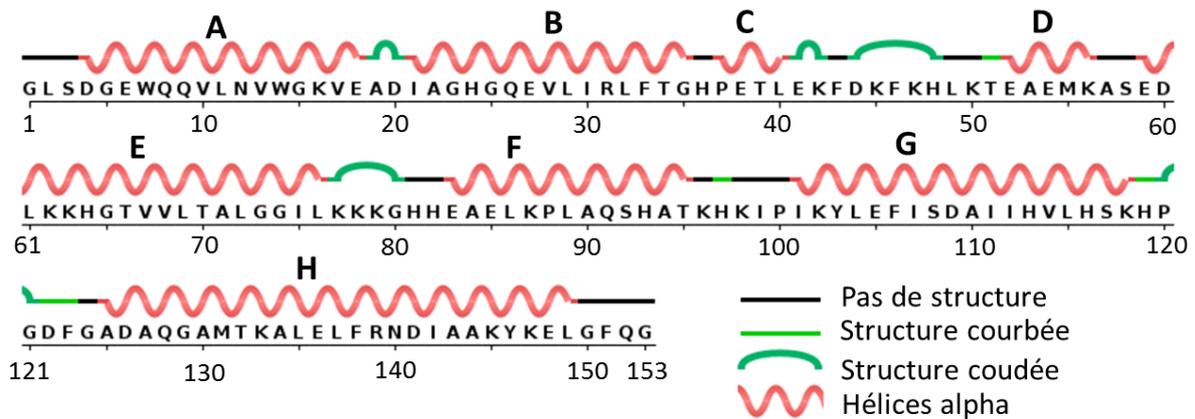


Figure 5-1 : Structure primaire et structure secondaire de la myoglobine de cœur de cheval (1WLA) mesurée par cristallographie. Figure adaptée d'après la « protéine data bank » PDB. (Maurus et al., 1997)

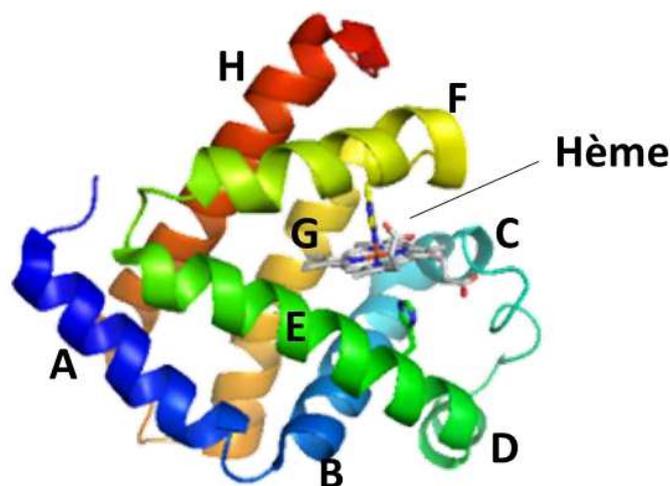


Figure 5-2 : Structure tertiaire de la myoglobine et organisation des hélices alpha.

C. Le site actif : l'hème

1) Structure et coordination

L'hème de la myoglobine est un hème de type b, c'est une protoporphyrine dont la structure est représentée dans la Figure 5-3 (1). Le fer peut être présent dans plusieurs degrés d'oxydation (II, III et IV), comme nous le verrons par la suite, menant à différentes formes de la myoglobine. Dans cette étude, c'est une myoglobine avec un fer au degré d'oxydation III qui sera utilisée comme forme de départ. Cette dernière est appelée metmyoglobine (Met(III)Mb) et est disponible commercialement. Dans cette configuration, l'ion fer possède six sites de coordination dont quatre sont occupés par les atomes d'azote de la porphyrine. Les deux derniers sites définissent le positionnement et l'activité de l'hème dans la protéine. Ce dernier est inclus dans la structure de la protéine entre l'hélice E et l'hélice F par des interactions avec deux histidines. L'ion fer forme une liaison de coordination avec l'histidine 93 de l'hélice F et une molécule d'eau est coordonnée sur son dernier site. Cette molécule d'eau interagit également par liaison hydrogène avec l'histidine 64 de l'hélice E, ceci étant représenté sur la Figure 5-3 (2) (Maurus et al., 1997). Le complexe hème-protéine est stable à pH neutre mais à pH acide, inférieur à 5, la dissociation de ce complexe devient importante. Cette dépendance au pH est une conséquence directe de la protonation de l'histidine coordonnant la protoporphyrine mais également, de la perte générale de la structure secondaire de la protéine à pH acide. Lorsque l'ion fer est dans son degré d'oxydation II, le complexe montre une stabilité étendue jusqu'au pH de 3 (Richards, 2013).

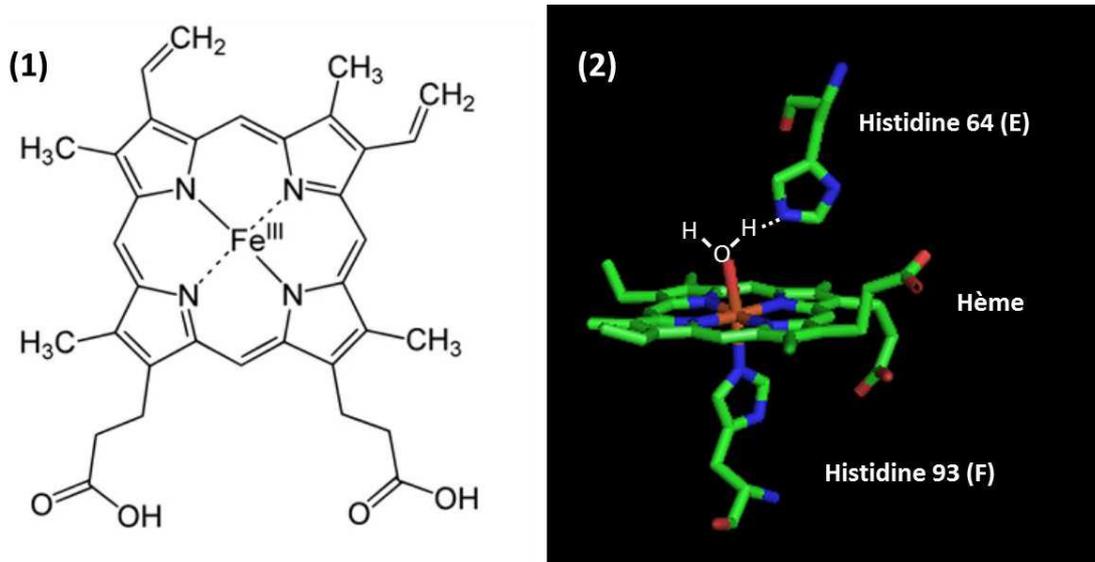
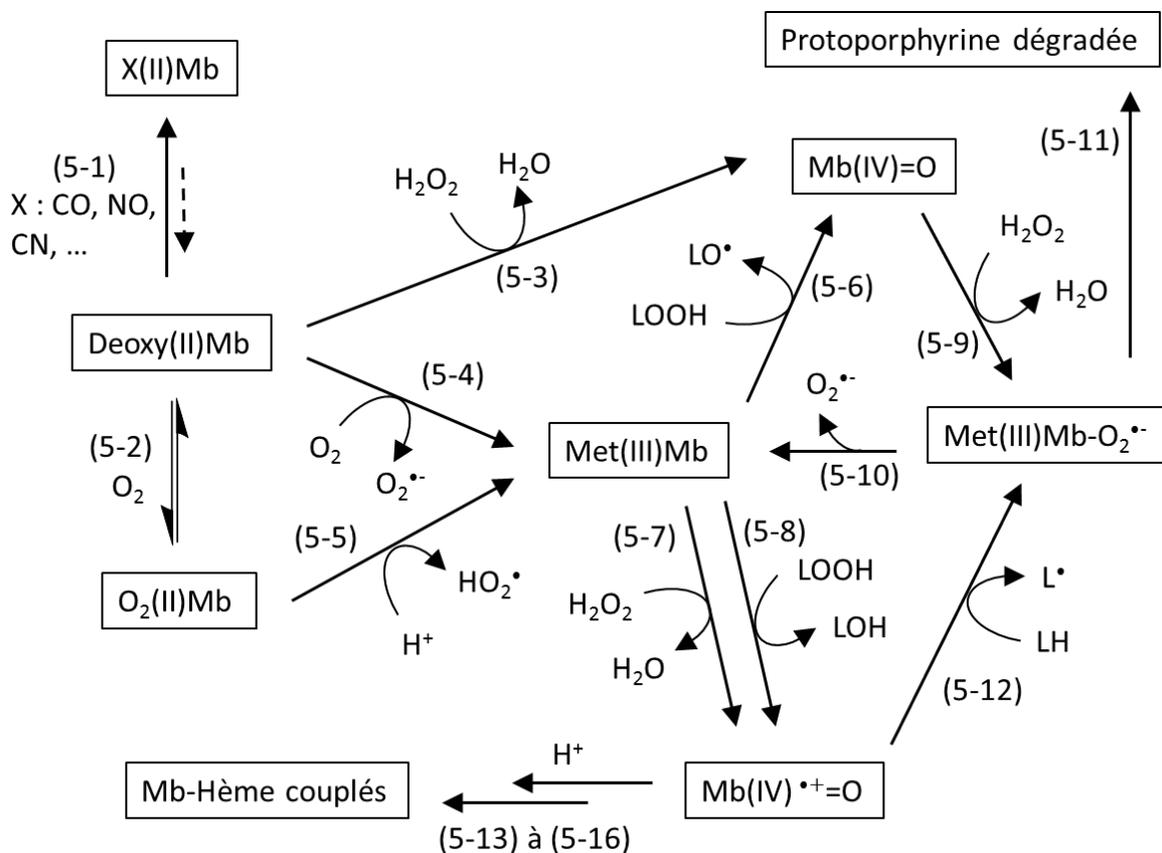


Figure 5-3 : (1) Structure de l'hème de type b de la myoglobine, un ion fer au degré d'oxydation III correspond à la metmyoglobine. (2) Coordination de l'hème dans la metmyoglobine avec l'intermédiaire d'une molécule d'eau. L'ion fer est directement coordonné à l'histidine 93. L'histidine 64 interagit par liaison hydrogène avec la molécule d'eau coordonnée. Figure réalisée sur PyMOL à partir du PDB 1WLA

2) Propriétés d'oxydoréduction en solution aqueuse aérée

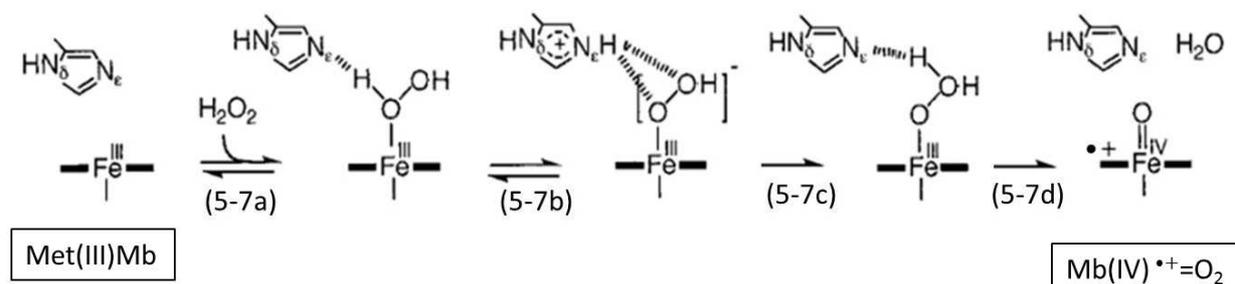
Résultant des propriétés d'oxydo-réduction de l'ion fer de l'hème, de nombreuses formes de la myoglobine coexistent. Les formes principales présentes en solution et les principales réactions d'oxydo-réduction impliquées seront décrites dans cette partie. Ces formes de la myoglobine peuvent comporter des ions fers au degré d'oxydation 2, 3 ou 4. Le fer(II) peut se complexer au dioxygène pour former de la $O_2(II)Mb$ ou rester sans ligand sous forme deoxy(II)Mb (équation 5-2). Cette forme peut également complexer de nombreux gaz comme le monoxyde de carbone, le monoxyde d'azote ou encore le cyanure, ce qui n'est pas toujours réversible (équation 5-1) (Richards, 2013).



Équations 5-1 à 5-18 : Equations d'oxydo-réduction, de complexation et de dégradation impliquant l'hème de la myoglobine en solution aqueuse. « L » correspond à un groupement lipide. Figure adaptée d'après (Richards, 2013).

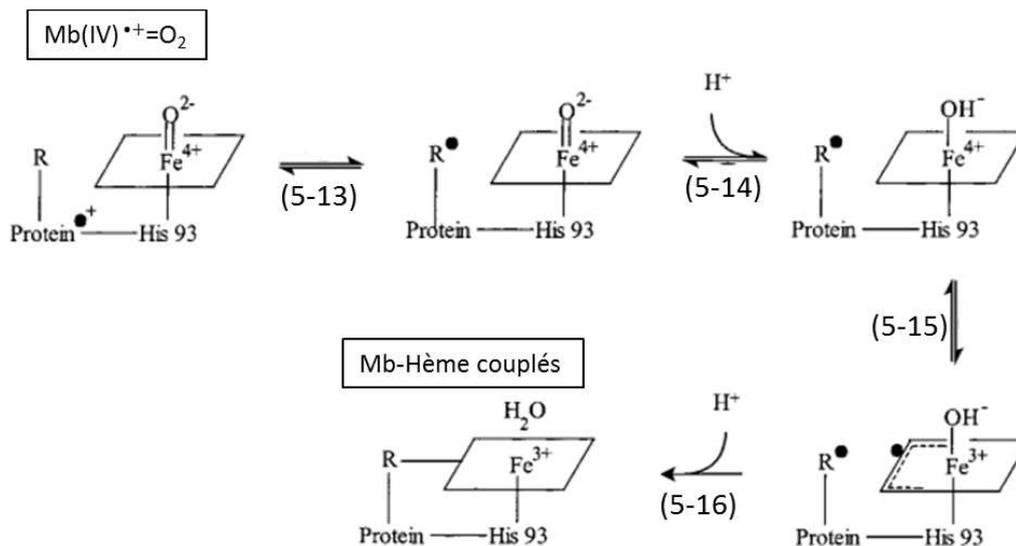
L'oxydation de l'ion fer(II) en fer(III) conduit à la formation de la metmyoglobine à partir de la forme oxygénée ou désoxygénée (équation 5-4 et 5-5). Cette oxydation peut résulter de l'action de l'oxygène et la libération d'ion superoxyde mais peut être réalisée par d'autres oxydants comme le ferrocyanure de potassium par exemple. Les espèces deoxy(II)Mb et Met(III)Myo peuvent également réagir avec le peroxyde d'hydrogène (équation 5-3 et 5-7) ou des résidus

peroxydes (équation 5-6 et 5-8) présents en solution. Ces réactions vont résulter en la formation des formes hypervalentes de myoglobine Mb(IV)=O et Mb(IV) $\cdot^+=$ O. En l'absence d'antioxydant ou d'autoréduction de ces composés, ils peuvent évoluer vers des dégâts irréparables du site actif de la myoglobine. En effet, la protoporphyrine peut être dégradée (équation 5-11) ou une liaison pontante entre la protéine et l'hème peut se former à partir de l'intermédiaire Mb(IV) $\cdot^+=$ O (Richards, 2013). Comme exemple de la réaction du site actif avec une espèce peroxyde, la réaction 5-7 a été détaillée et peut être séparée en quatre étapes allant de a à d dans les équations correspondantes. De cette manière, la visualisation des rôles des interactions faibles du ligand avec l'histidine 64 est mis en évidence dans la formation de l'espèce Mb(IV) $\cdot^+=$ O (Egawa et al., 2003).



Équations 5-7a à 5-7d: Détail de l'équation 5,7 correspondant à la formation de l'intermédiaire Mb(IV) $\cdot^+=$ O₂ à partir de la Met(III)Mb et de l'eau oxygénée. Les réactions font intervenir le site actif de la myoglobine soit l'hème et l'histidine 64. Figure adaptée d'après (Egawa et al., 2003)

La formation de l'espèce couplée peut, elle aussi, être détaillée en différentes étapes selon les équations 5-13 et 5-16. En suivant les considérations les plus récentes, la formation de liaisons pontantes entre l'hème et la protéine se ferait par la délocalisation du radical formé sur l'espèce Mb(IV) $\cdot^+=$ O sur un résidu, possiblement la tyrosine 103 capable de former un radical intermédiaire à long temps de vie de type phénoxy (ϕ -O \cdot), réaction (5-13). C'est ensuite par la nature partiellement radicalaire de l'hème que se forme l'espèce couplée selon les équations 5-15 et 5-16. La formation de cette espèce est favorisée en milieu acide (Reeder et al., 2002). D'autres études suggèrent également qu'un couplage entre l'hème et la protéine puisse se faire sur les histidines 64 et 93 de la myoglobine, notamment suite à la débromation réductrice du BrCCL3 (Osawa et al., 1993).



Équations 5-13 à 5-16 : Détails des réactions pouvant conduire à la formation de l'espèce Mb-Hème couplée à partir de l'intermédiaire Mb(IV) $\cdot^+=O_2$ selon les équations 5-13 à 5-16.

Figure adaptée d'après (Reeder et al., 2002)

Une manière simple et efficace de visualiser la nature de la myoglobine dans les échantillons est l'étude du spectre d'absorption UV-Visible de l'échantillon. En effet, la protoporphyrine donne lieu à un fort signal dans le visible qui peut se séparer en deux composantes. Il y a la bande de Soret, la plus intense vers 400nm, et les bandes Q, comprises entre 500 et 600nm. Ainsi, l'absorbance des différentes myoglobines est caractéristique et détaillée pour les formes principales dans le Tableau 5-1. Les spectres caractéristiques de formes O₂(II)Mb, deoxy(II)Mb, Met(III)Mb et de l'espèce couplée sont également présentés dans la Figure 5-3 (1) et (2). Cette comparaison rapide sera utilisée lors de notre étude afin de mieux appréhender les modifications faites à la protéine sous irradiation.

Tableau 5-1 : Bandes d'absorption UV-Visible des différentes formes de la myoglobine. Tableau provenant depuis (Richards, 2013).

Forme	Bande de Soret (nm)	Bandes Q (nm)
Met(III)Mb	408	502, 630
O ₂ (II)Mb	418	543, 581
Deoxy(II)Mb	435	560
CO(II)Mb	424	540, 579
Mb(IV)=O	420	549, 582 (épaulement)
Mb-Hème couplés (pH 7)	405-408	589

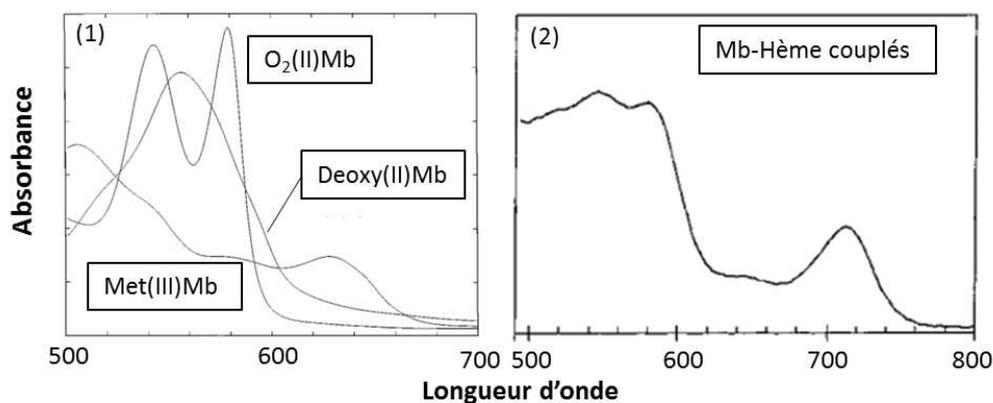


Figure 5-4 : Spectres d'absorption des bandes Q des formes O₂(II)Mb, deoxy(II)Mb, Met(III)Mb et de la Mb-Hème couplée. Figures adaptées d'après (Schenkman et al., 1997) : (1) et (Reeder et al., 2002) : (2).

c) Activité semi-catalytique

Comme énoncé précédemment, la réaction de la myoglobine avec une espèce peroxyde peut résulter en sa dégradation irréversible. Cependant, en présence d'un cofacteur réducteur, la myoglobine peut alors avoir une activité catalytique peroxydase ce qui fait d'elle une pseudoperoxydase. Ces réactions sont décrites selon le cycle de la Figure 5-5 impliquant les équations 5-7, 5-17 et 5-18. La première étape est la formation de la myoglobine hypervalente radicalaire Mb(IV)^{•+}=O par réaction avec le peroxyde d'hydrogène. Les deux étapes suivantes correspondent à une double réduction successive de la myoglobine par le cofacteur HA. Parmi les substrats possibles, l'ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) est l'un des plus couramment utilisés car il permet notamment le suivi de la formation de l'espèce réduite ABTS^{•+} par son absorption dans le domaine du visible (Carlsen et al., 2003).

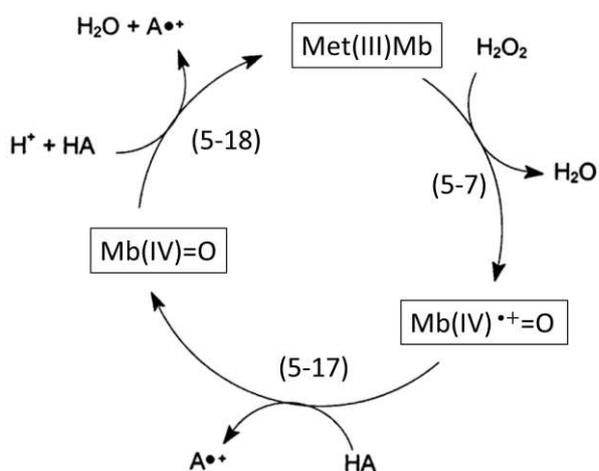


Figure 5-5 : Cycle catalytique de l'activité peroxydase de la myoglobine en présence d'un cofacteur HA selon les équations 5-7, 5-17 et 5-18. Figure adaptée d'après (Carlsen et al., 2003).

D. L'apomyoglobine

Une autre possibilité qu'offre la myoglobine est celle de retirer son hème en conservant la structure native de la protéine. La version sans hème de la myoglobine est appelée apomyoglobine. Cette modification semble garder une structure secondaire cohérente sans hème. On observe une relativement bonne conservation des proportions en hélice alpha. En effet, dans le cadre de mesures réalisées par Harrison and Blout, les structures secondaires de myoglobine et d'apomyoglobine de cachalot furent mesurées par dichroïsme circulaire pour obtenir respectivement 71% et 60% d'hélices alpha (Harrison and Blout, 1965). On note toutefois une diminution des proportions des structures alpha au profit de structures coudées lors du retrait de l'hème de la myoglobine ce qui suggère un affaiblissement de sa structure secondaire. Il a également été montré que l'ajout d'hème à l'apomyoglobine permet la reformation de la myoglobine avec une structure identique. Cette expérience montre la réversibilité et la proximité des deux formes de la protéine avec ou sans hème.

Il a été vu précédemment que la myoglobine possède des propriétés oxydo-réductrices importantes en raison de la présence de l'hème. Obtenir cette protéine sans hème fait alors de la myoglobine une protéine très intéressante pour une étude de radiolyse. En effet, cette spécificité permet d'étudier l'influence de l'hème sur la radiolyse en comparant la radiolyse des deux formes : la metmyoglobine et l'apomyoglobine.

II. Etude des effets indirects de l'irradiation de la myoglobine

Dans cette partie, sera réalisé en premier lieu un rapide tour d'horizon des études portant sur la radiolyse de la myoglobine en solution aqueuse. Par la suite, le détail des expériences d'irradiation réalisées ainsi que les analyses mises en jeu seront explicitées.

A. Etat de l'art de la radiolyse de la myoglobine en solution aqueuse

A notre connaissance, la radiolyse de la myoglobine décrite dans la littérature est réalisée uniquement sous irradiation avec des rayonnements gamma, donc de faibles TEL équivalents. Aucune donnée expérimentale n'est décrite quant à l'irradiation par des ions de cette protéine. Ainsi, un rapide résumé de la littérature existante sera réalisé dans cette partie au travers des résultats obtenus par deux études sous rayonnements gamma. Lee et Song ont mesuré un passage de 63% d'hélices alpha à 12% pour une dose déposée de 10 kGy au profit de formations de structures bêta et de désorganisation de la protéine avec des évolutions respectives de 14% à 44% et 23% à 44% (Lee and Song, 2002). Cette étude a également montré que la perte de structure va de pair avec une diminution de la bande de Soret en UV-Visible, ce qui montre une forte

influence de l'irradiation sur l'hème (Figure 5-6). Cette diminution a été identifiée comme étant un marqueur important de l'irradiation. Tous ces dégâts ont été corrélés à la production de ROS car, lors d'irradiations en présence d'antioxydants, la myoglobine est moins dégradée.

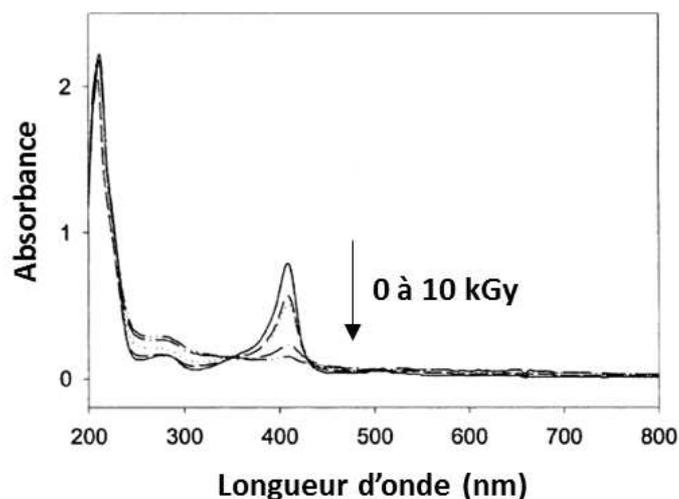


Figure 5-6 : Spectres UV-Visible de la myoglobine à 0,1% en solution tampon phosphate à pH=7 sous irradiation gamma. Figure adaptée d'après (Lee and Song, 2002).

En parallèle, Puchala et Schuessler décrivent une fragmentation majoritaire de la myoglobine lors de l'irradiation en milieu aéré contre une agrégation majoritaire en milieu désoxygéné sous rayonnement gamma (Figure 5-7). Cette description coïncide avec les réactions décrites par les équations à 1-39 à 1-45 dans le chapitre 1 menant à la formation d'un radical carbone alpha sur la chaîne principale qui peut conduire à la fragmentation ou à la dimérisation. Des irradiations à pH 5 et 7 ont également montré une faible dépendance au pH dans cette gamme. En effet, les résultats sont très similaires. Lors de cette étude, une estimation de la taille des fragments par électrophorèse sur gel laisse penser à une sélectivité lors des ruptures de la chaîne principale que les auteurs ont attribué à la présence d'un résidu proline. C'est le seul acide aminé ayant une amine tertiaire dans la chaîne principale, ce qui sensibiliserait son oxydation et favoriserait la rupture de la chaîne principale au niveau de ce résidu.

Les marqueurs principaux de la dégradation de la myoglobine ont été identifiés ci-dessus lors de la radiolyse gamma. Nous chercherons à déterminer si, sous irradiation par des ions, les modifications sont de même nature ou sinon, quelles sont leurs spécificités. De même, nous allons essayer d'aller plus loin dans la description des modifications faites à la protéine en termes de structure, d'activité ou encore de dégâts chimiques. Ainsi, des techniques permettant une analyse à l'échelle moléculaire ont été mises en œuvre et seront explicitées par la suite avant de décrire les résultats expérimentaux. Les effets lors de l'irradiation par des ions seront alors mis en évidence et discutés à la fois pour l'irradiation de la myoglobine et de l'apomyoglobine.

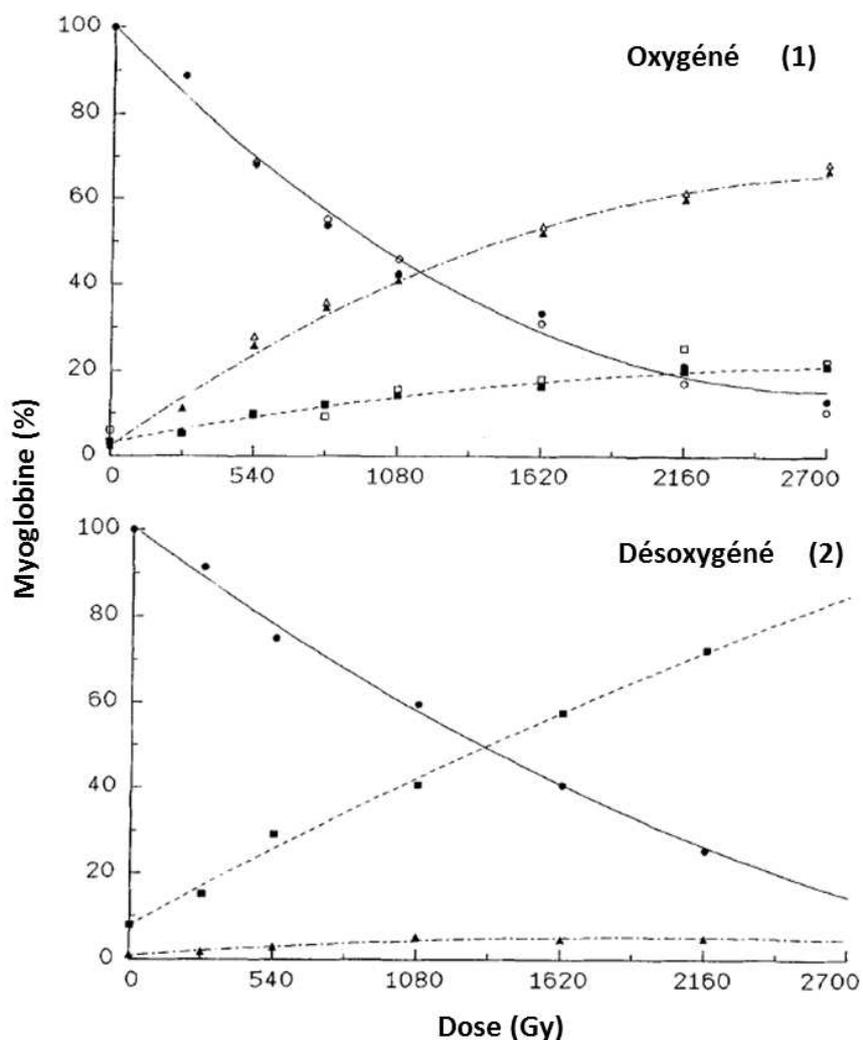


Figure 5-7 : Dégradations radio-induites de la myoglobine (ronds) et production de fragments (carrés) et d'agrégats (triangles) en milieu aéré (1) ou désoxygéné (2). Les symboles pleins sont des irradiations à pH=7 et vide à pH=5. Figure adaptée d'après (Puchala and Schuessler, 1995)

B. Méthode expérimentale

Dans cette partie, sont présentés la préparation des échantillons de myoglobine et d'apomyoglobine et le protocole d'irradiation. Les techniques analytiques mises en œuvre ainsi que les modes opératoires associés sont également décrits.

1) Produits utilisés

Les solutions aqueuses sont préparées à partir d'eau ultra pure provenant d'un appareil ELGA Milli-Q (résistivité à 25°C : 18,2 MΩ.cm⁻¹). Les produits chimiques utilisés sont listés dans le Tableau 5-2. La myoglobine et l'apomyoglobine sont purifiées par dialyse avant irradiation. Les autres produits sont utilisés sans traitement ou purification préalable.

Tableau 5-2 : Produit chimique utilisé pour les expériences de radiolyse de protéines en solution diluée ainsi que leur analyse. Une activité enzymatique en units/mg correspond à un substrat converti en $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$; (w/w) est un rapport de masse.

No. CAS	Produit chimique	Pureté	Fournisseur
100684-32-0	Myoglobine (cœur de cheval)	$\geq 90\%$	Sigma-Aldrich
9008-45-1	Apomyoglobine	Synthétisée	Lab. LIONS, CEA
13472-35-0	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
7758-11-4	K_2HPO_4	$\geq 99\%$	Sigma-Aldrich
9001-05-2	Catalase	2000 à 5000 unit/mg	Sigma-Aldrich
7440-37-1	Argon	Alphagaz 1, <2ppm O_2	Air liquide
7722-84-1	H_2O_2	30% dans H_2O (w/w)	MERCK
9002-07-7	Trypsin (pancréa bovin)	10000 BAEE units/mg	Sigma-Aldrich
7647-01-0	Acide chlorhydrique	37% dans H_2O (w/w)	ACROS
64-19-7	Acide acétique	100%	MERCK
64-18-6	Acide formique	$\geq 99\%$	ACROS
1310-73-2	NaOH	$\geq 97\%$	Sigma-Aldrich
75-05-8	Acétonitrile	$\geq 99,9\%$	Fisher Scientific
75-65-0	tert-butanol	$\geq 99,5\%$	Sigma-Aldrich
1310-73-2	NaOH	$\geq 97\%$	Sigma-Aldrich
30931-67-0	ABTS	$\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
151-21-3	SDS	$\geq 98,5\%$	Sigma-Aldrich
79-06-1	Acrylamide	$\geq 99\%$	ACROS
110-26-9	N'N'-bis-méthylène-acrylamide	$\geq 99\%$	ACROS
6104-58-1	Bleu de Coomassie	$\geq 80\%$	Sigma-Aldrich
602-24-2	Mercaptoéthanol	$\geq 99\%$	Roth
110-18-9	TEMED	$\geq 99\%$	ACROS
7727-54-0	Persulfate d'ammonium	$\geq 98\%$	ACROS
67-56-1	Méthanol	$\geq 99,9\%$	Fisher
2390-54-7	Thioflavine T	$\sim 75\%$	Sigma-Aldrich

Mélange commercial	Fournisseur	Composants	No. CAS
Tris-Glycine-SDS Running buffer x10	Fisher	Tris	77-86-1
		Glycine	56-40-6
		SDS	151-21-3
4X Laemmli Sample buffer	Bio-Rad	Glycérol 35-50%	56-81-5
		Dodécylsulfate de lithium 2,5-5%	2044-56-6
		Tris 2,5-5%	77-86-1
		HCL 0,1-1%	7647-01-0
		Bleu de bromophénol <0,1%	115-39-9

2) Préparation et purification des protéines cibles

a) Obtention de l'apomyoglobine

L'apomyoglobine a été obtenue à partir de myoglobine commerciale par Serge PIN du laboratoire LIONS du CEA Saclay dans le cadre d'une collaboration. Cette synthèse a été effectuée selon la méthode décrite par Rossi-Fanelli et al. avec l'hémoglobine. Cette méthode consiste en la précipitation de l'apomyoglobine dans l'acétone à -20°C avant sa purification par dialyse (Rossi-Fanelli et al., 1958). La protéine a ensuite été lyophilisée pour être préparée fraîchement lors de nos expériences

b) Purification des cibles protéiques

Les échantillons de protéines (myoglobine ou apomyoglobine) ont été systématiquement purifiés avant irradiation. Cette purification se fait en différentes étapes. Des solutions concentrées sont d'abord préparées, puis dialysées et centrifugées avant de fixer leur concentration par dilution.

Ainsi, des solutions mères concentrées sont au préalable préparées, typiquement 10 à 20mL de solution mère à $C_{\text{mère}} \sim 200\mu\text{M}$ pour une solution finale d'environ 40 à 80mL à $50\mu\text{M}$. Les solutions de myoglobine sont préparées dans l'eau ou dans du tampon phosphate 22mM à $\text{pH} = 6.8$. L'apomyoglobine est préparée uniquement dans l'eau car elle précipite en présence de tampon phosphate. Le tampon phosphate est préparé fraîchement à partir des solutions mères de phosphate monosodique ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et dipotassique (K_2HPO_4) à $0,2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. (Pour 1L de solution tampon à 22mM, $\text{pH}=6.8$: 54.4mL de NaH_2PO_4 à 0,2M + 56.6mL K_2HPO_4 à 0,2M). Le pH du mélange est contrôlé au pH-mètre périodiquement, mais non systématiquement.

Pour l'élimination des impuretés de faible taille et d'éventuels sels présents dans les protéines lyophilisées, les solutions de metmyoglobine et d'apomyoglobine sont introduites dans des membranes de dialyse en cellulose de type BioDesign Dialysis Tubing de la société Fisher ayant un seuil de coupure à 8000 Da. Les solutions sont typiquement dialysées contre 3x1L de solvant (eau ou tampon) à 4°C . Le solvant est changé au bout de 4h, 8h puis après une nuit, la dialyse est arrêtée.

La dialyse terminée, les solutions sont récupérées et centrifugées de façon douce pendant 10 minutes à 9000 tour/min. De cette manière, les protéines mal dissoutes et/ou agrégées sont éliminées en récupérant le surnageant.

Une analyse UV est réalisée à partir de la solution récupérée après centrifugation afin de déterminer la concentration des échantillons. Une fraction de la solution est diluée à environ $10\mu\text{M}$ pour la mesure. Les epsilons préalablement mesurés sont les suivants : Myoglobine: $\epsilon_{280} = 26051 \text{ mol/L/cm}$; Apomyoglobine: $\epsilon_{280} = 13500 \text{ mol/L/cm}$. La concentration des échantillons est ensuite fixée à $50\mu\text{M}$ dans le milieu voulu pour l'irradiation.

3) Expériences d'irradiation

a) Conditions d'irradiation

A partir des échantillons typiques de 40mL à 50 μ M, 30ml servent au rinçage et au conditionnement des circuits à circulation « faibles énergies » ou « hautes énergies » (cf Chap. 2.). Le volume total irradié correspond alors à 10mL plus le volume du circuit. Ainsi, des prélèvements peuvent être réalisés au cours de l'irradiation (typiquement 1mL) afin de réaliser un suivi de l'irradiation en fonction de la dose.

b) Rayonnements utilisés

Lors des irradiations de myoglobine en solution diluée, des protons et des ions carbone de basses énergies ont été utilisés pour réaliser des irradiations à deux TEL très différents (Tableau 5-3). Les mesures sont alors réalisées de façon intégrale uniquement, toute l'énergie de la particule étant déposée en solution. Des irradiations par des ions carbone de hautes énergies ont également été menées. Dans ces conditions, les rayonnements ionisants traversent totalement l'échantillon à TEL quasi-constant.

Tableau 5-3 : Type de rayonnement utilisé pour l'irradiation de l'apomyoglobine et de la myoglobine en solution diluée.

Type de rayonnement	Energie en solution (MeV)	TEL moyen dans l'eau (eV/nm)
H ⁺	2	26
C ⁶⁺	43,8	530
	4300	11,3

Concernant les protons utilisés, une partie des expériences a été menée sur une ligne du 4MV qui permettait uniquement la mesure de la dose par dosimétrie de Fricke. Ces expériences ont été utilisées pour présenter la radiolyse de la myoglobine de manière phénoménologique et non quantitative.

4) Méthodes analytiques

Dans cette partie, seront décrites toutes les méthodes analytiques mises en œuvre de façon systématique après une irradiation de solution diluée de myoglobine ou d'apomyoglobine. Ces dernières peuvent être distinguées en deux classes : les analyses en ligne et les analyses post-irradiation. Ainsi, l'analyse en ligne par UV-Visible est réalisée directement pendant l'irradiation et les analyses post-irradiations consistent en des mesures de dichroïsme circulaire, par HPLC-UV-CAD-MS et par électrophorèse sur gel.

D'autres analyses ont également été testées sur nos échantillons mais de manière ponctuelle et ont été jugées comme moins importantes car apportant moins d'informations. Ces techniques seront décrites lors de la discussion des résultats obtenus.

a) Suivi en ligne, UV-Visible

Le suivi en ligne est réalisé grâce aux montages d'irradiation équipés d'une cuve à circulation comme cela est décrit dans le chapitre 2. Les spectres sont enregistrés pendant l'irradiation sur une gamme spectrale de 200 à 800 nm (Figure 5-8). Dans ces conditions, sur le spectre de la myoglobine à 50 μ M dans l'eau, la bande de Soret à 400 nm sature même avec un trajet optique de 0,5cm. Cependant, une bonne visualisation du signal des acides aminés aromatiques (280nm) et des bandes Q (450 à 700nm) est possible. Les bandes Q étant propres à la structure de l'hème, un suivi des modifications subi par l'hème sous irradiation est réalisé par ce biais (Tableau 5-1)(Richards, 2013). Dans le cas de l'apomyoglobine, on retrouve logiquement uniquement le signal des acides aminés aromatiques. Pour s'affranchir de la saturation, des analyses hors ligne peuvent être réalisées sur des échantillons irradiés.

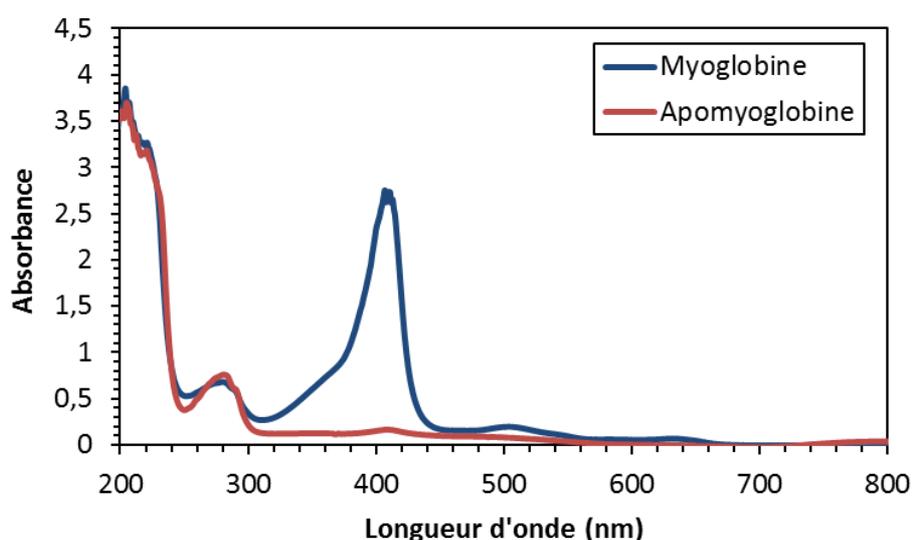
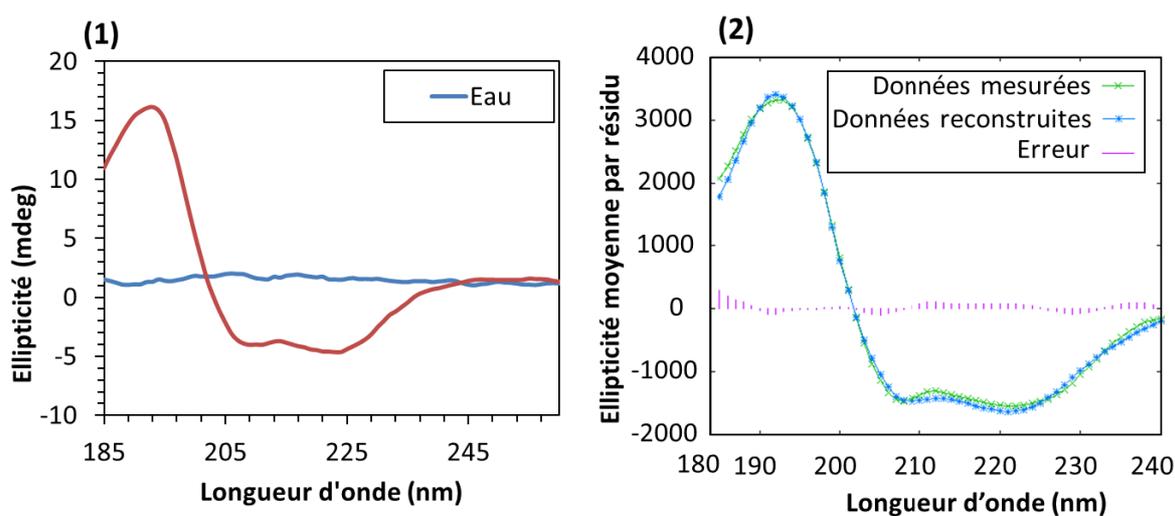


Figure 5-8 : Spectres UV-Visible de la myoglobine (trajet optique 0,5 cm) et de l'apomyoglobine (trajet optique 1 cm) dans l'eau à 50 μ M.

b) Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est une technique basée sur l'absorption de la lumière polarisée. Elle est très populaire pour l'analyse des protéines car elle permet de déterminer leur structure secondaire. Les analyses de dichroïsme circulaire sont réalisées sur un spectromètre Jasco J-810. Une fraction des échantillons de protéines est ramenée à une concentration de 2 μ M et introduite dans une cuve en quart de trajet optique 1mm pour l'analyse. Le spectre est enregistré de 185 à 260nm avec une vitesse de scan de 100nm/min, un pas de 1nm pour 6 accumulations. La température est fixée par un module Peltier à 20°C. (Figure 5-9)



(3)

	hélices alpha	feuilletts beta	structures coudés	structures désordonnés
Myoglobine	67%	3%	7%	23%
Apomyoglobine	58%	3%	15%	24%

Figure 5-10 : (1) Spectres de dichroïsme circulaire de la myoglobine diluée à 2 μ M dans l'eau. Les spectres sont enregistrés avec un trajet optique 1 mm, une vitesse de scan de 100nm/min et 6 accumulations. (2) Reconstruction des données expérimentales du spectre Myoglobine-Eau (1) après lissage sur Dichroweb par l'algorithme CONTIN avec l'ensemble de données numéro 3. (Whitmore and Wallace, 2008, 2004). (3) Résultats de la déconvolution en différents types de structures secondaires par Dichroweb de la myoglobine (1) & (2) et de l'apomyoglobine dans les mêmes conditions.

Le signal du solvant (eau ou tampon) est enregistré dans les mêmes conditions puis soustrait aux spectres enregistrés des échantillons de protéines. Avant soustraction, un lissage du spectre de l'eau de type Savitzky-Golay est réalisé pour ne pas détériorer le signal de la protéine. Le nombre de points du lissage est adapté pour ne plus avoir de bruit sur le signal du solvant, il est typiquement supérieur à 15 points. Le spectre d'ellipticité résultant est lui aussi lissé avec l'algorithme Savitzky-Golay à neuf points avant d'être déconvolué sur la base de données en ligne Dichroweb (Whitmore and Wallace, 2008, 2004). Pour la déconvolution, le programme d'analyse

CONTIN et l'ensemble de références n°3 ont été choisis parmi ceux disponibles car ils permettaient de retrouver une structure native cohérente pour la myoglobine. De plus, l'ensemble de données choisi comporte la myoglobine comme l'une de ses protéines de référence. Pour nos échantillons de myoglobine et d'apomyoglobine, la masse moléculaire moyenne d'un résidu est de 110.8 g/mol, valeur nécessaire à la déconvolution.

Les structures secondaires obtenues par déconvolution des protéines non irradiées dans l'eau sont de 67% d'hélices alpha pour la myoglobine et de 58% pour l'apomyoglobine. Ces structures sont en bon accord avec les mesures menées par Harrison et Blount en 1965 où des structures respectives de 71% et 60% d'hélices alpha ont été mesurées.

c) Analyses par HPLC-UV-CAD-MS

Les analyses par HPLC sont réalisées sur une chaîne HPLC Thermo Fisher Dionex Ultima 3000 RS équipée d'un passeur automatique WPS. Cette HPLC est couplée à un détecteur UV-Visible à barrette de diodes (DAD) Thermo Scientific Ultima 300, un détecteur d'aérosol chargé Veo RS (CAD) et un spectromètre de Masse LTQ Orbitrap XL Thermo Electron (MS) avec une source d'ionisation par électro-nébulisation (ESI). Les spectres UV-Visible 3D sont enregistrés sur la gamme 200-600 nm sur le détecteur DAD. A la sortie du DAD, l'éluant est séparé et une fraction est analysée par CAD, le reste est analysé par spectromètre de masse comme ces deux analyses sont destructives. Lors de la nébulisation dans la source ESI du spectromètre de masse, l'azote est utilisé comme gaz vecteur de nébulisation et desséchant. La température du tube de transfert est fixée à 300°C et les tensions appliquées à l'électro-nébuliseur, aux capillaires et aux multipôles sont optimisées pour la transmission d'ions de hautes masses. Les analyses sont réalisées sur une gamme 120-2000 m/z et 1000-4000 m/z en mode positif. L'identification est également assistée par des mesures de MS². L'ion précurseur est alors isolé et fragmenté par dissociation induite par collision. Les différentes gammes de masse et la MS² sont réalisées en boucle tout au long de l'élution des produits.

Deux types d'analyses sont effectuées sur cette chaîne HPLC. D'une part, des injections directes des échantillons de protéines irradiée sur colonne C4 ayant pour but d'analyser la protéine entière ainsi que de rechercher d'éventuels fragments. La seconde analyse se fait sur colonne C18 après digestion trypsique. L'analyse des peptides de digestion a pour but d'identifier les résidus les plus touchés par les irradiations.

Injection directe sur colonne C4

Un volume typique de 25µL de solution de protéines à 50µM irradiée est injecté dans la chaîne HPLC. La séparation est réalisée à 40°C sur une colonne Water BEH-C4 (150x4,6 mm, i.d. 5µm) avec une colonne de garde de même type. La séparation est réalisée par un gradient avec un mélange de solution A : H₂O avec 0,2% d'acide formique, et de solution B : Acétonitrile avec 0,1% d'acide formique. Le gradient consiste en 30% de B pendant 4min, puis une augmentation

à 43% de B en 0,5min, 43% de B est maintenu 0.5min avant un retour à 30% de B en 0.5min qui sera maintenu 6.5min. Ceci correspond à une acquisition de 12min avec un débit de 1ml/min (Figure 5-11 (1)). Ce gradient a été optimisé pour permettre la sortie rapide de la myoglobine et la séparation de l'hème qui est extrait de la protéine en raison des conditions dénaturantes du gradient. Ainsi, sur le chromatogramme de la protéine non irradiée, la bande de 7 à 8min correspond à la protéine et la bande à 8,5 min à l'hème. L'analyse couplée à la spectroscopie de masse permet d'obtenir les masses des composés qui sont élués. La protéine a un spectre complexe en raison de ses nombreux états de charge mais il est possible d'en tirer des informations très précises, grâce à la haute résolution du spectromètre de masse (Figure 5-11 (2)).

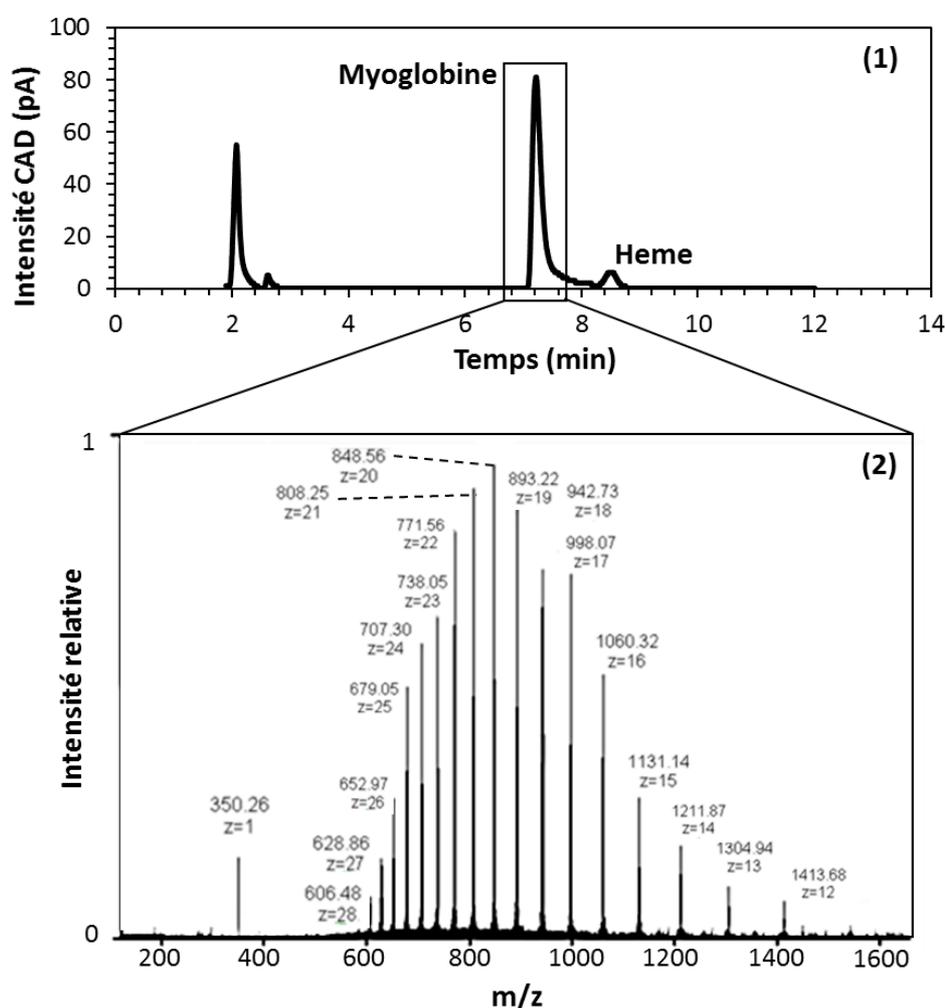


Figure 5-11 : (1) Chromatogramme d'un échantillon de myoglobine non irradié obtenu sur la colonne C4 (2) Intégration des spectres de masse sur la bande correspondant à la myoglobine en 7 et 8 min.

En effet, si l'on considère la bande chargée 16 fois à 1060,3 m/z, l'apparition d'une seconde bande à 1061,3 correspondra à l'oxygénation de la protéine, soit l'ajout d'un atome d'oxygène de masse 16. En intégrant sur tous les chromatogrammes la même bande de la même manière, il est possible

d'obtenir une évolution relative de la disparition de la protéine, de son oxydation ou de la formation de tout autre composé. Cette analyse se base sur l'hypothèse que les composés quantifiés (myoglobine, myoglobine oxygénée, ...) s'ionisent de la même façon dans la source ESI du spectromètre de masse, ce qui permet de réaliser une analyse semi-quantitative. En effet, ce type d'analyse n'est à l'origine pas quantitatif en raison des variations dans l'ionisation des différents composés analysés.

Digestion trypsique et injection sur colonne C18

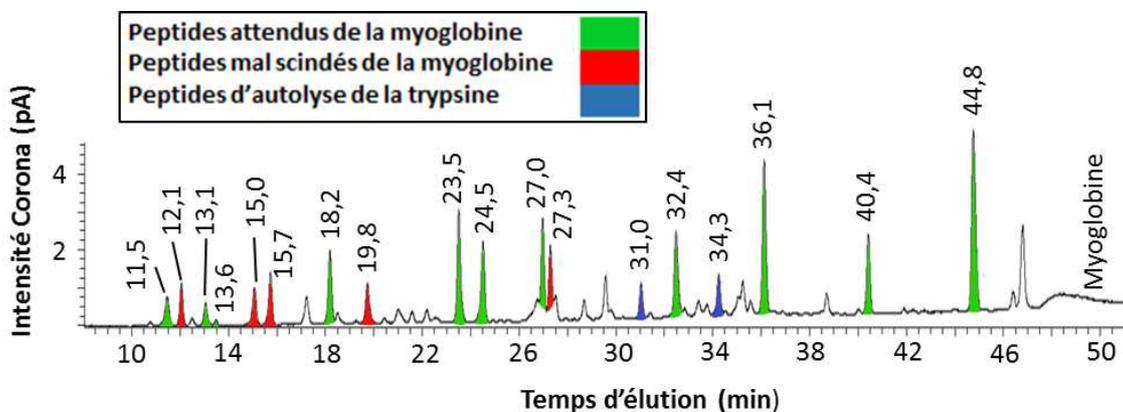
Pour l'analyse des dégâts chimiques sur une protéine, la digestion est une solution qui semble idéale. Celle-ci permet d'obtenir des polypeptides spécifiques de façon reproductible. La trypsine hydrolyse les liaisons peptidiques après une lysine ou une arginine sauf si une proline la suit directement. L'analyse des peptides résultants peut être réalisée par HPLC-MS, ce qui permet à la fois de pouvoir visualiser des dégâts chimiques et de les localiser. En effet, la digestion garde la notion de structure suite à la formation des peptides.

Un protocole de digestion a été adapté à la myoglobine puis transposé à l'apomyoglobine et celui-ci passe par la dénaturation en milieu acide de la protéine pour la dissocier de l'hème. La présence de l'hème rigidifie la structure ce qui rend la digestion moins efficace. Ainsi, 75µL de HCl à 0.1M sont ajoutés à 100µL de solution de protéines à 50µM. Ce mélange est chauffé à frémissement pendant 10min. Une fois refroidi, le mélange est neutralisé avec environ 75µL de NaOH à 0,1M. A ce stade, il est important de vérifier la bonne neutralisation de la base et de l'acide car elle est essentielle pour l'action de la trypsine par la suite. Ainsi, une fois l'échantillon neutralisé, trois ajouts de 1/25 de trypsine sont réalisés à intervalle de temps de deux fois 4h, soit des ajouts de 50µL de trypsine « fraîche » à 4µM à température ambiante sous agitation. Suite au dernier ajout, les échantillons sont agités pendant une nuit. Le lendemain, la digestion est stoppée par l'ajout de 5µL d'acide formique pur. Les dilutions successives ramènent les échantillons analysés à 20µM en matériel de départ.

Les échantillons sont analysés par HPLC-UV-CAD-MS rapidement après la digestion. 25µL sont injectés sur une colonne Thermo-Fisher Hypersyl-Gold C18 (250x4.6mm, i.d. 5µM) équipée d'une colonne de garde de même type. La séparation est réalisée à 10°C par un gradient avec un mélange de solution A : H₂O avec 0,2% d'acide acétique, et de solution B : Acétonitrile avec 0,1% d'acide acétique. Le gradient consiste en 3% de B pendant 5min suivi d'une montée lente de 60min à 60% de B. Ensuite, une transition à 95% de B est réalisée en 2min et ce pourcentage est maintenu 3min avant de revenir à 3% de B en 2min. La colonne est rééquilibrée à 3% pendant 13min. Le débit est fixé à 0.8ml/min.

La masse des peptides obtenus est mesurée sur le logiciel Xcalibure et leur identification est réalisée à l'aide des masses attendues suite aux coupures trypsiques. Le module FindPept de la base en ligne ExpASY est un outil de calcul simple et rapide des masses de peptides attendus ou mal scindés, il a été utilisé pour l'identification (Figure 5-12). Quasiment tous les peptides attendus ont été identifiés, les plus petits (1 à 6 acides aminés) sont toutefois pour la plupart mal scindés ce qui correspond alors à deux peptides trypsiques rassemblés comme FDK-FK ou

ASEDLK+K aux temps de rétention respectifs de 19,8 et de 12,1 minute. Les lysines 78 et 79, non identifiées sur le chromatogramme, pourraient correspondre à un pic observé proche du fond de solvant.



Position dans la séquence	Polypeptide de digestion de la Myoglobine	Masse moléculaire + H (g/mol)	Temps de rétention
01-16	GLSDGEWQQVLNVWGK	1815,90	40,4
17-31	VEADIAGHGQEVLR	1606,85	27,0
32-42	LFTGHPETLEK	1271,66	24,5
43-45	FDK	409,21	19,8
46-47	FK	294,18	19,8
48-50	HLK	397,26	15,7
51-56	TEAEMK	708,32	13,1
57-62	ASEDLK	662,34	13,6
63-63	K	147,11	12,1
64-77	HGTVVLTALGGILK	1378,84	36,1
78-78	K	147,11	
79-79	K	147,11	
80-96	GHHEAELKPLAQSHATK	1853,96	18,2
97-98	HK	284,17	15,0
99-102	IPIK	470,33	15,0
103-118	YLEFISDAIHVLHVK	1886,02	44,8
119-133	HPGDFGADAQGAMTK	1502,67	23,5
134-139	ALELFR	748,44	32,4
140-145	NDIAAK	631,34	11,5
146-147	YK	310,18	27,3
148-153	ELGFQG	650,31	27,3

Figure 5-12 : En haut, un chromatogramme mesuré sur le CAD des peptides issus de la digestion d'un échantillon de myoglobine dans l'eau. En bas, le tableau d'identification des polypeptides correspondant au chromatogramme, il recense les peptides de la trypsique ayant été identifiés. (En vert, peptides attendus, en rouge, peptides mal scindés).

Lors de ces analyses, la quantification des peptides est difficile malgré l'utilisation du détecteur CAD universel en raison des conditions d'analyse. En effet, la réponse du CAD varie en fonction de l'éluant et donc, au cours du gradient (la réponse augmente avec l'augmentation du pourcentage en acétonitrile). Toutefois, des mesures ont permis d'estimer une efficacité de la digestion de l'ordre de 25 à 30% avec le protocole mis en œuvre, soit une concentration finale en peptide de l'ordre de 5 à 6 μM . En raison des variations dans les rendements de digestion, une analyse relative des peptides sera préférée pour le traitement de résultat en choisissant des peptides qui semblent toujours les plus présents et ne pas être affectés par la radiolyse.

d) Electrophorèse, SDS-PAGE

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate (SDS PAGE) de sodium est une technique très populaire en biochimie car elle permet de séparer des macromolécules en fonction de leur masse moléculaire. Cette technique repose sur le déplacement d'ions dans un champ électrique. Ainsi, pour mieux comprendre les phénomènes de radiolyse et plus particulièrement, dans l'optique de visualiser des fragments et des multimères, leur séparation par électrophorèse a été mise au point. Le détail sur la mise en forme des gels, la préparation des échantillons, la migration, la révélation (coloration et décoloration) et l'analyse des gels par traitement d'images seront brièvement abordés par la suite.

Dans un premier temps, pour faire les premiers tests de séparation par électrophorèse, des gels commerciaux d'électrophorèse BioRad polyacrylamide de 4 à 20% ont été achetés. Par la suite, les gels furent réalisés au laboratoire avec une composition typique de 18% en acrylamide et 1% en SDS. Ils comportent également une phase moins concentrée servant au chargement du gel et étant constituée de 4% d'acrylamide et de 1% de SDS. La réalisation des gels est basée sur la polymérisation de l'acrylamide en présence de persulfate d'ammonium et de TEMED.

Les échantillons de protéines sont traités avant leur migration dans les gels pour les colorer et dénaturer les protéines afin qu'ils migrent de façon homogène. 11 μL de protéines à 50 μL sont mélangés à 11 μL d'une solution aqueuse contenant 47,5% de « Laemmli sample buffer x4 » (Tableau 5-2) et 5% de Mercaptoéthanol (pourcentage en volume). Ces mélanges sont chauffés 5min à 95°C puis placés séparément dans un puits du gel d'électrophorèse. Chaque gel contient 10 puits, et l'un de ces derniers est dédié à l'introduction d'une échelle de masse contenant un mélange de protéines étalon entre 5 et 100kDa. La migration de 1 à 4 gels en simultané a été réalisée dans une cuve BioRad remplie du mélange « Running buffer » (Tableau 5-2) avec les paramètres suivants : 10min à 100V puis 1h30 à 2h à 130V. La migration est arrêtée manuellement avant que le bleu de bromophénol (contenu dans les échantillons : Laemmli) n'atteigne le bas du gel. Après migration, les gels sont doucement décollés des plaques pour être ensuite colorés dans une solution de bleu de coomassie pendant 1h. Ils sont ensuite rincés à l'eau et plongés dans une solution de décoloration avec une légère agitation. La solution est changée plusieurs fois sur une période d'environ 24h pour obtenir un gel avec des bandes bien visibles.

Une fois la migration effectuée, leur analyse est réalisée sur un scanner Epson Perfection v700 PHOTO avec double éclairage sans aucune correction. Les images obtenues sont ensuite traitées sur le logiciel ImageJ pour obtenir des profils d'intensité de couleurs correspondant à un profil de matière ayant migré en fonction de la taille moléculaire, estimé par l'échelle de masse. Le traitement est réalisé selon la composante rouge de l'image correspondant à la plus intense.

Ainsi, de cette manière, il est possible de comparer les différents profils obtenus en fonction de la masse moléculaire. Une étude peut alors être réalisée en fonction de la dose d'irradiation des échantillons comme dans la Figure 5-13.

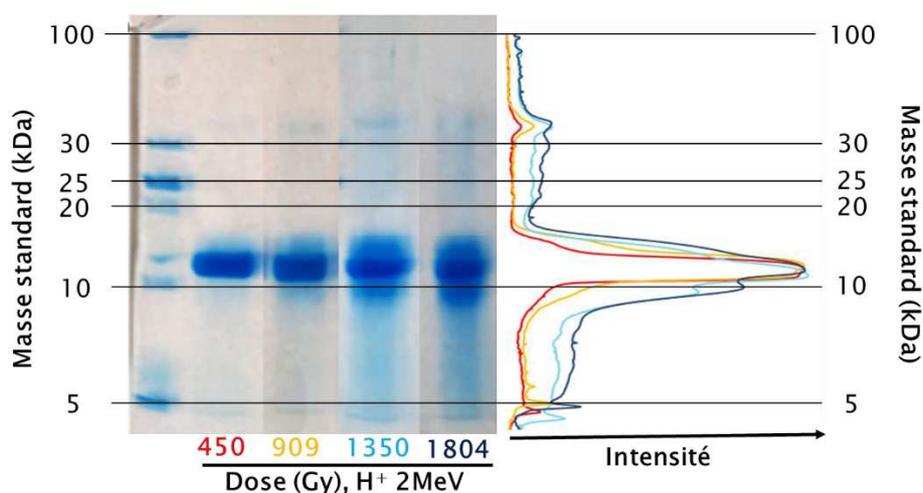


Figure 5-13 : Analyse de gels d'électrophorèse obtenus pour la migration d'échantillons de myoglobine irradiés par des protons de 2 MeV dans l'eau à 50 μ M.

C. Etude phénoménologique de la radiolyse de la myoglobine par des protons

Dans un premier temps, une étude phénoménologique de la radiolyse de la metmyoglobine et de l'apomyoglobine sera présentée. Les irradiations sont réalisées par des protons de 2 MeV, dans l'eau. Nous verrons ainsi les phénomènes indirects de la radiolyse sur la myoglobine qui serviront de point de comparaison par la suite.

1) Perte d'intégrité de la protéine

a) Perte de la structure secondaire de la protéine.

Lors de la radiolyse de solutions aqueuses diluées de myoglobine par des protons, l'analyse par dichroïsme circulaire a montré une évolution de la structure secondaire de la protéine (Figure

5-14). En effet, une diminution des structures de type hélice alpha est observée au profit d'une formation de structures bêta et d'une désorganisation de la protéine. Ces modifications atteignent un plateau après une dose d'environ 1000 Gy pour atteindre une conformation moyenne finale comportant environ 54% de structures alpha, 21% de bêta et 25% de structures désordonnées. Des expériences ont été menées dans le but de tenter une caractérisation plus précise des structures formées. Un test spécifique aux feuillets bêta-amyloïdes basé sur l'utilisation d'un marqueur fluorescent, la thiofalvin T s'est révélé négatif (Naiki et al., 1989). De la même manière, des tests préliminaires d'AFM après dépôt de solution irradiée sur surface de silicium n'ont à l'heure actuelle pas permis d'identifier de superstructures après irradiation. Des études sont toujours en cours à ce sujet.

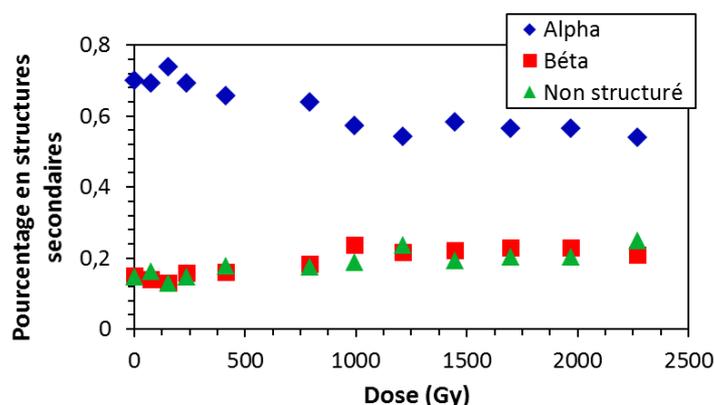


Figure 5-14 : Suivi de la structure secondaire de la myoglobine par dichroïsme circulaire. Irradiation d'une solution de myoglobine à 50 μ M dans l'eau, protons de 2 MeV. Intervalle d'erreur estimé à 1,5% d'après les différentes déconvolutions possibles.

b) Des modifications de l'hème

On observe lors des irradiations une forte modification de son spectre UV-Visible dès les premiers instants de l'irradiation (Figure 5-15). Les modifications de la bande de Soret de l'hème semblent se faire suivant deux régimes. D'abord, une forte diminution est observée avec un point isobestique à 335 nm, puis une diminution plus lente de la bande qui tend vers un plateau (Figure 5-15 (1)). Cette évolution va de pair avec une modification des bandes Q sur le spectre UV-Visible de la protéine. (Figure 5-15 (2)). En effet, un maxima d'absorbance se forme à 590nm qui aboutit également à l'obtention d'un plateau après 1000 Gy. Cette évolution nous renseigne sur la structure de l'hème de la myoglobine. Sa forme de départ, la Met(III)Mb, semble se modifier au cours de l'irradiation. Dans la littérature, des études des propriétés d'oxydo-réduction de la myoglobine ont montré qu'une espèce comportant une liaison covalente entre l'hème et la myoglobine avait une absorbance tout à fait similaire avec un maximum à 589 nm (Figure 5-4)(Tableau 5-1)(Richards, 2013).

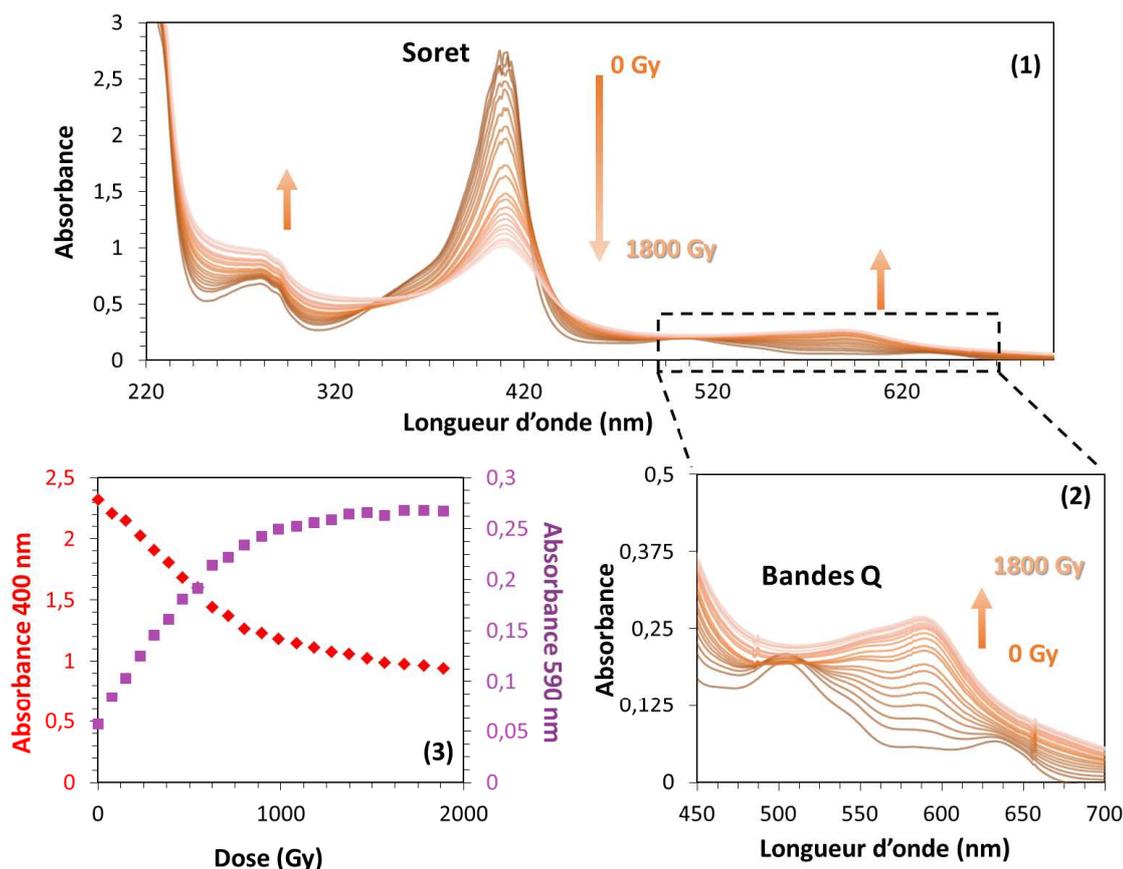


Figure 5-15 : (1) Spectres UV-Visible d'un échantillon de myoglobine à 50 μ M dans l'eau pour des doses allant de 0 à 1800 Gy. (2) Zoom du spectre précédent sur les bandes Q entre 450 et 700nm. (3) Suivi de l'absorbance aux longueurs d'onde 400 et 590nm en fonction de la dose pour la même expérience.

En parallèle, des analyses par HPLC-CAD-MS ont été menées sur colonne C4 afin de détecter une telle espèce. L'analyse se faisant en conditions dénaturantes (>30% d'acétonitrile), on observe pour la solution de myoglobine non irradiée un pic de protéine (7,5min) et un pic distinct correspondant à l'hème (8,5min) révélant la dénaturation de la protéine dans les conditions d'analyse. (Figure 5-16 (1)). Lors des irradiations, une forte diminution du pic d'hème « libre » est alors observée en fonction de la dose (Figure 5-16 (4)). De plus, en suivant l'évolution du signal de masse de la bande correspondant à la protéine (Figure 5-16 (1)), on observe l'apparition d'une nouvelle espèce correspondant à une masse de l'ordre 17 560 Da ($m/Z = 879$, $Z=20$) sous forme de plusieurs pics correspondants à cette forme plusieurs fois oxygénée (multiple de +16) (Figure 5-16 (2)). La masse de cette dernière est cohérente avec un complexe hème-protéine. Le fait que cette association résiste aux conditions dénaturantes de l'analyse semble indiquer un complexe plus fortement lié qu'à l'origine. L'apparition d'un complexe avec une liaison covalente est en accord avec les analyses UV-Visible réalisées. Sur le profil de masse, on observe également le signal correspondant à la protéine non modifiée par l'irradiation mais ayant perdu son hème en condition dénaturante ($m/Z = 848,41$, $Z=20$). Dans le pied de cette bande, on observe un signal pouvant être attribué à la protéine oxygénée avec une masse de +16, celle-ci reste toutefois

très faible. (Figure 5-16 (2)). En intégrant les différentes bandes sur le profil de masse, on peut revenir à une analyse semi-quantitative après normalisation du signal par la somme des signaux de masse du profil et par l'aire relative du pic de protéines en CAD sur chaque échantillon. De cette manière, on observe que l'apparition de l'espèce hème-myoglobine est très corrélée à la disparition de la myoglobine (Figure 5-16 (3)). Toutes ces observations concordent avec l'hypothèse d'un couplage covalent avancé avec les mesures par UV-Visible.

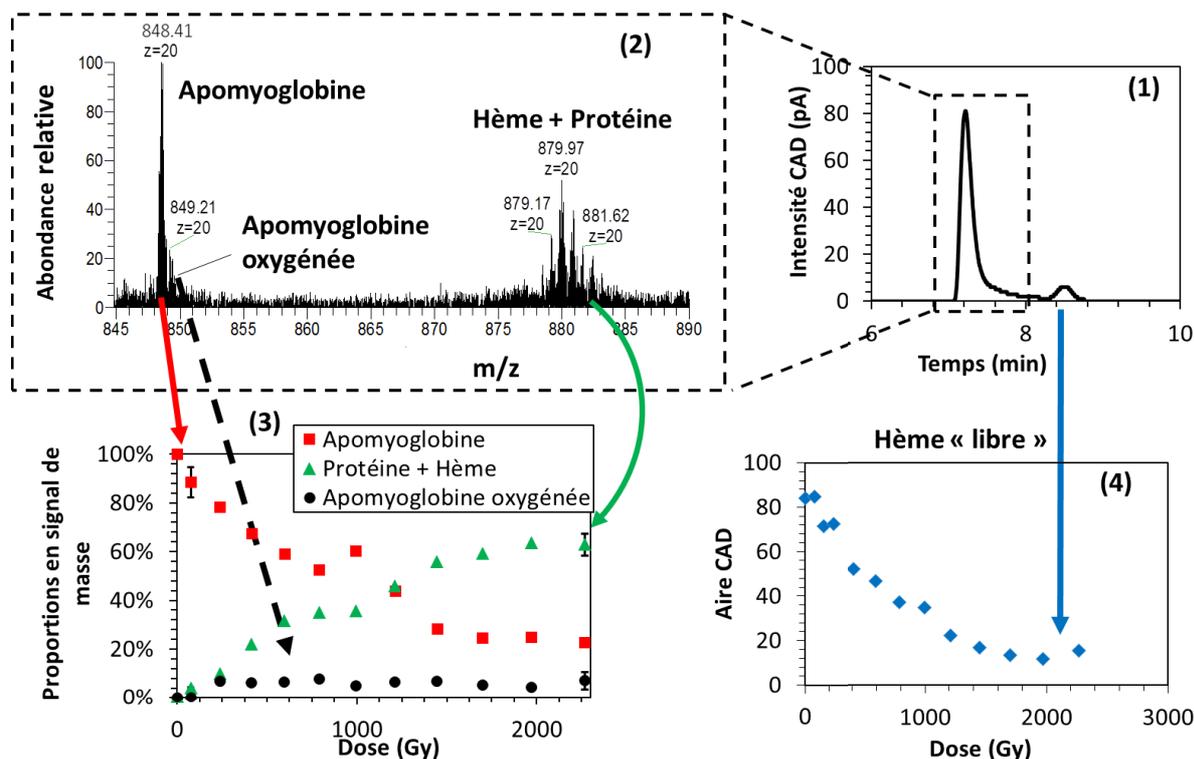


Figure 5-16 : Analyse d'une expérience d'irradiation par des protons de 2 MeV de myoglobine à 50 μ M dans l'eau par HPLC-CAD-MS sur colonne C4. (1) : Chromatogramme comportant le pic correspondant aux espèces de la protéine à 7,5min et la bande de « l'hème libre » à 8,5min en condition dénaturante. (2) : Profil de masse du pic de protéines à l'état de charge 20 contenant l'apomyoglobine, l'apomyoglobine oxygénée et l'espèce hème + protéine avec plusieurs oxydations. (3) : Proportions relatives des signaux de profil de masse normalisées par le signal total en masse et l'aire du CAD du pic de protéines (1). (4) : Intégrale du signal d'hème libre lors de l'analyse C4 par CAD. L'erreur estimée sur les analyses CAD à 1,3%.

Dans la littérature, la formation d'une espèce de ce type est décrite lors de la réaction de la metmyoglobine avec le peroxyde d'hydrogène en milieu acide pour former l'espèce intermédiaire hypervalente Mb(IV) \cdot^{-} =O selon l'équation 5-7 (chapitre 5, I.). Cette dernière est capable de réaliser une liaison pontante entre l'hème et la protéine selon les équations 5-13 à 5-16 pour aboutir à l'espèce couplée. Par l'étude des propriétés d'oxydo-réduction de la myoglobine, cette liaison avait été décrite comme se formant potentiellement avec la tyrosine 103 (Reeder et al., 2002). D'autres études ont mis en cause les histidines 64 ou 93 dans la sphère directe de l'hème pour le couplage (Osawa et al., 1993).

Dans le but de déterminer le ou les résidus impliqués dans le couplage de l'hème sur la protéine, une étude à l'échelle moléculaire a été menée par analyse des peptides de digestion trypsique après irradiation. A partir de cette analyse, une quantification relative des peptides en fonction de la dose a pu être estimée. Lors de l'irradiation de la metmyoglobine, peu de différences ont été observées pour la plupart des peptides après digestion à part pour le peptide YLEFISDAIIHVLHSK (Figure 5-17) dont les proportions relatives diminuent régulièrement avec la dose. Ce peptide est celui comportant la tyrosine 103, ainsi la diminution des quantités obtenues de ce dernier est donc cohérente avec un couplage de l'hème à cette tyrosine comme proposé par Reed et al. Une diminution des quantités obtenues de ce dernier est cohérente avec un couplage de l'hème à la tyrosine 103. Toutefois, l'espèce hème + peptide n'as pas pu être observée lors de ces analyses. On note également une légère diminution du peptide GHHEAELKPLAQSHATK lors de l'irradiation. Celui-ci comporte l'histidine 93, laquelle est directement coordonnée au fer de l'hème dans le complexe de metmyoglobine (Figure 5-3). Il est probable que plusieurs mécanismes de couplage coexistent ce qui expliquerait que ce peptide soit lui aussi impacté. Le peptide HGTVVLTALGGILK comportant l'histidine 64, liée à la molécule d'eau coordonnée au fer de l'hème, ne semble pas modifié au cours de l'irradiation.

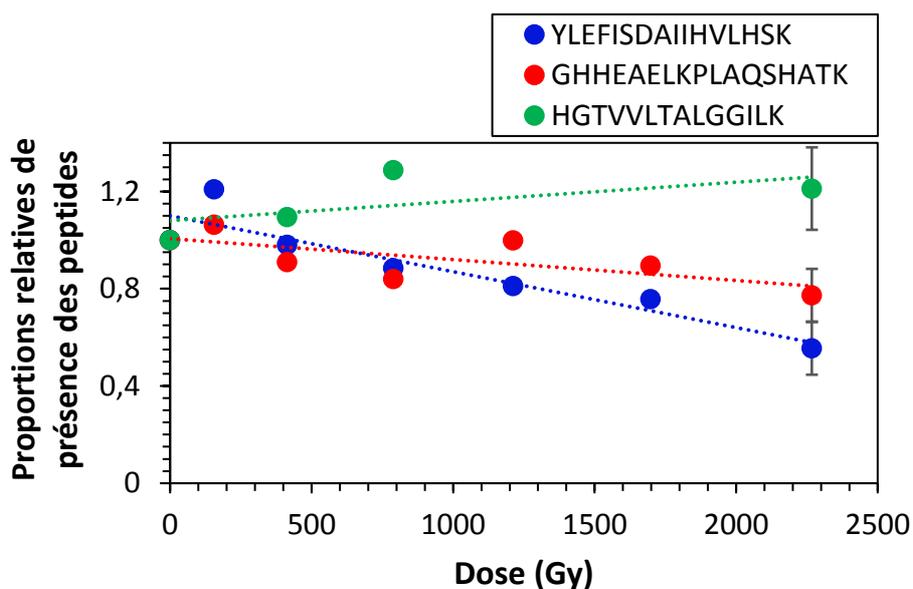


Figure 5-17 : Evolution de la présence des peptides YLEFISDAIIHVLHSK, GHHEAELKPLAQSHATK et HGTVVLTALGGILK lors de la digestion trypsique d'échantillons de myoglobine irradiés à 50 μ M dans l'eau par des protons de 2 MeV.

Au cours de la radiolyse de l'eau, de l'eau oxygénée se forme ce qui pourrait expliquer la formation de ce complexe comme observé dans la littérature. Toutefois, d'autres espèces radicalaires sont aussi présentes en milieu aéré qui sont fortement réactives : le radical hydroxyle et le radical superoxyde. L'ion superoxyde aura plutôt un rôle réducteur pour un ion fer(III) mais une attaque par le radical hydroxyle pourrait également aboutir à la formation d'une espèce radicalaire sur l'hème. On peut imaginer que la formation d'un radical situé sur un carbone alpha de la chaîne

principale ou d'un radical sur une chaîne latérale pourrait faciliter le couplage avec un hème déjà « activé » ($\text{Mb(IV)}^{\bullet+}=\text{O}$). De la même façon, des radicaux formés pourraient également se transférer le long de la protéine vers l'hème pour ensuite conduire au couplage.

c) Perte d'activité de la protéine

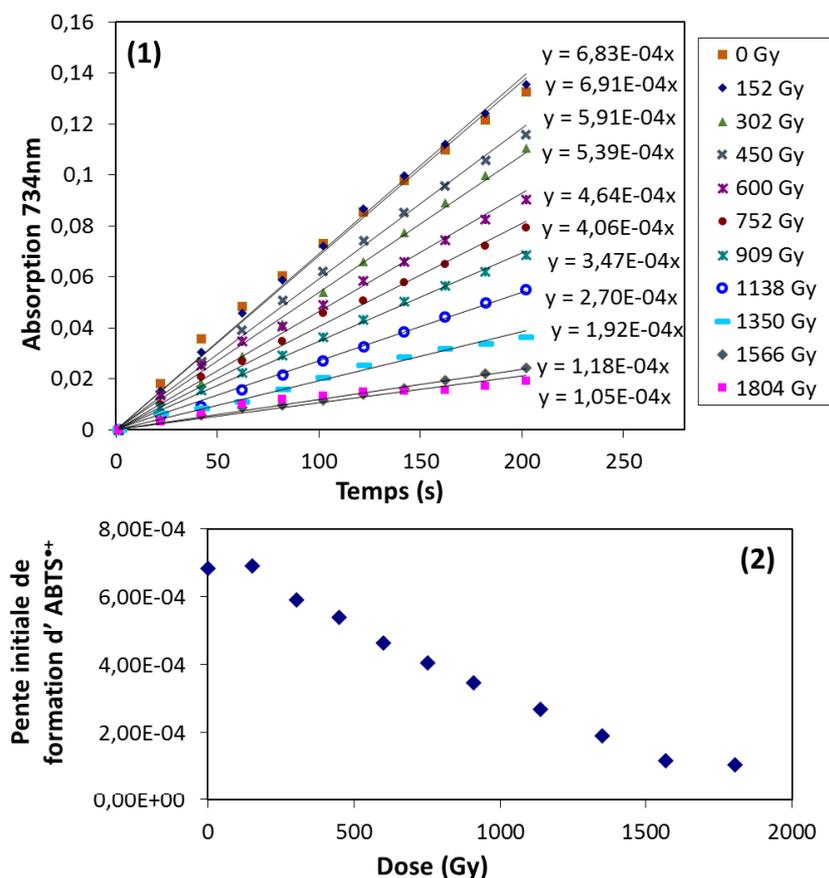


Figure 5-18 : Activité catalytique de la myoglobine après irradiation par des protons de 2 MeV, 50 μM dans l'eau. (1) : Suivi cinétique de la formation de l'ABTS $\bullet+$ en fonction de la dose. (2) : Représentation des pentes initiales en fonction de la dose. L'étude cinétique est réalisée dans les conditions suivantes : myoglobine irradiée diluée 1/10 (5 μM) en présence de 25 μM de H_2O_2 et en milieu tampon phosphate 11 mM à pH 6,8.

Le site actif et la structure d'une enzyme permettent son activité catalytique. La myoglobine possède une faible activité semi-catalytique de type peroxydase en présence d'un cofacteur pour la régénérer (Figure 5-5). Nous avons vu précédemment que l'hème et la structure de la protéine étaient tous deux impactés par l'irradiation avec des ions. Ainsi, il est intéressant d'estimer le pouvoir catalytique de la myoglobine suite à son irradiation. Pour ce faire, l'ABTS a été utilisé comme cofacteur et substrat dans le cycle catalytique pour former l'ABTS $\bullet+$ (HA et A $\bullet+$ dans le cycle catalytique (Figure 5-5)), dont la formation peut être suivie par UV-Visible avec un

maximum secondaire d'absorption à 734nm. La pente initiale de la formation d'ABTS^{•+} est représentée en fonction de la dose et une diminution de l'activité catalytique de la myoglobine est observée lors de l'irradiation (Figure 5-18). Cette perte d'activité est cohérente avec la dégradation de la protéine décrite dans les parties ci-dessus correspondant au couplage de l'hème et à la perte de structure de la protéine.

2) Effets de radiolyse sur la chaîne principale

Les analyses par SDS-PAGE ont permis de s'intéresser au devenir de la chaîne principale de la protéine sous irradiation. En effet, lors de la migration par électrophorèse des échantillons, il est possible de séparer la myoglobine native des espèces créées sous irradiation ayant une masse plus faible, ou plus forte (Figure 5-13). Ainsi, les espèces ayant de plus faibles masses que la protéine sont identifiées comme étant des fragments et les espèces ayant des masses plus fortes comme des multimères. Toutefois, ces bandes ne semblent pas définies, on observe un continuum de masses plus fortes et de masses plus faibles que celles de la protéine. En intégrant ces zones, il est possible d'obtenir des variations relatives de formation de fragments ou de multimères (Figure 5-19).

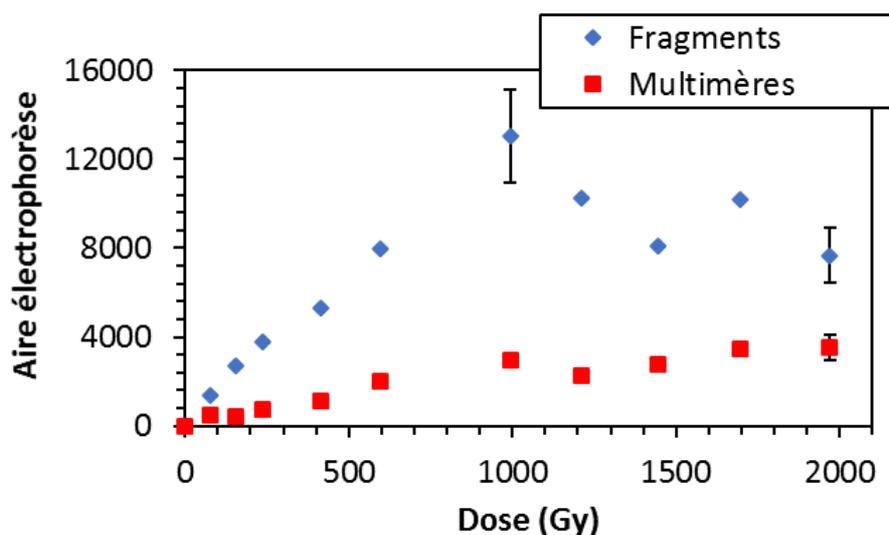


Figure 5-19 : Fragments et multimères résultants de l'intégration sur les profils d'électrophorèse des échantillons de myoglobine à 50µM dans l'eau irradiés par des protons de 2MeV.

Une production majoritaire de fragments est observée face aux multimères sous irradiation par des protons de 2 MeV en condition oxygénée (Figure 5-19)). Il semble également qu'on observe une perte de linéarité sur la production des fragments aux doses les plus fortes alors que la multimérisation continue de croître. Il n'a pas été possible d'identifier les fragments ou les multimères car leur masse est soit aléatoire, soit mal définie en électrophorèse. Concernant les

multimères, une seule masse est bien définie, il s'agit des dimères d'environ 35kDa. L'observation de masses intermédiaires entre celles des dimères et de la protéine laisse penser à une agrégation des fragments formés ou à la formation d'espèces de type fragment-protéine.

Des nouveaux signaux apparaissant avec l'irradiation à de faibles temps d'éluion ont été repérés lors de l'analyse par HPLC sur colonne C4 (2,5-2,7min et 3-4min 4, Figure 5-20). Lors de l'analyse de ces bandes par spectrométrie de masse, on observe un continuum de pics qui apparait entre des m/Z de 600 à 1000. Certaines masses se détachent (759,36 ; 844,41 ; 893,68, ...) mais la plupart ne sont pas mesurables. Une éluion à temps faible et la présence de masses relativement faibles correspondent à la formation de fragments. Ces analyses couplées à la SDS-PAGE ne laissent pas penser à la formation de fragments définis lors de l'irradiation à la différence de ce qui avait été avancé dans la littérature sous radiolyse gamma par Puchala et Schuessler en 1995. Toutefois, on peut émettre des doutes quant à l'identification des fragments qui avait été faite à partir de mesures SDS-PAGE également sur des bandes mal définies. En revanche, la formation préférentielle de fragments à celle de multimères en milieu aéré qui a été observée dans la même étude est en accord avec les mesures qui avaient été réalisées sous irradiation gamma (Figure 5-7.). De plus, les équations de réaction de la chaîne principale avec le radical hydroxyle (1-40 à 1-46) expliquent également cette formation en milieu oxygéné.

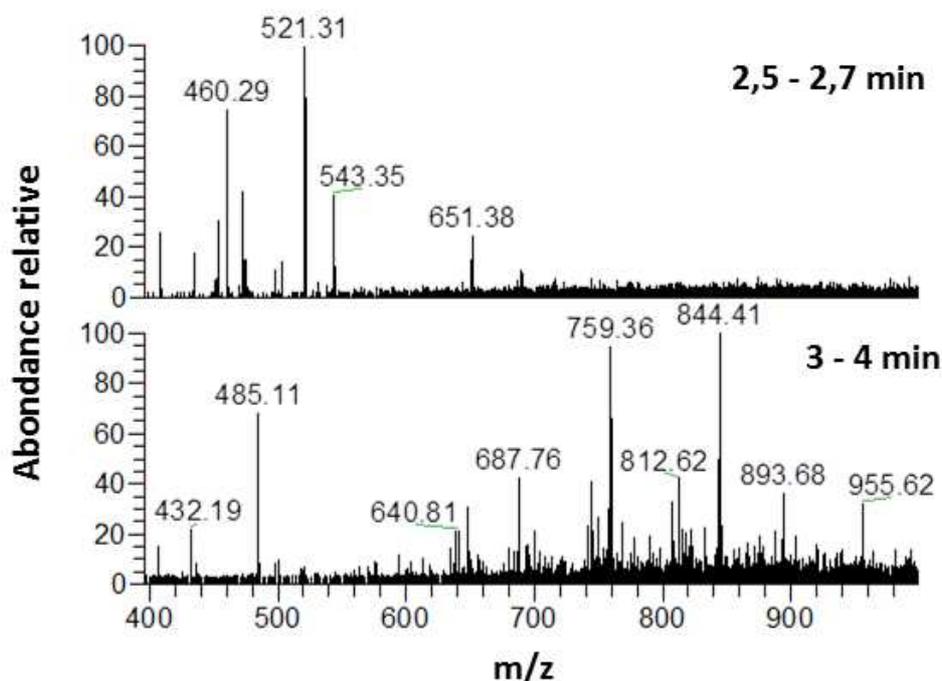


Figure 5-20 : Analyse de masse des bandes apparaissant avec l'irradiation de 2,5 à 2,7min et 3 à 4 min pour l'irradiation de myoglobine avec des protons de 2 MeV dans l'eau.

3) Effets de la radiolyse sur les chaînes latérales

Les analyses par HPLC sur colonne C4 ont révélé qu'il y avait peu de protéines oxygénées, le signal est proche de la limite de détection (Figure 5-16). De plus, lors de l'analyse des peptides après digestion, on ne détecte aucune modification chimique et peu de variations dans les quantités des peptides obtenus. Ces résultats semblent indiquer que l'irradiation de la myoglobine diluée dans l'eau a pour principal effet les modifications observées au niveau de l'hème, vraisemblablement par couplage covalent. Un tel résultat est surprenant étant donné le peu de sélectivité d'un radical tel que HO•. Des phénomènes de transfert radicalaire dans la protéine vers l'hème pourraient intervenir. D'autre part, l'eau oxygénée, moins réactive et dont il est connu qu'elle peut mener à un couplage hème-protéine, pourrait être la principale responsable des dégâts observés. L'irradiation de l'apomyoglobine semble alors nécessaire pour bien comprendre ces phénomènes.

4) Effets de l'hème : irradiation de l'apomyoglobine

Afin d'explorer l'effet de l'hème sur la radiolyse de la myoglobine, l'apomyoglobine a été irradiée dans les mêmes conditions et les solutions ont été analysées de manière identique. En l'absence de l'hème, la structure de l'apomyoglobine devient plus « flexible » et sa conformation change légèrement pour obtenir 58% de structures alpha (Figure 5-10 (3)). Sous l'effet de la radiolyse par des protons de 2 MeV, une diminution du pourcentage d'hélices alpha est observée dans des proportions similaires à celle de la myoglobine Figure 5-21).

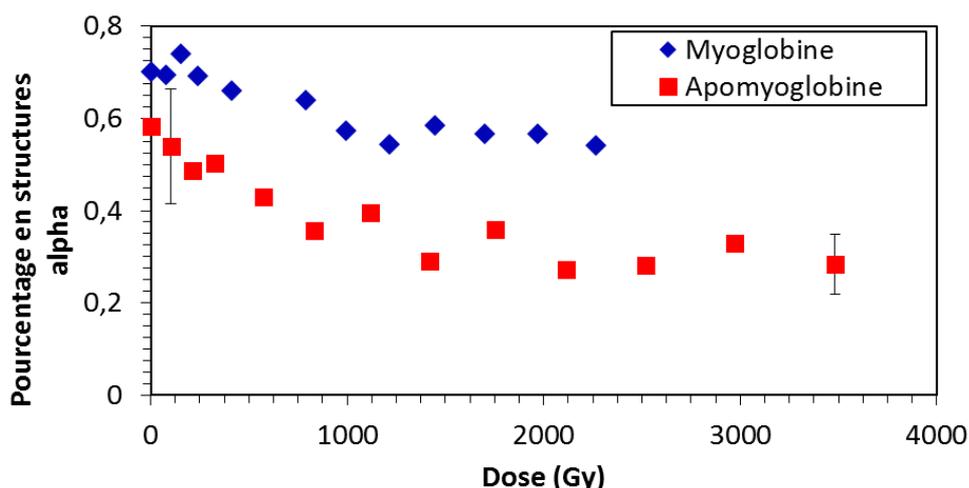


Figure 5-21 : Comparaison des structures secondaires mesurées par dichroïsme circulaire des protéines lors de la radiolyse de l'apomyoglobine et de la myoglobine à 50 μ M dans l'eau par des protons de 2 MeV. Erreur d'après les différentes déconvolutions possibles, 1,5% dans le cas de la myoglobine et 23% dans le cas de l'apomyoglobine.

Les analyses par SDS-PAGE indiquent la formation de fragments comme pour la myoglobine. Lorsque l'on compare la formation de ces fragments avec la dose à celle de la myoglobine, on observe une évolution similaire jusqu'à environ 1000 Gy. Dans le cas de l'apomyoglobine, il semble que la fragmentation se poursuit à forte dose, quand celle de la myoglobine semble avoir atteint un plateau.

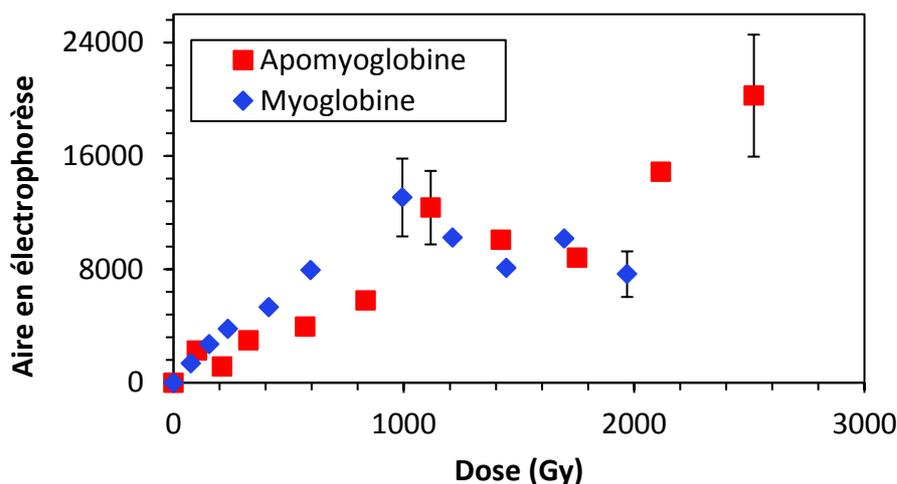


Figure 5-22 : Comparaison de production relative de fragments par intégration des profils de masse obtenue par SDS-PAGE lors de la radiolyse de l'apomyoglobine et de la myoglobine à 50 μ M dans l'eau par des protons de 2 MeV.

Nous avons vu précédemment que lors de l'irradiation de la myoglobine, le principal mécanisme de dégradation était la formation d'une liaison pontante entre l'hème et la protéine (Figure 5-16 (3)). L'absence de l'hème pour l'apomyoglobine rend bien entendu ce mécanisme impossible. Lors des mesures par HPLC-CAD-MS sur colonne C4, on observe une forte diminution des proportions en apomyoglobine native en signal de masse pour obtenir une valeur quasi-nulle après environ 1200 Gy. Simultanément, on observe l'apparition de masses intenses correspondant à l'apomyoglobine oxygénée une, deux ou trois fois. La forme mono-oxygénée semble être formée dans un premier temps, puis est convertie en formes ayant des oxygénations multiples. Si l'on considère que ces espèces ont toutes la même ionisation en masse, on retrouve environ 50% du signal d'apomyoglobine dans la somme des formes oxygénées de l'apomyoglobine. Lors des irradiations de la myoglobine, plus de 60% des quantités initiales en protéine étaient converties en espèce couplée à l'hème. Il semble ainsi que la présence de l'hème modifie drastiquement la radiolyse de la myoglobine puisqu'en présence de celui-ci, la myoglobine subit beaucoup moins d'oxygénation qu'en son absence. Un tel effet a également pu être mis en évidence lors d'irradiation gamma de l'hémoglobine (Rafiei et al., 2017). Dans ce cas, les dégâts à l'hème aboutissent à l'éjection de l'hème.

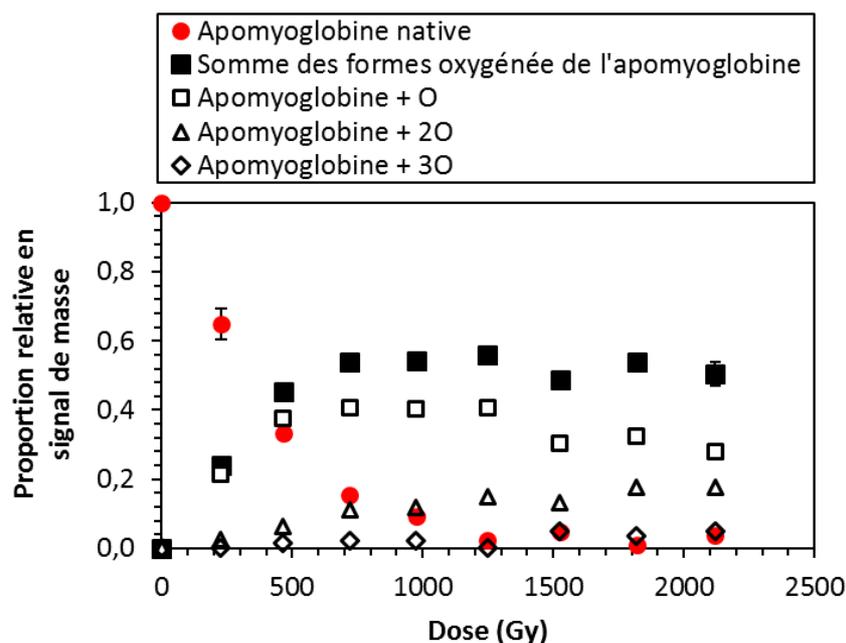


Figure 5-23 : Dégâts sur l'apomyoglobine mesurés sur les profils de masse lors d'analyses HPLC-CAD-MS sur colonne C4 d'échantillons irradiés. Protéines à 50µM dans l'eau, irradiées par des protons de 2 MeV.

Afin de comprendre la différence entre les mécanismes décrits ci-dessus à l'échelle moléculaire, l'analyse des peptides de digestion a été effectuée lors des irradiations de l'apomyoglobine. Les trois peptides pour lesquels nous nous étions intéressés lors de l'irradiation de myoglobine, YLEFISDAIIHVLHSK, GHHEAELKPLAQSHATK et HGTVVLTALGGILK, ne semblent pas évoluer dans le cas de l'apomyoglobine (Figure 5-24 (1)). Les deux premiers avaient été identifiés comme potentiel point d'accroche de la liaison pontante entre l'hème et la protéine, le troisième contient l'histidine 93 coordonnée à l'hème. En revanche, d'autres peptides semblent fortement impactés par l'irradiation. On observe une forte décroissance des proportions relatives des peptides TEAMK, HPGDFGADAQGAMTK et GLSDGEWQQVLNVWGK pour aller même jusqu'à la disparition de TEAMK (Figure 5-24 (2)). En s'intéressant de plus près à la composition de ces peptides, on remarque qu'ils contiennent les deux méthionines de la protéine (TEAMK et HPGDFGADAQGAMTK) ainsi que les deux tryptophanes de la protéine (GLSDGEWQQVLNVWGK). Le tryptophane et la méthionine étant connus pour être particulièrement sensibles au radical hydroxyle. En parallèle, il a été possible d'observer l'apparition de deux nouveaux pics sur les chromatogrammes après digestion, qui ont pu être identifiés par spectrométrie de masse comme des probables oxygénations des peptides HPGDFGADAQGAMTK et GLSDGEWQQVLNVWGK (Figure 5-24 (3)). Ces espèces éluent plus rapidement que les peptides natifs sur phase inverse ce qui est cohérent avec des formes plus polaires. La MS² a permis d'identifier que l'oxydation du peptide HPGDFGADAQGAMTK + O se situe sur la partie GAMTK en adéquation avec une oxydation de la méthionine. De même, une masse relative à TEAMK + 16 a également pu être mise en évidence mais non quantifiée car la bande co-élue dans un autre signal. S'il s'agit alors d'oxygénation spécifique de ces deux

acides aminés, les mécanismes les plus probables seraient la formation d'une fonction sulfoxyde dans le cas des méthionines (Tableau 1-4 p54) et d'une hydroxylation des cycles du tryptophane par réaction avec le radical hydroxyle (Figure 4-29 p157)

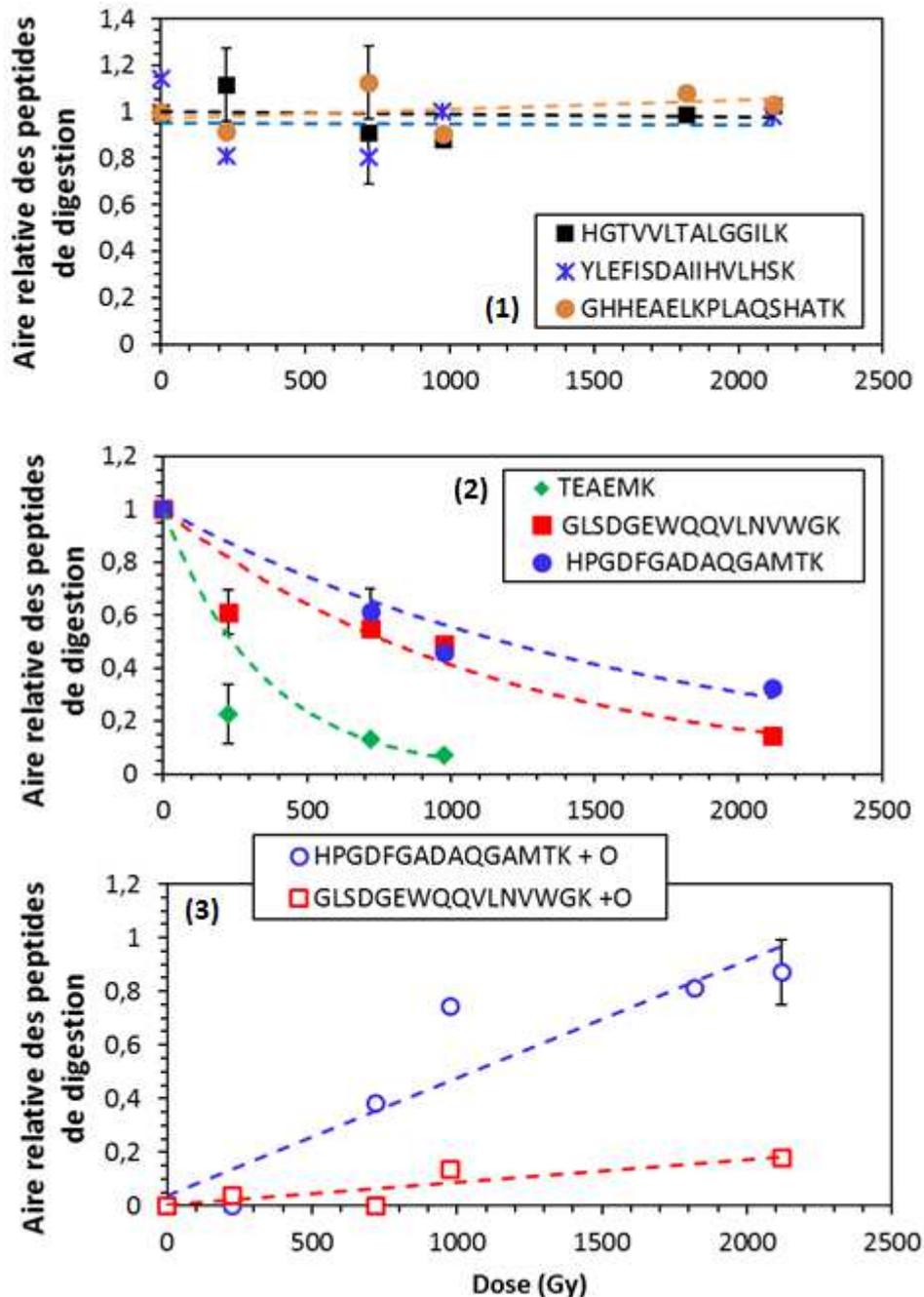


Figure 5-24 : Evolution de la présence de peptides lors de digestion tryptique de l'apomyoglobine irradiée à 50µM dans l'eau par des protons de 2 MeV. (1) : YLEFISDAIHHVLHVK, GHHEAELKPLAQSHATK et HGTVVLTALGGILK. (2) : TEAMK, HPGDFGADAQGAMTK et GLSDGEWQQVLNVWGK. (3) : Des peptides pouvant correspondre aux formes oxydées de HPGDFGADAQGAMTK et GLSDGEWQQVLNVWGK.

Les dégâts observés aux acides aminés de la protéine sont vraisemblablement causés par une attaque du radical hydroxyle sur celle-ci. Ceci laisse penser que ce radical aurait également un rôle dans le couplage hème protéine dans le cas de l'irradiation de la myoglobine. En effet, si uniquement l'eau oxygénée avait un rôle sur ce couplage, les méthionines et les tryptophanes de la myoglobine seraient également impactés sous irradiation de la myoglobine, ce qui ne semble pas être le cas.

D. Effets de la nature de la particule

1) Effets de TEL

Les irradiations de myoglobine et d'apomyoglobine ont été réalisées dans l'eau avec des ions carbone de 43,8 MeV et ont été comparées aux résultats obtenus lors des irradiations avec des protons de 2 MeV présentées précédemment. L'analyse des structures secondaires des protéines montre des résultats très similaires (Figure 5-25). En effet, aucune différence n'est observée entre les deux types de particules et ceci pour les deux protéines. On retrouve également avec les ions carbone pour les irradiations d'apomyoglobine, le palier correspondant à environ 1000 Gy. Aucun effet de TEL n'est visible sur ces mesures.

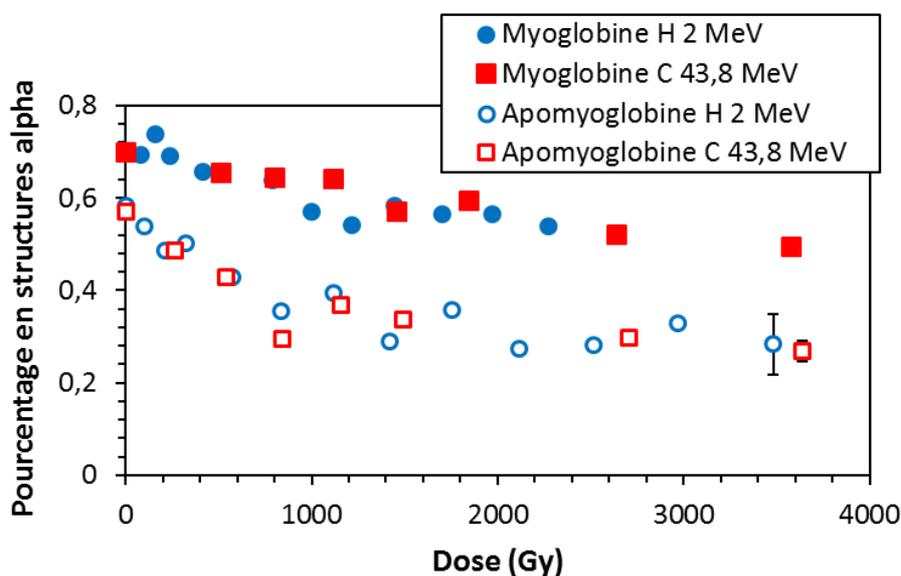


Figure 5-25 : Comparaison des structures secondaires mesurées par dichroïsme circulaire des protéines lors de la radiolyse de l'apomyoglobine et de la myoglobine à 50 μ M dans l'eau par des protons de 2 MeV et ions carbone de 43,8 MeV. Les erreurs estimées sur les irradiations de myoglobine sont de 1,5% et 2% pour les protons et les ions carbone.

Dans le même esprit, des analyses par HPLC sur colonne C4 de ces échantillons ont été menées (Figure 5-26). La production de l'espèce couplée hème-protéine est suivie pour l'irradiation de la

myoglobine. Lors des irradiations d'apomyoglobine, c'est son oxygénation qui est suivie. A nouveau, les résultats sont très similaires entre les deux types de particules. On observe de légères différences mais qui ne permettent pas de conclure sur un net effet de TEL.

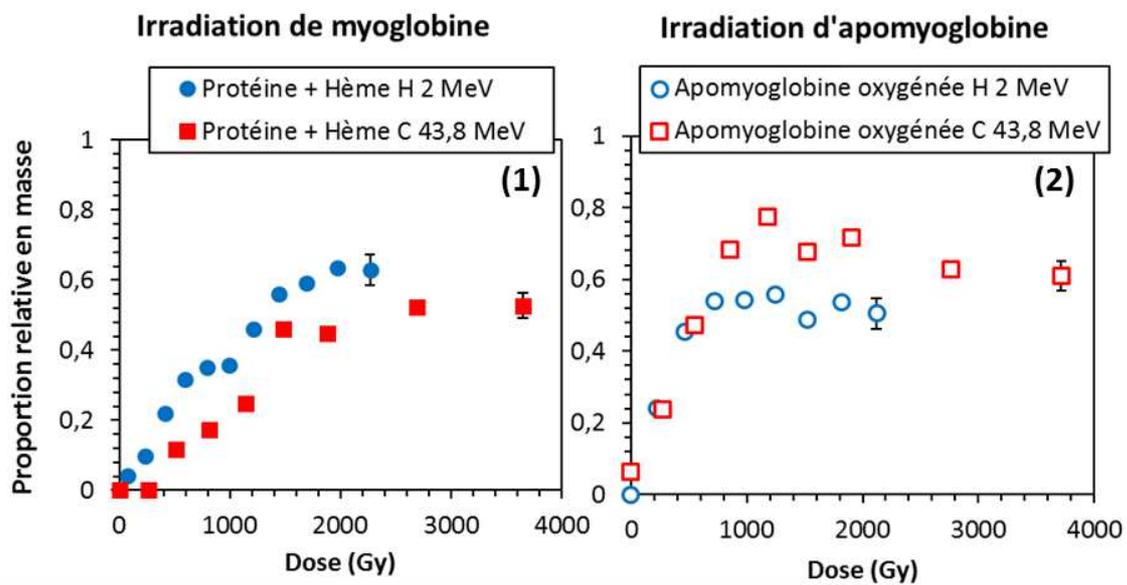


Figure 5-26 : Comparaison des analyses HPLC-CAD-MS sur colonne C4 lors d'irradiations par des protons de 2 MeV et des ions carbone de 43,8 MeV de myoglobine et d'apomyoglobine dans l'eau à 50µM. (1) : Production de l'espèce protéine-hème couplée lors d'irradiations de myoglobine. (2) : Production d'apomyoglobine oxygénée lors d'irradiations d'apomyoglobine.

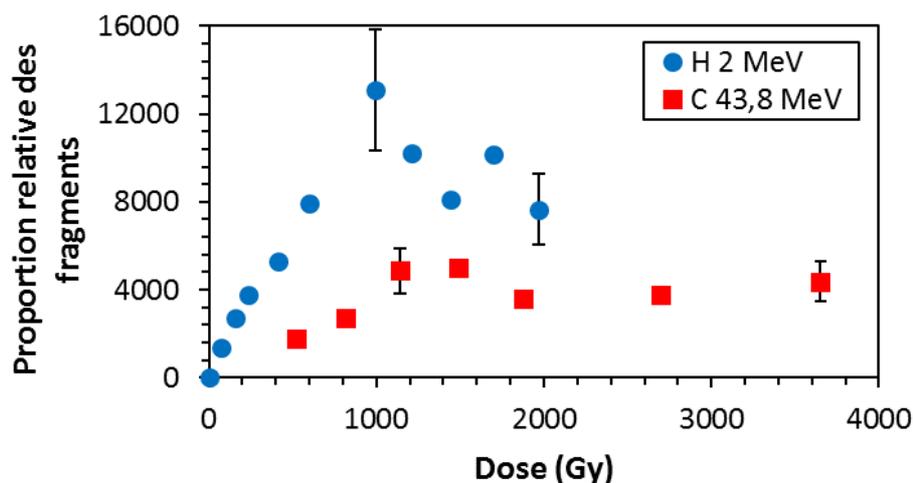


Figure 5-27 : Comparaison de production relative de fragments par SDS-PAGE pour l'irradiation de la myoglobine à 50 µM dans l'eau par des protons de 2 MeV et ions carbone de 43,8 MeV.

Les irradiations de myoglobine sous irradiation par ces deux particules ont également été analysées par SDS-PAGE et les proportions relatives de fragments ont été quantifiées (Figure 5-27). Une production de fragments plus forte et plus rapide avec la dose est observée avec des protons, donc à faible TEL.

De manière étonnante, peu de différences ont été observées lors des irradiations de la myoglobine et de l'apomyoglobine en solution diluée dans l'eau à des concentrations de 50 μ M entre les protons et les ions carbone. Les ions carbone d'énergie 43,8 MeV ont des TEL moyens de 530 eV/nm et les protons de 2 MeV ont des TEL moyens de 26 eV/nm dans l'eau. Il a été vu précédemment que la radiolyse de l'eau est bien différente pour ces deux types de rayonnements, notamment au travers des rendements de production du radical hydroxyle (chapitre 3) mais également de l'eau oxygénée. Toutefois, ces différences se reflètent uniquement sur la production de fragments de myoglobine. Aucune différence notable n'a été mesurée sur la modification de la structure secondaire ou les réactions de couplage de la myoglobine ou d'oxygénation de l'apomyoglobine.

2) Effets de charge sur la radiolyse

Des irradiations sous faisceau d'ions carbonés de hautes énergies ont également été menées. Ces ions ont des TEL proches des protons de basses énergies ce qui rend la comparaison très intéressante (Figure 5-28).

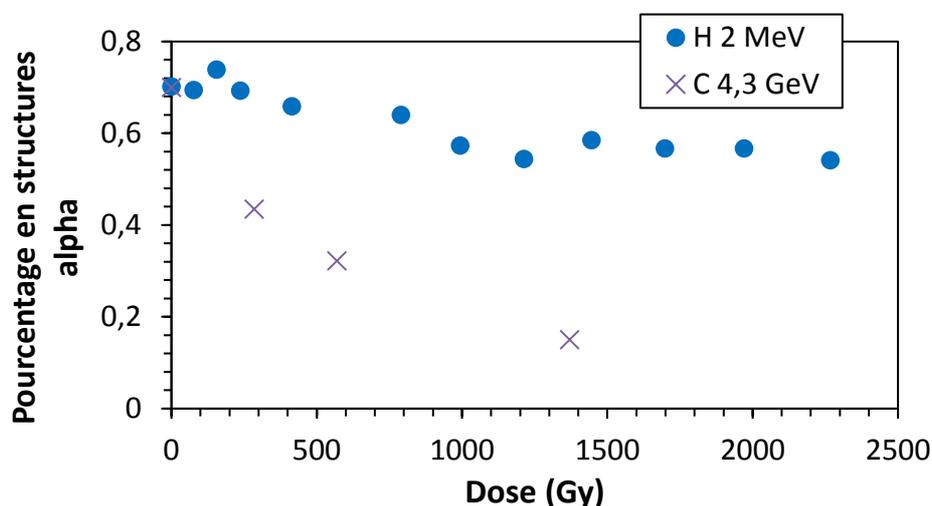


Figure 5-28 : Evolution des proportions des structures alpha dans la structure secondaire de la myoglobine mesurées sous irradiation par des ions de basses et de hautes énergies. Myoglobine dans l'eau à 50 μ M. Erreur estimée à 1,5% pour les protons et 3% pour les ions carbone.

Les structures secondaires des échantillons irradiés ont été analysées et on observe une modification beaucoup plus forte de la protéine avec les ions carbone de 4,3 GeV. Des tendances

similaires ont pu être observées avec les autres techniques d'analyse (production de l'espèce couplée, fragmentation...). De telles modifications laissent penser à une forte influence des électrons secondaires énergétiques produits lors de la radiolyse avec des ions de hautes énergies. Ces différences sont en accord avec les modifications attendues par rapport à la création de radicaux tel le radical hydroxyle lors de la radiolyse de l'eau. Cette observation est d'autant plus étonnante qu'aucun effet de TEL n'a pu être observé pour les ions de basses énergies. Ainsi, il semble que des mécanismes complexes soient à l'œuvre pour ces modifications qui ne peuvent s'expliquer avec une simple dépendance au TEL. Une étude plus approfondie devra être menée pour élucider l'origine exacte de ces modifications.

E. Radiolyse de la myoglobine en tampon phosphate

Les études précédentes ont toutes été réalisées dans l'eau, l'apomyoglobine précipitant en milieu tampon phosphate. Le pH de départ et le pH final ont été mesurés au cours de plusieurs irradiations, il passe d'une valeur initiale d'environ 6,5, à une valeur de 6 à 5,5 au plus bas, la myoglobine restant stable en solution jusqu'à un pH de 5. D'après Puchala et Schuessler, les résultats obtenus sous irradiation par des rayons gamma sont quasiment identiques à pH 7 et 5 (Figure 5-7). Ainsi, on aurait pu s'attendre à des résultats similaires entre l'irradiation de la myoglobine dans l'eau ou dans le tampon phosphate et pourtant, des différences ont été observées. Tous les phénomènes décrits précédemment sont observés en milieu tamponné, mais évoluent plus lentement avec la dose. C'est-à-dire qu'une dose plus forte est nécessaire pour atteindre les mêmes dégâts en milieu tampon phosphate. Ce dernier est connu pour être inerte à la radiolyse et il est peu probable qu'il joue un rôle autre que d'imposer le pH de la solution. Une étude de 2006 met l'accent sur l'influence de H_3O^+ produit par radiolyse sur la dégradation des biomolécules en solution (Byakov and Stepanov, 2006). Les auteurs proposent même que celle-ci constituerait l'élément principal de dégradation des protéines lors de la radiolyse en solution. Ce constat ne semble pas cohérent avec nos mesures car il a été observé des mécanismes propres à la production d'espèces faisant certainement intervenir le radical hydroxyle ou le peroxyde d'hydrogène. En revanche, une acidification locale dans la trace pourrait être responsable d'une partie de ces différences. Il n'est pas impossible que des concentrations locales en H_3O^+ puissent influencer les modifications sur la protéine en la dénaturant en partie. La protéine pourrait alors devenir plus sensible à l'irradiation au travers des phénomènes de radiolyse décrits précédemment. De plus, l'efficacité des phénomènes intervenant au niveau de l'hème, notamment concernant sa réaction avec l'eau oxygénée, varie également fortement avec le pH.

F. Conclusion intermédiaire

Cette étude des effets indirects de radiolyse sur la myoglobine a permis d'identifier les principaux phénomènes conduisant à la dégradation de la protéine. Les principaux marqueurs de la radiolyse semblent être les suivants :

- La modification de la structure secondaire de la myoglobine correspondant à une diminution des proportions d'hélices alpha allant de pair avec la formation de structures béta et de la désorganisation de la protéine dans des proportions similaires. Les modifications de structures sont relativement du même ordre également dans l'apomyoglobine, donc en l'absence de l'hème.
- La radiolyse de la myoglobine a pour principal effet une dégradation du site autour de l'hème par la formation d'une espèce couplée. Une liaison pontante avec l'hème serait réalisée à partir de la tyrosine 103 ou de l'histidine 93. Celle-ci engendre également une perte de l'activité pseudoperoxydase de la myoglobine.
- En l'absence d'hème, des oxygénations importantes des méthionines et des tryptophanes de la protéine sont observées. L'hème semble donc jouer un rôle protecteur vis-à-vis des chaînes latérales de la protéine.
- La fragmentation de la chaîne principale de la myoglobine, vraisemblablement par attaque du radical hydroxyle, ne semble pas être influencée par l'hème.

Il a également été observé qu'une dose d'environ 1000 Gy semble être une valeur charnière pour plusieurs phénomènes observés indépendamment du type d'ion : modification de la structure secondaire, modification de la structure de l'hème ou encore la production de fragments.

En faisant varier la nature et le type de particule lors de l'irradiation de la protéine, aucune différence majeure n'a été observée entre l'irradiation par des protons ou par des ions carbone de basses énergies. En revanche, des effets de radiolyse beaucoup plus forts ont été mis en évidence lors de l'irradiation avec des ions carbone de hautes énergies. Ce constat suggère des mécanismes complexes à l'œuvre, qu'une dépendance simple au TEL ne permet pas d'expliquer. Il n'est pas à exclure que l'acidité locale produite dans la trace d'un ion puisse favoriser les modifications observées. Des études complémentaires sur ces dépendances devront être réalisées pour une bonne compréhension des phénomènes en jeu sur ce système.

III. Etude des effets directs de l'irradiation de la myoglobine

Dans cette partie, une étude des effets directs de radiolyse de la myoglobine par des ions sera réalisée en milieu hydraté. L'hydratation est essentielle pour garder une structure native de la protéine, mais ces conditions impliquent un mélange entre d'importants effets directs et des effets indirects.

La nécessité d'avoir des échantillons de quelques microns d'épaisseur pour une irradiation et une analyse dans de bonnes conditions, associée à des expériences réalisées à la verticale, nous ont poussé à développer des gels hydratés de protéines, stables et calibrés en épaisseur. Ainsi, le glutaraldéhyde, un agent réticulant, a été utilisé pour réaliser ces hydrogels. L'analyse des gels irradiés se fait principalement par spectrométrie infrarouge.

A. Développement des gels et caractérisation

1) Produits chimiques utilisés

Les produits chimiques utilisés sont listés dans le Tableau 5-4. La myoglobine est purifiée par dialyse puis concentrée avant irradiation. Les autres produits sont utilisés sans traitement ou purification supplémentaire.

Tableau 5-4 : Produits chimiques utilisés pour les expériences de radiolyse de myoglobine en solution diluée. Une activité enzymatique en units/mg correspond à un substrat converti en $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$; (w/w) est un rapport de masse.

No. CAS	Produit chimique	Pureté	Fournisseur
100684-32-0	Myoglobine (cœur de cheval)	$\geq 90\%$	Sigma-Aldrich
7789-20-0	D ₂ O	$\geq 99,9\%$ deutéré	Sigma-Aldrich
111-30-8	Glutaraldéhyde	50% dans H ₂ O (w/w)	TCI
7440-37-1	Argon	Alphagaz 1, <2ppm O ₂	Air liquide
9003-07-0	Polypropylène (5 μm)	non spécifié	SPEX SamplePrep

2) Préparation de solutions de protéines très concentrées

Pour réaliser des gels hydratés, il est nécessaire d'utiliser des solutions très concentrées de myoglobine de l'ordre de 30% en masse. Pour obtenir des solutions à de telles concentrations bien dissoutes et homogènes, il est nécessaire de les reconcentrer à partir d'une solution à plus faible teneur en protéine. Ces solutions sont réalisées dans D₂O. Le solvant deutéré est indispensable pour éliminer la bande d'absorption en infra-rouge de l'eau hydrogénée vers 1650 cm^{-1} .

Autrement, cette bande recouvre le signal de la bande amide I de la protéine, utilisée pour la détermination des structures secondaires. De même, cette préparation s'accompagne d'une purification par dialyse également dans D₂O.

Les solutions concentrées de myoglobine ayant une bonne conservation et les pertes associées à la fabrication des solutions étant conséquentes dans les récipients en raison des fortes concentrations, il est préférable de préparer une grosse quantité d'échantillons pour pouvoir réaliser plusieurs séries d'expériences relativement rapprochées. Un gel nécessite 5 à 10µL de solution concentrée, c'est pourquoi généralement 100µL de solution sont préparés. 30mg de protéines sont d'abord dissous dans D₂O pour réaliser une solution plus faiblement concentrée, typiquement de l'ordre de 5%, soit environ 600µL. Les solutions sont dialysées avec des membranes de dialyse en cellulose de type BioDesign Dialysis Tubing de la société Fisher avec un seuil de coupure à 8000 Da. En raison des faibles volumes, une seringue à l'embout coupé et refermé avec la membrane peut être utilisée. La solution est dialysée trois fois contre 2 mL de D₂O à 4°C suivant un protocole du type 4h, puis 4h, puis pendant la nuit.

Une fois la dialyse terminée, les solutions sont récupérées et centrifugées pendant 10min à 9000 tours/min. De cette manière, les protéines mal dissoutes et/ou agrégées sont éliminées en récupérant le surnageant.

Ensuite, les échantillons sont placés dans des centricons (reconcentration par centrifugation, seuil de coupure 10 kDa) afin de procéder à la reconcentration pour obtenir des solutions de l'ordre de 30%. 30min à 1h à 9000 tours/min sont nécessaires pour éliminer la plus grande partie de l'eau deutérée. Une analyse UV est réalisée pour vérifier la concentration de la solution. Une partie de la solution est diluée pour obtenir 3mL à environ 10µM de protéines. Connaissant l'absorbance de la myoglobine à 280nm ($\epsilon_{280} = 26051 \text{ mol/L/cm}$), la concentration est calculée. Une concentration de l'ordre de 25 à 30% est jugée satisfaisante.

Des essais ont également été réalisés avec l'apomyoglobine. Malheureusement, cette dernière se dénature à forte concentration conservant moins de 30% d'hélices alpha ce qui n'est pas satisfaisant pour réaliser des expériences dans de bonnes conditions.

3) Fabrication des gels

Pour réaliser les gels hydratés les plus purs en protéines, le glutaraldéhyde a été utilisé comme agent réticulant. Ce dernier est bien connu pour réagir avec les amines et donc les lysines des protéines afin de former des liaisons imines pontantes (base de Schiff) grâce à ses deux fonctions aldéhydes selon les équations 5-19 et 5-20 (Migneault et al., 2004). Du glutaraldéhyde commercial à 50% dans l'eau est utilisé, ce dernier est source d'hydrogène dans nos gels mais ne devrait pas impacter outre mesure les spectres en raison des faibles quantités finales utilisées. Le glutaraldéhyde est ramené à 2% par dilution dans D₂O.

Sous agitation, environ 3µL de glutaraldéhyde à 2% sont ajoutés à 10µL de myoglobine à 30%. Les proportions de glutaraldéhyde par rapport à la protéine dans les gels sont de 1/50 en masse

et 3,5/1 en mol pour une teneur d'environ 23% en protéine, 76,5% en eau et 0,5% en glutaraldéhyde. L'eau reste donc l'élément majoritaire avant la protéine. De même, en raison de sa faible teneur, on peut négliger l'impact de l'agent réticulant sur la radiolyse. Les conditions sont légèrement variables entre chaque solution utilisée, certainement en raison des concentrations de chaque solution. Lorsque le mélange est réalisé dans de bonnes conditions, la gélification a lieu après quelques minutes, ce qui laisse le temps de le manipuler. Le délai de quelques minutes permet le dépôt de la solution alors très visqueuse entre deux feuilles de polypropylène de 5µm d'épaisseur. Ces dernières sont espacées par des cales de clinquant de 5µm d'épaisseur. Le montage en sandwich est alors pressé afin de former un gel d'épaisseur contrôlée de 5µm entre deux feuilles de polypropylène. Ce polymère a été choisi pour sa transparence en UV-Visible et sa transparence en infra-rouge dans la zone de la bande amide I.

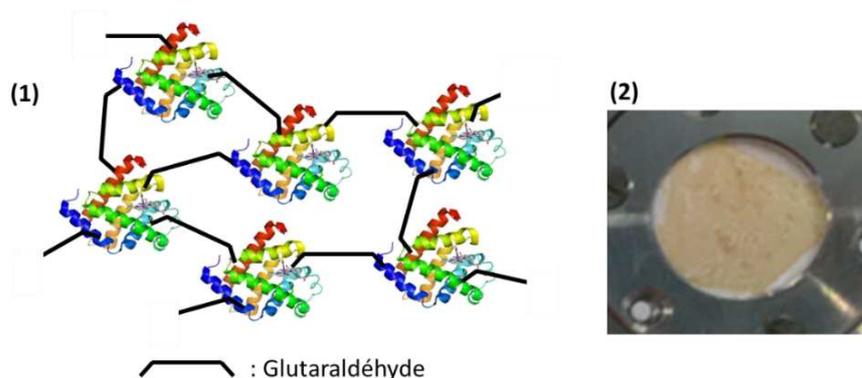
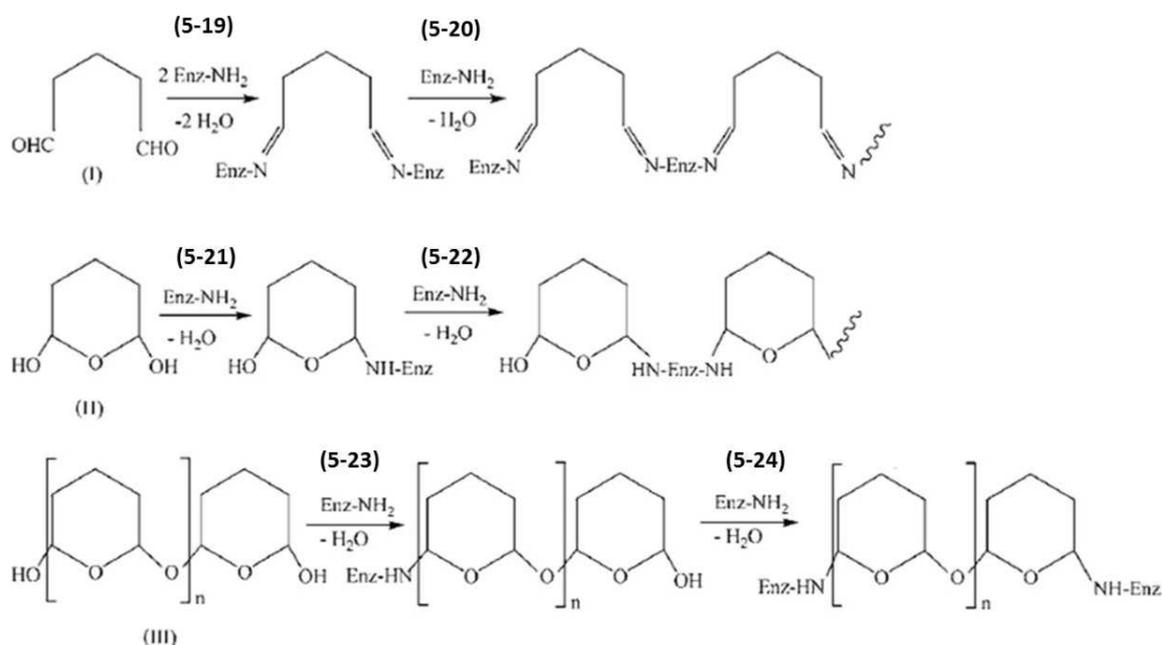


Figure 5-29 : Schéma représentatif de la structure d'un gel (1) et photo d'un gel de myoglobine (2)



Équations 5-19 à 5-21 : Equations de réactions entre une protéine et le glutaraldéhyde selon ses différentes formes en solution neutre ou acide. Dans cette étude, Enz-NH₂ correspond aux résidus lysines de la myoglobine. Figure adaptée d'après (Migneault et al., 2004).

A pH inférieur à 7, il va avoir tendance à former un hémiacétal cyclique ou des polymères de même nature (II) et (III), équations 5-21 et 5-23. Le pH n'est pas contrôlable dans nos conditions pour ne pas influencer la radiolyse des gels. Ainsi, lors de la gélification, des imines (équation 5-19 à 5-20) ou des amines secondaires (équations 5-21 à 5-24) seront formées.

La redissolution des protéines après irradiation n'est pas possible, certainement en raison de la réticulation pouvant avoir lieu sous irradiation. Ainsi, les seules analyses mises en œuvre sont des spectroscopies optiques, l'UV-Visible et principalement la spectroscopie infra-rouge.

4) Analyses UV-Visible

L'utilisation du polypropylène comme support et la faible épaisseur du gel de myoglobine permettent la réalisation de spectres UV-Visible dans de bonnes conditions. A l'heure actuelle, il n'est pas possible de réaliser un suivi en ligne par UV-Visible, ainsi les mesures sont réalisées de manière différée (spectromètre Agilent DAD Cary 8454 ou HITACHI U-3900H).

5) Analyses infrarouge

a) Identification des bandes caractéristiques

La principale analyse des gels de myoglobine se fait par infrarouge. On retrouve sur les spectres différentes bandes caractéristiques : les bandes associées au polypropylène, à l'eau deutérée et la myoglobine en milieu deutéré (Figure 5-30). Les bandes intéressantes pour notre étude sont les suivantes :

- Il y a la bande amide I à 1650cm^{-1} caractéristique des liaisons $\text{C}=\text{O}$ de la chaîne principale d'une protéine. Elle peut être déconvoluée pour obtenir la structure secondaire de la protéine, comme nous le verrons par la suite (Byler and Susi, 1986; Yang et al., 2015).
- La bande entre 1600 et 1520 cm^{-1} est également caractéristique de la protéine. Elle correspond au signal des chaînes secondaires, des mesures ont montré qu'elle contient vraisemblablement un signal des acides aminés aromatiques, de l'acide glutamique et de l'acide aspartique (Barth, 2007, 2000). Lors des irradiations, il a également été observé qu'elle contient toujours une partie de la bande amide II hydrogénée. Ce reliquat correspondrait à des hydrogènes inéchangeables au cœur de la protéine.
- La bande du D_2O à 1200cm^{-1} permet de vérifier la bonne hydratation du gel avant et au cours de l'irradiation.

Les bandes décrites dans la Figure 5-30 sont les bandes présentes dans le gel de myoglobine natif. Par ailleurs, il n'est pas exclu d'observer de nouvelles bandes qui se créent lors de l'irradiation. C'est pourquoi, la totalité du spectre sera inspectée sous irradiation.

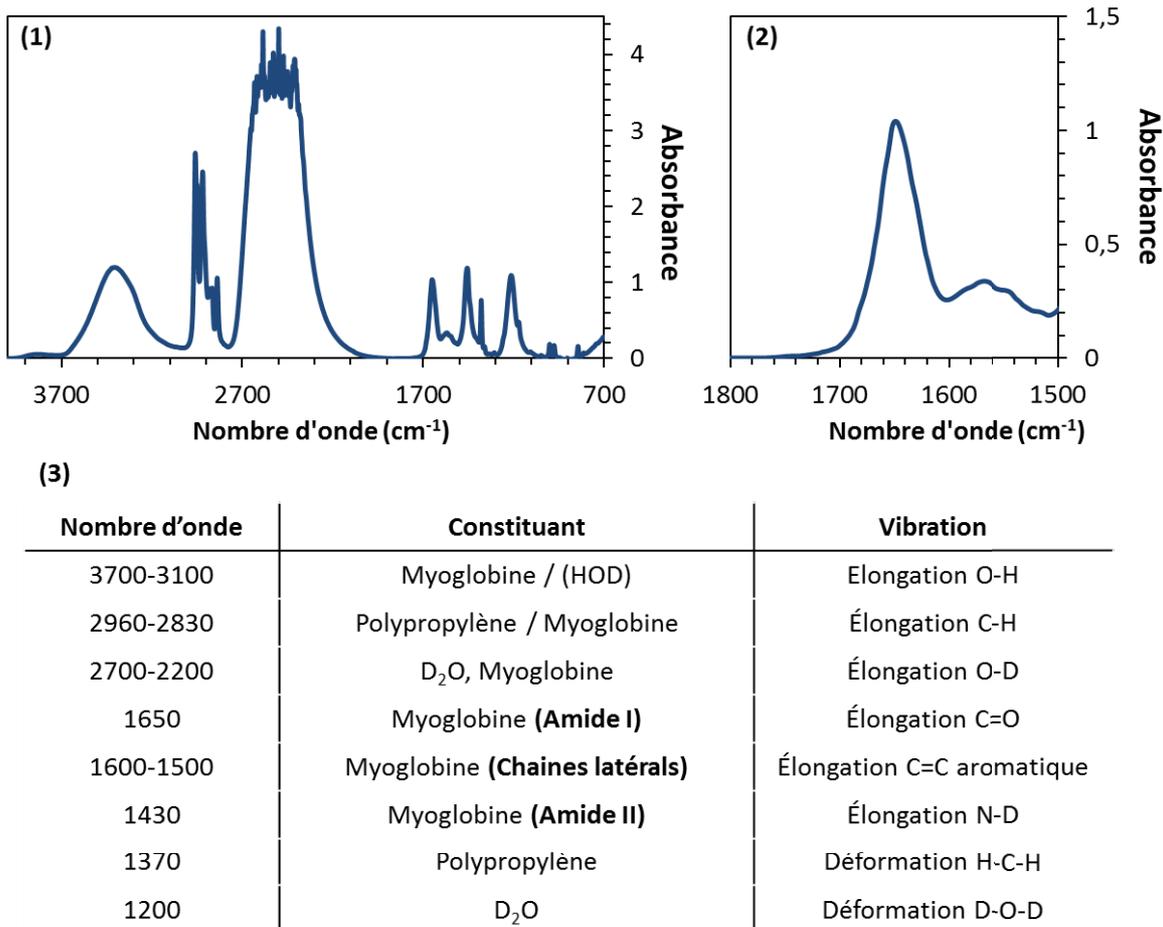


Figure 5-30 : Analyse d'un gel de myoglobine par infrarouge. (1) : spectre complet. (2) : spectre centré sur la bande amide I à 1650cm-1 contenant l'information de la structure secondaire de la protéine. (3) : Identification des bandes caractéristiques retrouvées sur les spectres du gel en milieu deutéré (1) et (2).

b) Bande amide I et extraction de la structure secondaire

Pour sa déconvolution, la bande amide I est isolée et on applique une dérivée secondaire associée à un lissage suivant l'algorithme de Savitzky-Golay à 9 points (Figure 5-31 (1))(Savitzky and Golay, 1964). Un lissage à 9 points est un bon compromis entre une bonne suppression du bruit et une préservation des données expérimentales. En effet, les points étaient espacés de 2 cm⁻¹, une largeur de 9 points correspond à 18 cm⁻¹ ce qui coïncide avec la largeur des bandes déconvoluées. Un lissage plus important entraîne une dégradation des données.

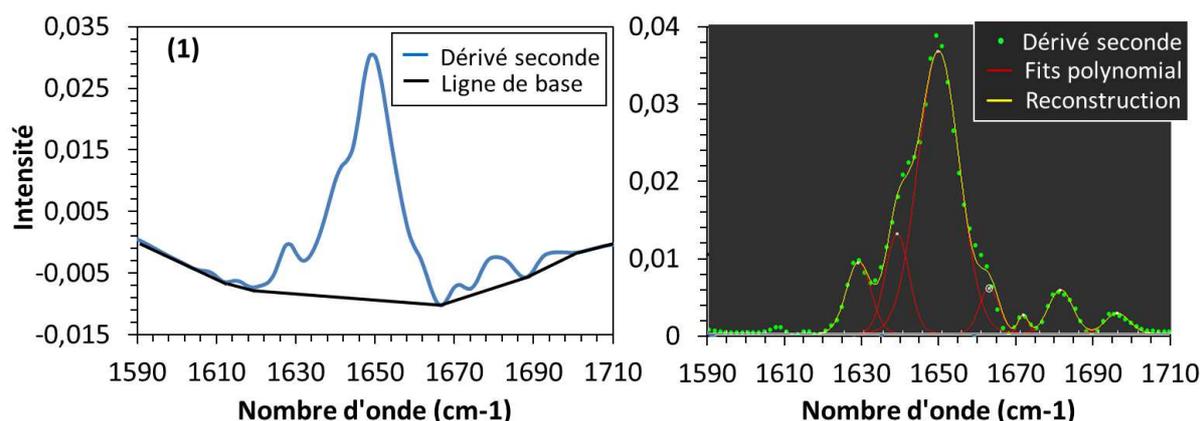


Figure 5-31 : Traitement de la bande amide I pour déconvoluer la structure secondaire de la protéine. (1) : Inverse de la dérivée seconde de la bande amide I après lissage par l'algorithme Savitsky-Golay à 9 points et réalisation d'une ligne de base par les minimums locaux. (2) : Déconvolution de la bande amide I par sept gaussiennes (Structures bêta : 1629 cm⁻¹, 1662 cm⁻¹, 1670 cm⁻¹, 1680 cm⁻¹ et 1694 cm⁻¹/ Hélices alpha : 1649 cm⁻¹ / Structures désordonnées : 1639 cm⁻¹) sur le logiciel Fytic (Wojdyr, 2010). Protocole adapté d'après (Yang et al., 2015).

Une fois la dérivée secondaire obtenue, on applique une ligne de base suivant les minimums locaux avant de réaliser la déconvolution du signal sur le logiciel Fytic (Figure 5-31 (2))(Wojdyr, 2010). Cette dernière est effectuée avec 7 gaussiennes (Structures bêta : 1629 cm⁻¹, 1662 cm⁻¹, 1670 cm⁻¹, 1680 cm⁻¹ et 1694 cm⁻¹/ Hélices alpha : 1649 cm⁻¹ / Structures désordonnées : 1639 cm⁻¹). Les valeurs utilisées pour la déconvolution restent toujours comprises dans les gammes décrites dans la littérature (Tableau 5-5)(Yang et al., 2015) Ces attributions permettent de retrouver des structures de départ de la myoglobine dans le gel ou en solution concentrée cohérente avec la structure native décrite dans la littérature. On mesure des proportions typiquement de l'ordre de 70% de structures alpha, 20% de structures bêta et 10% de structures désordonnées qui sont en bon accord avec la structure mesurée par cristallographie (73% alpha, 13% bêta 14% désordonnée (Maurus et al. 1997)). Lors de la déconvolution, la bande à 1662 cm⁻¹ est la seule dont la position est fixée. L'aire des gaussiennes est directement utilisée pour calculer les pourcentages en structures secondaires. D'autres protéines ont été également utilisées pour valider le traitement et il a été possible de retrouver des structures cohérentes pour BSA, la HSA et la β -lactoglobuline.

Tableau 5-5 : Attribution des structures secondaires dans la littérature. (Yang et al., 2015)

Structure en milieu D ₂ O	Fréquence moyenne littérature (cm ⁻¹)
Feuillet bêta	1624 ± 4 ; 1631 ± 3 ; 1637 ± 3 ; 1675 ± 5
Coude bêta	1663 ± 4 ; 1671 ± 4 ; 1683 ± 2 ; 1694 ± 2
Hélice alpha	1653 ± 4
Sans structure	1645 ± 4

B. Expériences d'irradiation

1) Protocole d'irradiation classique

Les gels de protéines sont préparés directement avant l'irradiation. Leur homogénéité et la structure initiale des protéines sont vérifiées avant de procéder à l'irradiation.

Pour l'irradiation avec des ions de basses énergies, une cellule d'irradiation spécifique a été utilisée (Chapitre 2) afin de contrôler la position du gel face au faisceau et dans le spectromètre infrarouge. De même, cette cellule permet également de contrôler l'atmosphère d'irradiation. L'irradiation est réalisée par palier grâce au système de motorisation permettant le passage rapide de la position d'irradiation à celle d'analyse. Ainsi, un gel est irradié jusqu'à plus de 10^{13} ions/cm² en moins d'une heure.

Pour l'irradiation par des faisceaux de hautes énergies, la cellule ne peut être utilisée. L'irradiation est réalisée de manière indépendante à l'analyse. Après une certaine fluence, le gel est récupéré pour analyse puis à nouveau irradié.

2) Rayonnements utilisés

Les rayonnements recensés dans le Tableau 5-6 ont permis l'irradiation des échantillons des gels de myoglobine. On y retrouve les ions de basses énergies (H⁺, He²⁺ et C⁶⁺), des carbones de hautes énergies et des rayonnements gamma. Ces rayonnements permettent de balayer une gamme de TEL de 0,9 à 830 eV/nm.

Des expériences préliminaires ont été réalisées sous irradiation gamma, mais les doses (~2kGy) atteintes étaient tout simplement trop faibles pour visualiser des dégâts. Des expériences sous faisceau d'électrons sont envisagées pour atteindre les doses nécessaires de l'ordre du MGy.

Tableau 5-6 : Rayonnements utilisés pour les expériences d'irradiation de gel de myoglobine. Les TEL des ions sont déterminés par SRIM (Ziegler, 2010). Le TEL équivalent des rayons gamma provient de l'étude de Mesungonen et al. en 2001

Type de rayonnement	Energie d'entrée dans le gel (MeV)	TEL moyen dans le gel (eV/nm)
H ⁺	1,1 à 2,4	25 à 15,6
He ²⁺	4,5 à 20 ,7	97 à 31
C ⁶⁺	11 à 41	828 à 408
	4300	11,3

3) Conditions d'irradiation particulières

Dans une volonté de réaliser des études mécanistiques, des gels ont été irradiés sous atmosphère désoxygénée. Afin de s'assurer de l'absence d'oxygène, les gels en question ont été préparés sous une atmosphère argon dans une tente à gants après équilibration des solutions dans cette atmosphère durant trente minutes. Une fois préparés, ils sont introduits dans la cellule d'irradiation elle-même sous flux d'argon. Le reste de l'irradiation se déroule dans les mêmes conditions.

Pour tester l'influence de la gélification sur la radiolyse, des irradiations de protéines en solution concentrée de myoglobine ont été réalisées. Ainsi, quelques microlitres de solution à environ 30% de myoglobine dans D₂O sont déposés entre deux feuilles de polypropylène de 5µm. Cet échantillonnage a posé de nombreux problèmes de reproductibilité, de stabilité et d'homogénéité pour l'irradiation. En effet, la solution a tendance à former des zones plus épaisses et à couler lors de son irradiation à la verticale. Toutefois, avec des films très fins de solution, il a été possible de réaliser des irradiations en conservant des conditions convenables et reproductibles pendant la durée de l'expérience. Ce film ne permet cependant pas la détermination exacte de son épaisseur et implique également un faible signal en infrarouge ce qui rend certains signaux impossibles à quantifier.

C. Etude de la radiolyse directe de myoglobine

Dans un premier temps, nous verrons quels phénomènes sont observés lors de la radiolyse au travers des expériences d'irradiation avec des protons de basses énergies. Les propositions de modifications chimiques seront présentées et discutées.

Par la suite, les effets de TEL sur la radiolyse des gels de myoglobine seront présentés. Pour ce faire, les mécanismes de dégradation seront appréhendés au travers d'une approche globale du dépôt d'énergie et au travers de la théorie de la cible décrivant le nombre d'impacts pour modifier une protéine.

4) Etude phénoménologique

a) Evolution des propriétés spectroscopiques de la myoglobine sous irradiation

Les spectres UV-Visibles et infra-rouge d'un gel de myoglobine ont été enregistrés sous irradiation par des protons de 2,5 MeV. Différentes zones d'évolutions ont été observées sur les spectres. (Figure 5-32)

En infra-rouge, la bande amide I à 1650 cm^{-1} diminue au cours de l'irradiation et s'élargit (Figure 5-32 (1)). On remarque également une légère diminution vers 1540 cm^{-1} , pouvant correspondre à la bande amide II hydrogénée résiduelle qui va de pair avec une augmentation de la bande amide II deutérée à 1450 cm^{-1} . Toujours sur les spectres infra-rouges, on observe l'apparition de nouvelles bandes entre 1980 cm^{-1} et 1920 cm^{-1} (Figure 5-32 (2)). Dans un premier temps, une bande à 1943 cm^{-1} apparaît et augmente jusqu'à des fluences de 10^{13} ions/cm^2 pour redescendre ensuite, au profit d'une seconde bande à 1965 cm^{-1} . Cette zone du spectre infra-rouge pourrait correspondre à des liaisons de monoxyde de carbone sur l'ion fer de la myoglobine.

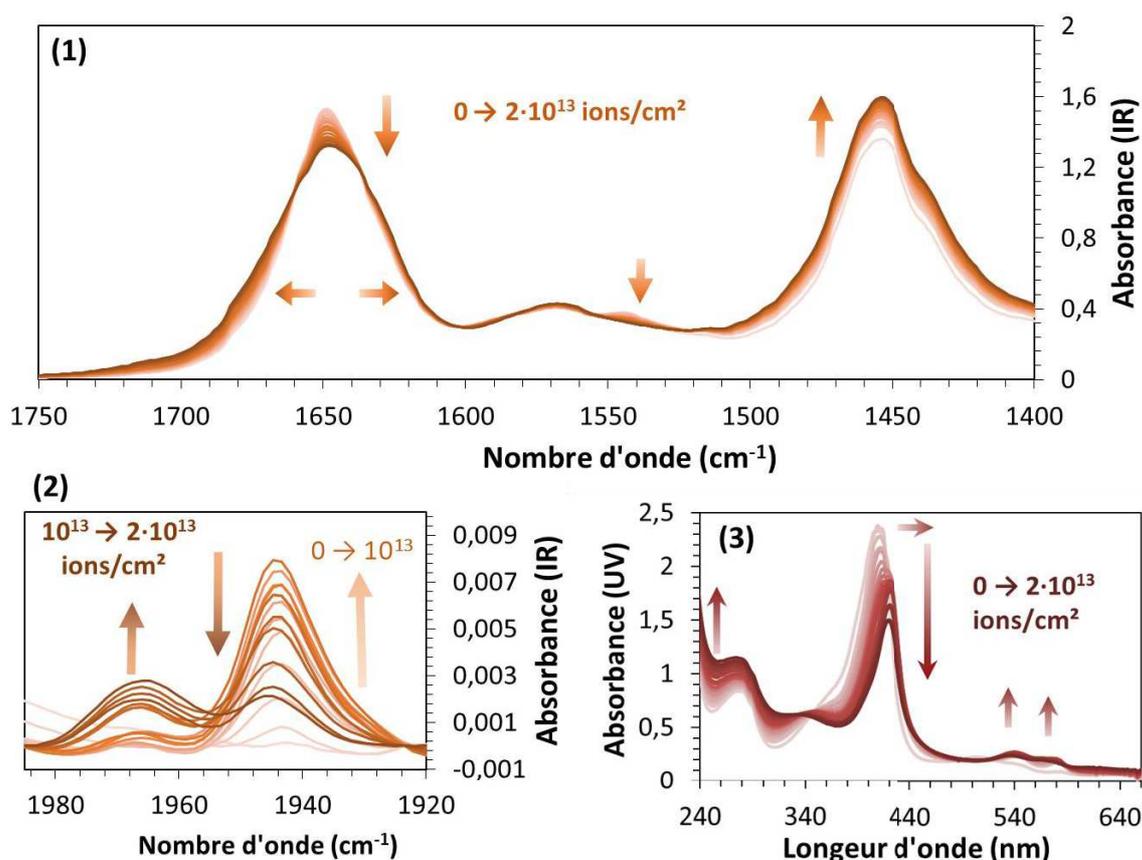


Figure 5-32 : Evolution de l'absorbance en infra-rouge entre 1750 et 1400 cm^{-1} (1), entre 1980 et 1920 cm^{-1} (2), et de l'absorbance en UV-Visible d'un hydrogel de myoglobine irradié par des protons de $2,5\text{ MeV}$ (3).

Sur les spectres enregistrés en UV-Visible, on note trois zones de modifications sous irradiation (Figure 5-32 (3)). On observe une augmentation de l'absorbance correspondant aux acides aminés aromatiques vers 280 nm . L'absorbance de la bande de Soret diminue et se déplace vers un maximum d'absorption de 420 nm . Pour finir, il y a une modification des bandes Q qui conduit à l'apparition de deux maximums d'absorbance locaux à 540 et 581 nm .

b) Modification de la structure secondaire de la protéine

La bande amide I à 1650 cm^{-1} évolue fortement lors de l'irradiation (Figure 5-32). En réalisant la dérivée seconde de cette bande sur chacun des spectres, on met en évidence les modifications se produisant sur celle-ci (Figure 5-33 (1)). De ces courbes, il est alors possible d'extraire les pourcentages en structures secondaires de la protéine (Figure 5-33 (2)). On observe alors une forte modification de sa structure lors de l'irradiation. En effet, après une fluence de 5×10^{12} ions/cm², une diminution des structures alpha est mesurée au profit de la formation de structures bêta en allant vers un plateau pour les fortes fluences. L'obtention d'un plateau est synonyme que toutes les protéines du gel ont été touchées et modifiées lors de l'irradiation. Ces modifications semblent correspondre à la formation d'une nouvelle forme de la myoglobine structurée et non pas vers une phase désordonnée. En effet, les proportions en fin d'irradiation sont de 37% de structures alpha, 48% de structures bêta et 15% de la protéine restent non structurés.

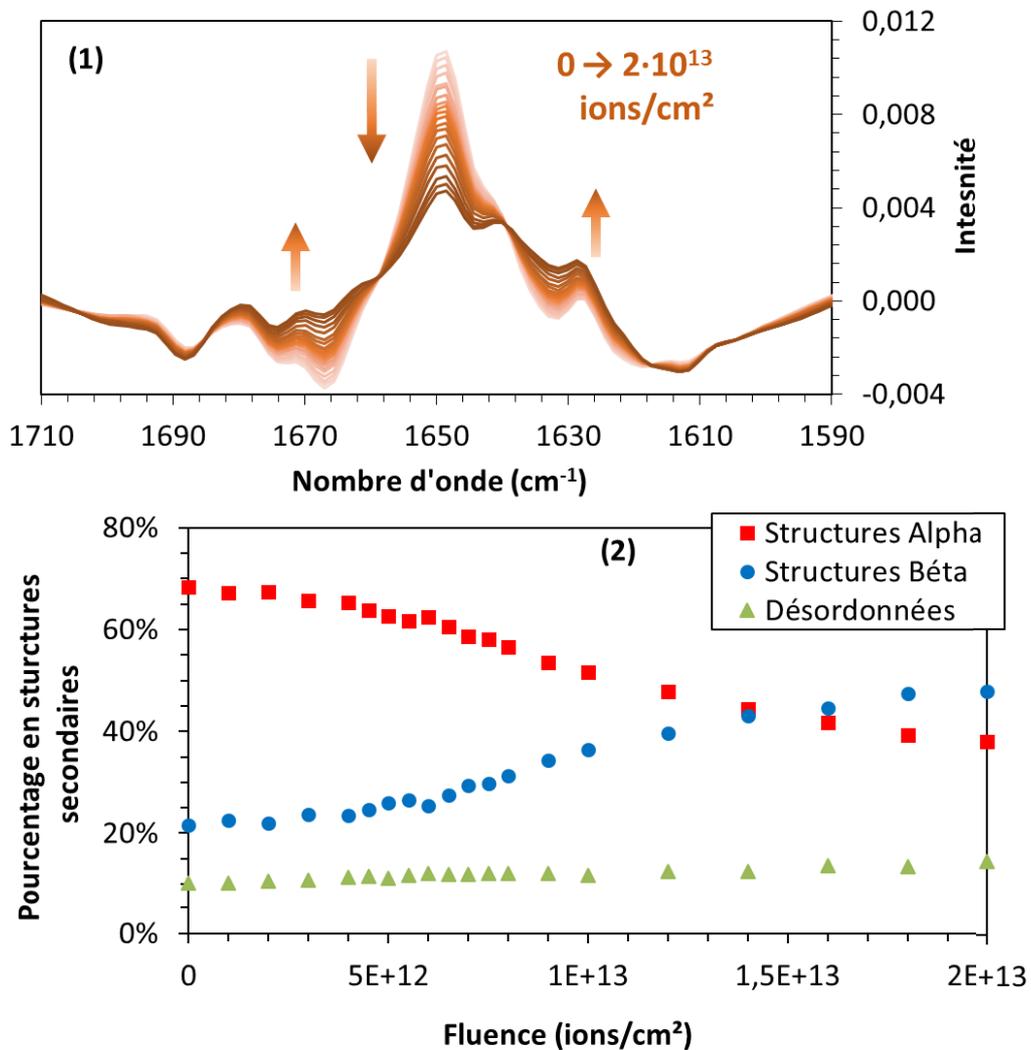


Figure 5-33 : (1) : Evolution de l'inverse de la dérivée seconde de la bande amide I de la myoglobine en gel sous irradiation par des protons de 2,5 MeV. (2) : Evolution en structures secondaires de la protéine après traitement et déconvolution.

L'une des principales craintes concernant les expériences menées lors de cette étude était l'influence de la formation des gels sur la radiolyse des protéines. Les gels sont composés d'environ 23% de protéines, de 0,5% de glutaraldéhyde et de 76,5% d'eau. Etant données les proportions relatives, on pouvait espérer que les effets de la radiolyse du glutaraldéhyde seraient très faibles ou négligeables. Cependant, on pouvait s'interroger sur l'influence de l'immobilisation des protéines via la formation de liaisons pontantes inter-protéines sur leur radiolyse. Pour répondre à cette question, des expériences d'irradiation de solutions concentrées ont été menées sans gélification. Des modifications identiques et superposables à celles observées lors de l'irradiation de gels ont été observées. (Figure 5-34). Ce résultat indique que la formation des gels de protéines a une influence apparemment négligeable dans les mécanismes de radiolyse observés. Les résultats de ces études devraient donc être transposables à des solutions de protéines concentrées.

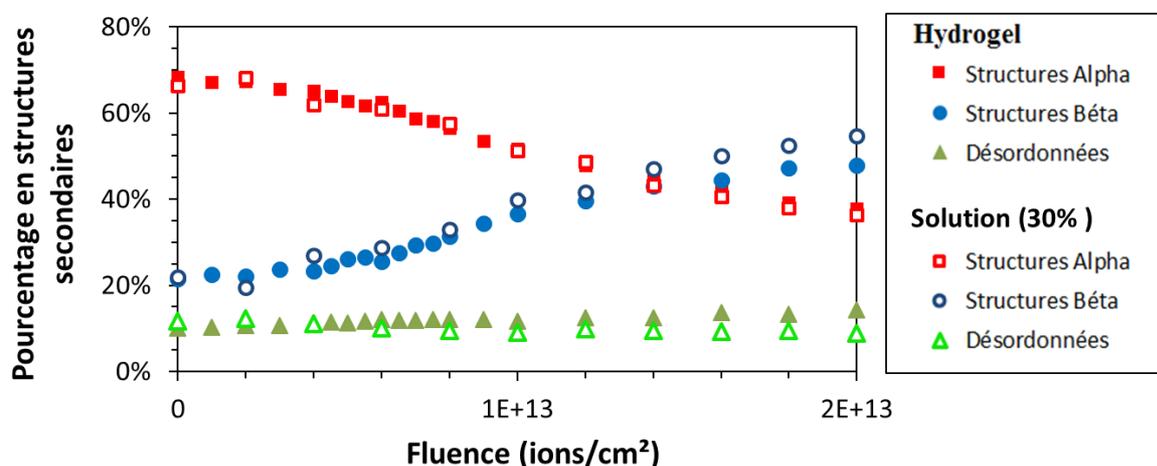


Figure 5-34 : Comparaison de l'évolution de la structure secondaire des protéines lors de l'irradiation d'un gel de myoglobine et de solution concentrée de myoglobine par des protons de 2,5MeV.

La reproductibilité des expériences a été vérifiée en irradiant trois gels différents avec des protons de 2 MeV lors de trois expériences distinctes espacées de plusieurs mois. Des modifications identiques ont été observées sur les proportions en structures secondaires des protéines dans les trois gels (Figure 5-35). Ces expériences permettent de donner un intervalle de confiance sur les modifications en structures secondaires observées lors de la radiolyse des gels de protéines qui est estimé à $\pm 5\%$ de variation du signal.

L'absence d'influence du gel et l'excellente reproductibilité des expériences réalisées valident l'utilisation des gels hydratés de myoglobine pour l'étude de la radiolyse directe de cette protéine.

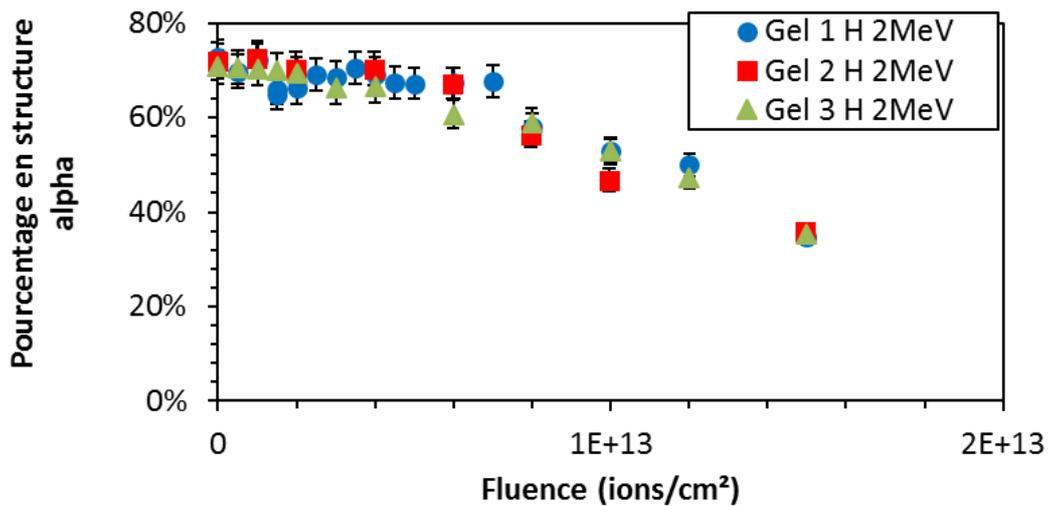


Figure 5-35 : Comparaison de l'évolution du pourcentage en structures alpha des protéines lors de l'irradiation de trois gels de myoglobine par des protons de 2 MeV dans les mêmes conditions.

c) Irradiations en milieu désoxygéné

Afin d'estimer l'effet de l'oxygène et l'évolution potentielle de celui-ci avec le TEL des particules incidentes, plusieurs expériences ont été menées en milieu désoxygéné, en équilibrant le gel et le milieu sous atmosphère d'argon. Lors de l'analyse de la structure secondaire de la protéine après irradiation par des protons de 2,5 MeV, les modifications de structures secondaires de la protéine se sont révélées très similaires à celles mesurées en milieu aéré (Figure 5-35). On observe ainsi les mêmes tendances, les mêmes paliers et les mêmes proportions finales pour celles-ci.

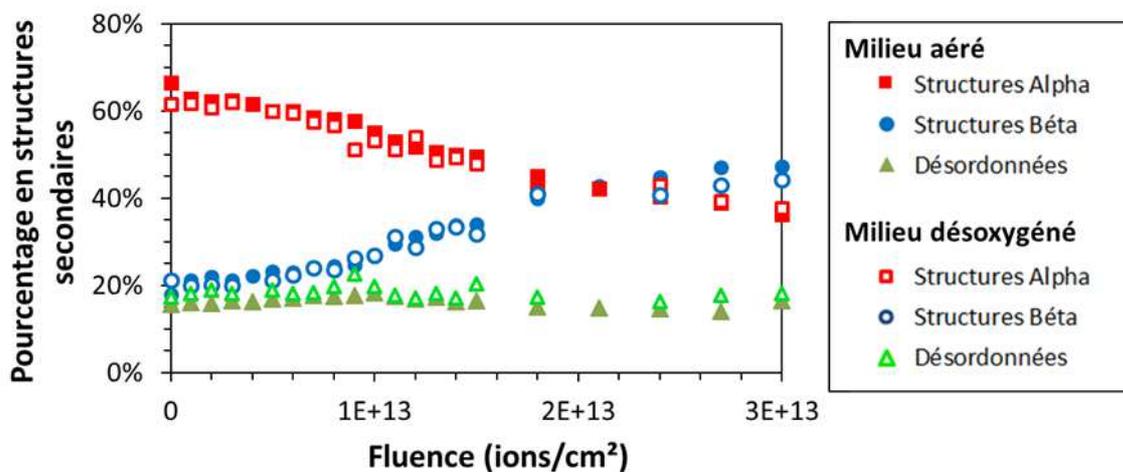


Figure 5-36 : Comparaison de l'évolution de la structure secondaire des protéines lors de l'irradiation de gel de myoglobine en milieu aéré et désoxygéné par des protons de 2,5MeV.

L'oxygène ne joue donc a priori pas de rôle prépondérant dans les dégâts conduisant aux changements structuraux observés, malgré des TEL relativement faibles. Des dégâts de type réticulation de la protéine sont généralement favorisés en milieu désoxygéné car ils consistent en une réaction inter-radicalaire. Cependant, dans nos conditions, la densité de protéines pourrait être suffisante pour favoriser de manière importante des recombinaisons radicalaires inter ou intra protéiques. La faible teneur du milieu en oxygène dissous ($\sim 240 \mu\text{M}$ dans l'eau pure) le rendrait peu compétitif face à des concentrations radicalaires locales importantes. Cette hypothèse est cohérente avec l'impossibilité de redissoudre les gels de protéines suite à leur irradiation, ce qui pourrait provenir de leur réticulation.

Des expériences récentes, menées sous irradiation par des particules alpha et des ions carbone de faibles énergies dans des conditions identiques aboutissent au même résultat, avec des évolutions superposables en milieu aéré ou désoxygéné.

Des expériences menées avec des particules de TEL beaucoup plus faibles (électrons par exemple) donneront certainement un éclairage très utile à ces résultats inattendus.

d) Production et capture de monoxyde de carbone

Allant de pair avec les modifications observées sur la structure secondaire et l'éventuelle réticulation de la protéine, une apparition de bandes caractéristiques de vibration du monoxyde de carbone sur un ion fer a été observée en infrarouge. En effet, deux bandes infrarouges à 1943 et 1967 cm^{-1} apparaissent successivement (Figure 5-32 (2)). Dans notre système, l'apparition de ces bandes indiquerait la complexation du monoxyde de carbone sur l'hème de la myoglobine. La forme Mb(II)CO comporte trois bandes caractéristiques des vibrations du monoxyde de carbone à 1966 , 1945 et 1933 cm^{-1} . Ces trois bandes sont associées à trois structures du complexe Mb(CO). Ces structures se différencient par les interactions du CO avec l'histidine 64 (Mayer, 1994) :

- La première structure est appelée A0, sa fréquence de vibration est de 1966 cm^{-1} . Cette fréquence est similaire à celle de vibration du CO sur une porphyrine libre, l'histidine 64 n'interagit pas avec le groupement CO. Dans notre cas, sa fréquence de vibration est observée à 1967 cm^{-1} .
- La deuxième structure, notée A1 avec une bande de vibration à 1945 cm^{-1} , résulte d'une interaction polaire du CO avec l'histidine 64. La fréquence observée dans le système est 1943 cm^{-1} .
- La troisième structure, notée A3, possède une fréquence de vibration à 1933 cm^{-1} . Elle correspond à une interaction plus forte que la structure A1 en raison d'une plus forte proximité du CO à l'histidine. Dans notre étude, cette bande forme un épaulement à la bande de la forme A1.

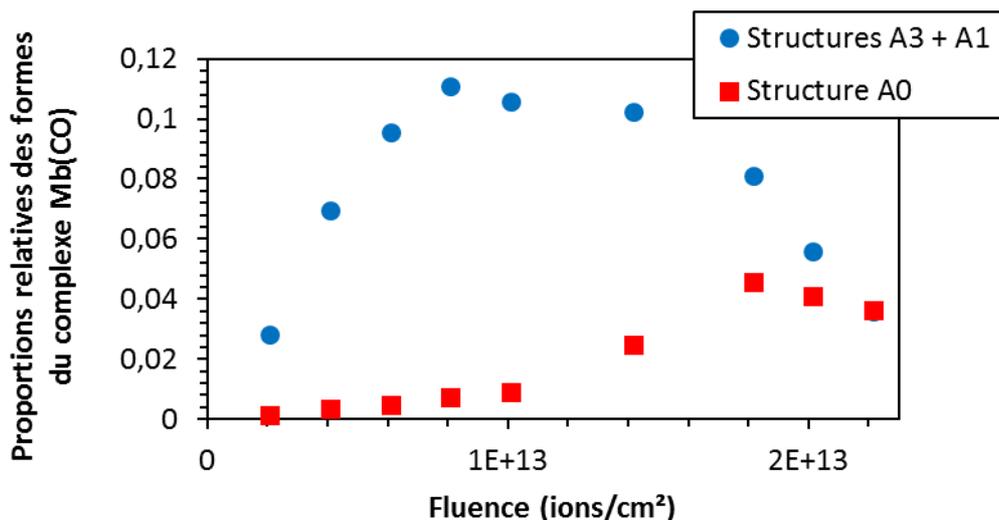


Figure 5-37 : Evolution des proportions des formes A0, A1 et A3 du complexe Mb(CO) en fonction de la fluence en protons de 2 MeV

L'intégration de l'aire des bandes A0 et A1+A3 nous renseigne sur l'évolution des structures lors de l'irradiation (Figure 5-37). On observe une formation dès les premiers instants de la radiolyse de la forme A1 et A3 du complexe Mb(II)CO. Après une fluence de 10^{13} ions/cm², la formation des deux premières formes ralentit au profit d'une formation de la forme A0 correspondant à la forme la plus libre du CO. L'apparition de cette nouvelle forme suggère une ouverture du site actif lors de l'irradiation qui va de pair avec les modifications de la structure secondaire des protéines observées.

L'existence du complexe Mb(II)CO est également appuyé par l'analyse UV-Visible montrant une modification des bandes Q ainsi qu'un décalage de la bande de Soret (Figure 5-32 (3)). Ces modifications se rapprochent fortement des caractéristiques en UV-Visible de la forme Mb(II)CO (Tableau 5-1)(Richards, 2013). Cette fixation du monoxyde carbone sur la myoglobine implique deux phénomènes. Il faut que l'ion fer de la myoglobine soit réduit au degré d'oxydation II afin de pouvoir accepter ce ligand et il faut qu'il y ait une production de monoxyde de carbone.

La production de monoxyde de carbone a déjà été décrite lors d'irradiations de matière organique. Sharpatayi et al ont décrit la formation de ce gaz lors d'irradiations de polysaccharide par des rayons gamma issus des fonctions aldéhyde (Sharpatayi, 2003). Lee et Ahn ont également mesuré en 2004 une production de monoxyde de carbone importante dans le cas d'irradiation d'albumine et d'hémoglobine par des électrons rapides (Lee and Ahn, 2004). Dans la même étude, la production du gaz a pu être fortement corrélée à la radiolyse de l'asparagine dans une chaîne polypeptidique. Aucune mesure n'a été réalisée sur la glutamine en polymère. Toutefois, les résultats obtenus sur la radiolyse des acides aminés d'asparagine et de glutamine laissent également penser à une production de CO à partir de celle-ci. Lee et Ahn ont également observé la capture du monoxyde de carbone produit sous radiolyse par l'hème de l'hémoglobine. Dans le cas de nos gels de myoglobine, la présence de deux asparagines et 6 glutamines par protéine

pourraient expliquer la production de CO observée. On peut également avancer que les dépôts de dose plus intenses des ions pourraient favoriser ce type de mécanisme de production de monoxyde de carbone.

Pour ce qui est de la réduction de l'hème, on peut imaginer un transfert radicalaire vers celui-ci provenant de la protéine afin de le réduire. De même, les conditions hydratées et concentrées intrinsèques au gel pourraient permettre une attaque de l'électron hydraté sur l'hème avant sa capture par le dioxygène.

5) Effets de TEL sur les modifications de structures secondaires

Suite à l'étude phénoménologique présentée dans les parties précédentes, les gels ont été irradiés avec des particules alpha et des ions carbone de basses énergies en plus des mesures effectuées sous protons. Lors de ces expériences, des modifications similaires de la structure secondaire des protéines dans les gels sont observées (Figure 5-38). En effet, pour les trois types de particules, la diminution des proportions en structures alpha se fait au profit des structures bêta et de faibles variations des parties non structurées de la protéine. Il semble également que lors de l'irradiation, les modifications en structures secondaires se dirigent vers une valeur finale de l'ordre de 30% en structures alpha indépendamment du type de rayonnement.

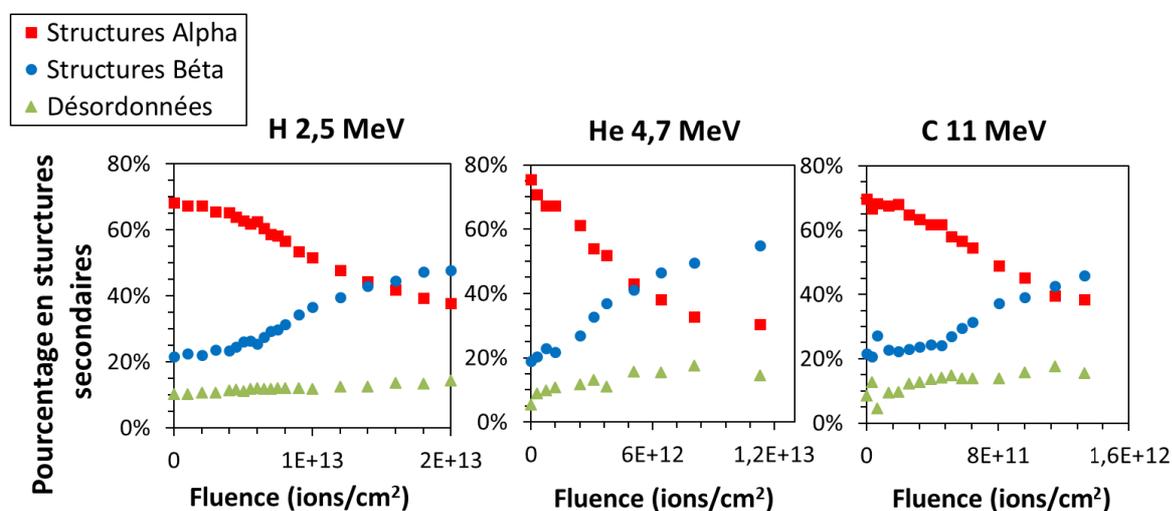


Figure 5-38 : Evolution de la structure secondaire de la myoglobine en gel sous irradiation par des protons de 2,5 MeV, de particules alpha de 4,7 MeV et des ions carbone de 11 MeV.

Si les phénomènes mis en cause sont similaires, la principale différence entre ces trois types d'ions tient aux fluences d'ions nécessaires pour obtenir ces dégradations. En effet, des fluences plus faibles sont nécessaires pour modifier la structure secondaire des protéines avec des ions carbone (Figure 5-38). Cet ordre respecte l'évolution des TEL des particules, avec des dégâts plus importants lorsque le dépôt d'énergie est plus dense. Pour faciliter la comparaison, ces mesures

peuvent être représentées sur le même graphique en tenant compte uniquement de l'évolution en structures alpha (Figure 5-39). L'effet du TEL discuté ci-dessus est alors mis en évidence de façon très explicite. En effet, les ions carbone nécessitent des fluences dix fois plus faibles que les protons pour aboutir à un même taux résiduel d'hélices alpha.

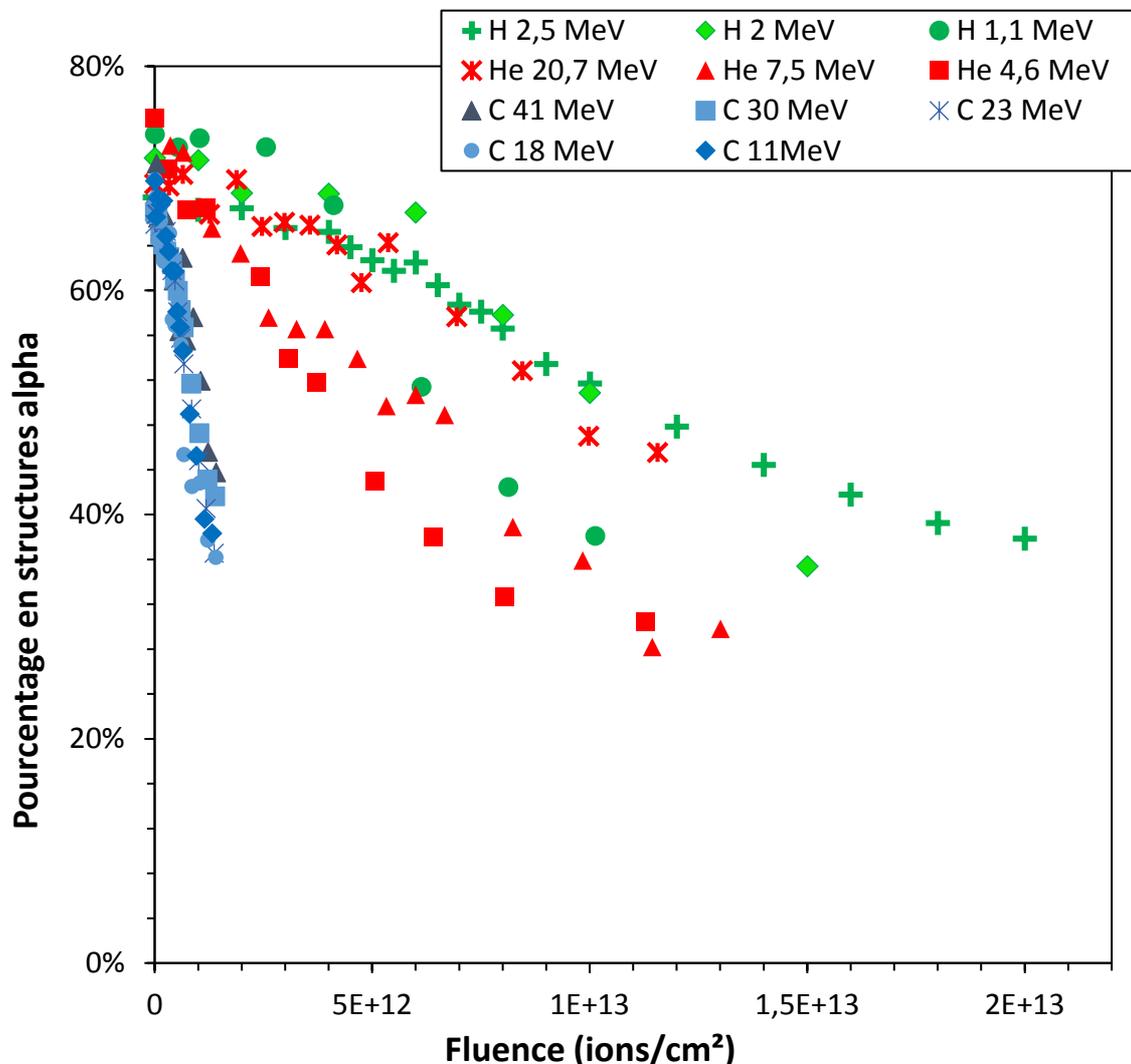


Figure 5-39 : Comparaison des pourcentages en structures alpha pour des protons, des particules alpha et des ions carbone de basses énergies en fonction de la fluence en ions/cm².

La Figure 5-39 représente les résultats bruts, c'est l'évolution relative d'une modification, pour un ion d'énergie donnée, en fonction de la fluence. Il est commun, notamment pour des applications à la hadronthérapie, de transformer les données brutes de ce type en fonction d'une dose. Il suffit de multiplier la fluence par le TEL correspondant à l'énergie de l'ion pour obtenir les mêmes données en fonction de la dose. Cette transformation considère le dépôt de dose de l'ion dans le gel comme étant homogène, ce qui est loin d'être correct à l'échelle nanométrique (Waligórski et al., 1986).

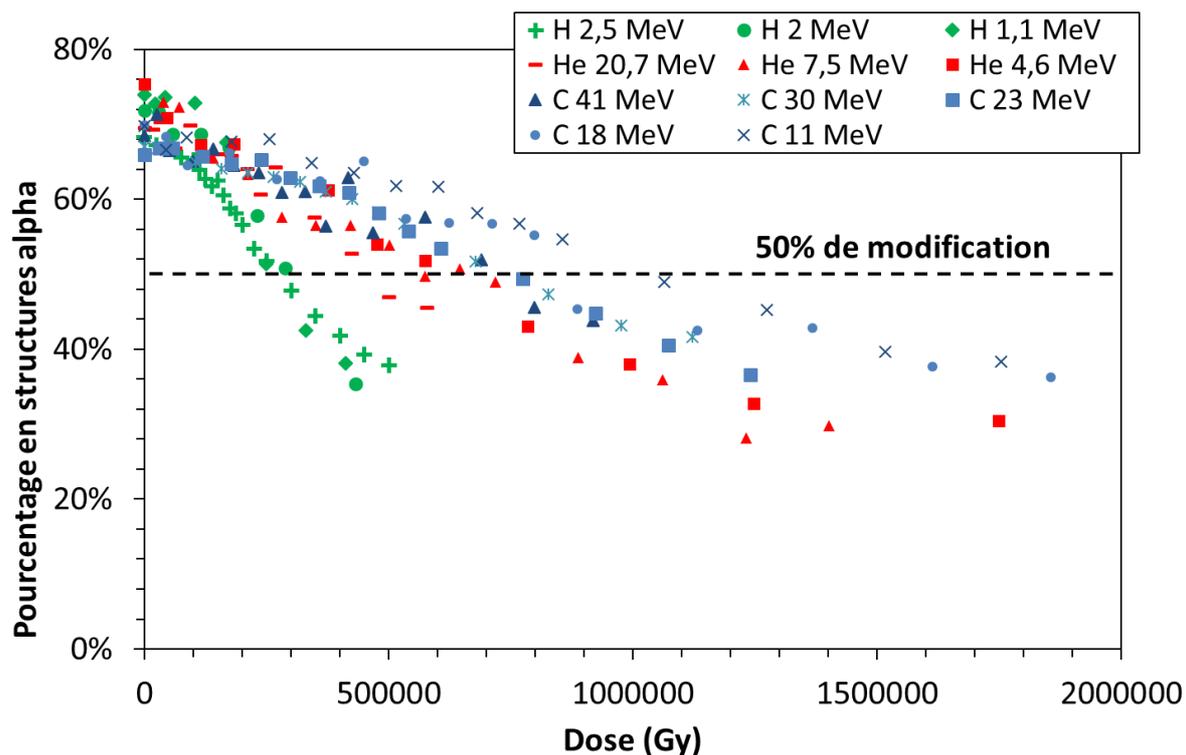


Figure 5-40 : Comparaison des pourcentages en structures alpha pour des protons, des particules alpha et des ions carbone de basses énergies en fonction de la dose déposée. La dose recalculée à partir du TEL est convertie en gray (approximation pour le gel 1L~1kg, d'après des mesures par pesée). Pour une conversion de 70% d'hélices alpha à 30% d'hélices alpha, la barre horizontale représente 50% de modifications.

Cette transformation (Figure 5-40) montre maintenant que les protons sont plus « efficaces » en terme de dose pour initier les modifications en structures secondaires. D'après cette représentation, les ions carbone sont les moins efficaces. Au vu de leurs forts TEL, il est probable qu'ils déposent tout simplement beaucoup plus d'énergie que celle nécessaire à la transformation. Ce phénomène est régulièrement décrit sous la dénomination « d'overkill » dans les études de radiobiologie (Weyrather and Kraft, 2004). Il faut toutefois garder à l'esprit que c'est avec les ions carbone que les modifications observées étaient les plus fortes à faible fluence, ils ont donc la plus grande section efficace d'interaction.

La Figure 5-41 présente les résultats obtenus prenant comme référence la dose nécessaire pour transformer 50% des protéines dans le gel à partir des données présentées dans la Figure 5-40. Si la forme finale de la protéine est atteinte à 30% de structures alpha, 50% de structures alpha représentent 50% de modifications. Les doses pour 50% de protéines modifiées sont alors relevées et comparées en fonction du TEL des particules.

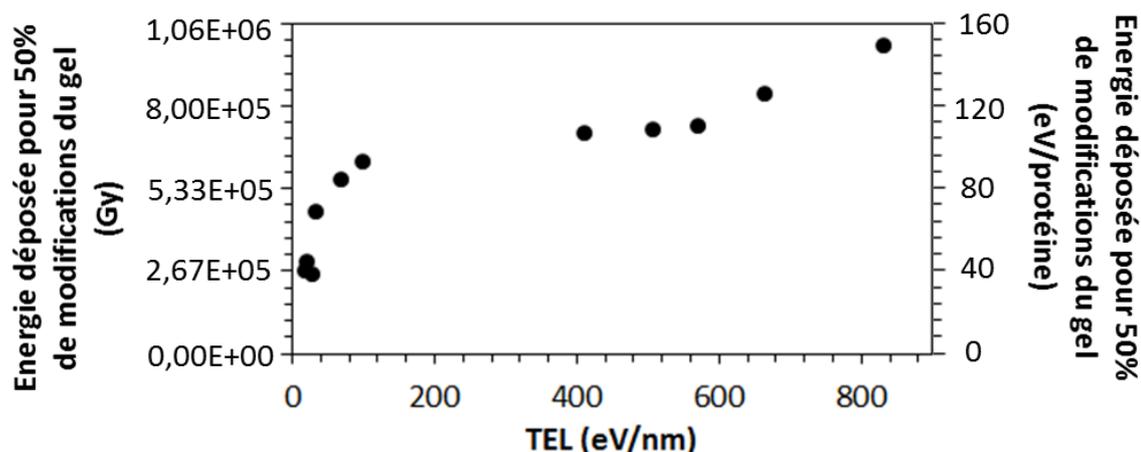


Figure 5-41 : Représentation de l'énergie nécessaire, en Gy et en eV/protéine pour obtenir 50% de modifications des gels en fonction du TEL dans la Figure 5-40

A partir de la notion de dose, il est possible d'estimer l'énergie moyenne déposée dans une protéine nécessaire à sa transformation. On considère une protéine comme une sphère de rayon 1,9nm. La Figure 5-41 permet alors de faire apparaître un plateau pour une valeur de 100 eV/protéine. L'énergie nécessaire à la transformation serait plus élevée pour des forts TEL, avec des ions carbone. Ceci rejoint les phénomènes d'overkill précédemment décrits. Dans le cas des protons, une valeur plus faible d'énergie semble nécessaire. Il faut juste retenir de cette figure qu'un dépôt d'énergie de l'ordre de 200 eV est nécessaire pour initier la modification structurale de la protéine.

6) Structure finale, courbe de survie et théorie de la cible

La théorie de la cible ou théorie de chocs est une approche statistique de la radiolyse sous faisceau d'ions. A l'origine, elle a été utilisée en biologie pour décrire des courbes de survie sous irradiation en fonction du nombre de chocs nécessaires à la modification d'une cible, comme la mort d'une cellule (Dertinger and Jung, 1969). Elle a été également utilisée pour estimer la taille de macromolécules sous irradiation (Kemper, 1999). Dans notre étude, nous allons essayer d'adapter ces lois statistiques à nos gels pour mieux comprendre les effets de TEL sur la radiolyse de la myoglobine.

Pour ce faire, il est nécessaire dans un premier temps de travailler avec des courbes assimilables à des courbes de survie en radiobiologie. Dans le cas de la myoglobine, on passe d'une structure initiale native à une structure finale après irradiation. Un relativement bon accord sur toutes les données montre une conversion vers une structure finale comportant 30% de structures alpha, 55% de structures bêta et 15% de la protéine sont non structurés. Ainsi, les courbes de conversion vers les structures finales peuvent être assimilées à des courbes de « survie » de la protéine en

conformation native. Elles sont calculées par déconvolution des pourcentages en structures secondaires entre la forme initiale et la forme finale (Figure 5-42).

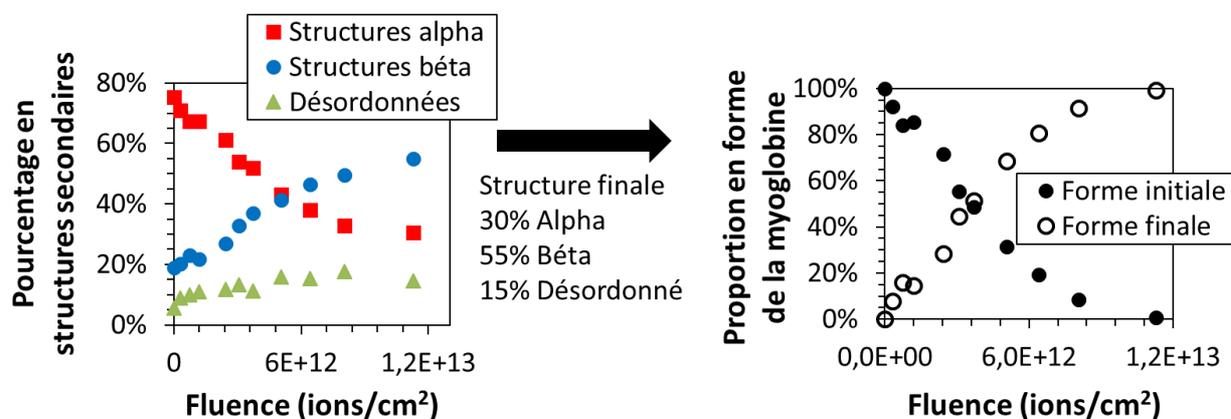


Figure 5-42 : Conversion des mesures de structures secondaires de la myoglobine dans les gels en courbes de type "survie" correspondant à une transformation de la myoglobine en une forme finale. Composition de la forme finale : 30% de structures alpha, 55% de structures bêta et 15% de forme non structurée.

La théorie de la cible sera adaptée uniquement pour déterminer le nombre de chocs nécessaires à la transformation à partir de l'allure des courbes de survie. Celle-ci permet de décrire par des lois statistiques (équation 5-35) l'allure des courbes obtenues pour une transformation de la cible si n chocs sont nécessaires à transformer la cible. Dans notre cas, si n chocs dans la surface de la protéine nous permettent de passer de la structure initiale à la structure finale de la protéine, n-1 chocs ne le permettent pas. L'allure des courbes de survie attendues pour n chocs est donnée par la Figure 5-43 qui est adaptée de la théorie de la cible comme cela est décrit par Dertinger et Jung. Ces courbes sont normalisées par la fluence $\frac{1}{2}$, correspondant à la fluence nécessaire à obtenir 50% de modifications dans la cible. Notre étude sera uniquement basée sur l'allure des courbes et ne cherche pas à aller plus loin vis-à-vis de la théorie de la cible.

$$N/N_0 = e^{-(F.S)} \sum_{k=0}^{n-1} \frac{(F.S)^k}{k!}$$

N/N_0	Proportion de la forme initiale restante
F	Fluence d'ions (ions/cm ²)
S	Surface de la protéine (cm ²) (approximation gel, disque 2D)
n	Nombre de chocs par protéine

Équations 5-25 : Proportion de « survie » dans la théorie de la cible. Equation adaptée à partir de (Dertinger and Jung, 1969).

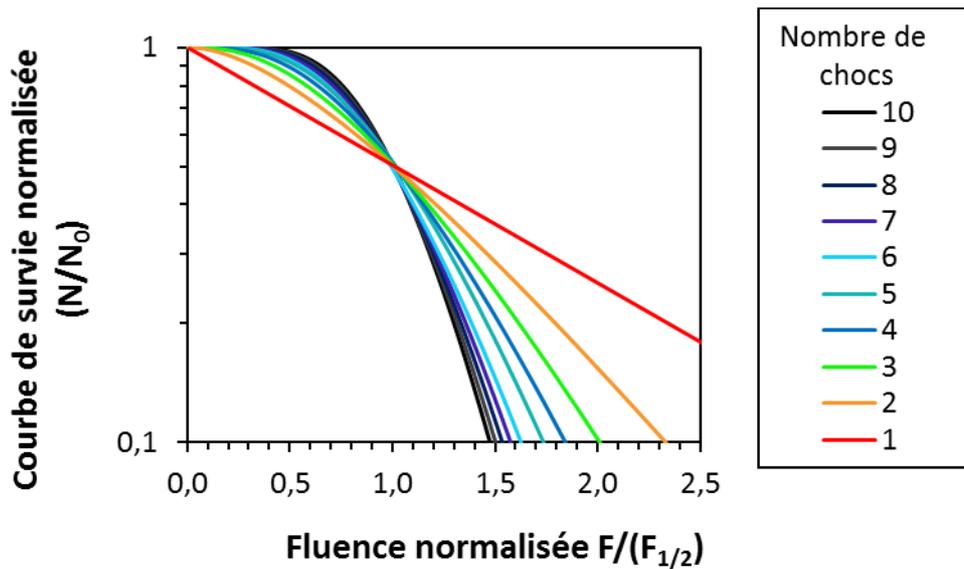


Figure 5-43 : Allure des courbes de survie correspondant à une dégradation de 1 à 10 chocs avec une fluence normalisée par la fluence $\frac{1}{2}$, fluence pour obtenir 50% de dégâts. Figure obtenue à partir de (Dertinger and Jung, 1969).

Les courbes présentées dans la Figure 5-43 représentent l'allure des transformations en fonction du nombre de chocs n nécessaires à la modification d'une cible. En comparant ces tendances avec les courbes de transformation que nous avons déterminées plus tôt dans le cas de nos gels, on peut estimer le nombre de chocs n nécessaires en fonction du type d'ion et de son énergie (La Figure 5-44). Ce traitement a été réalisé avec des ions de TEL croissant, des protons de 2,5, 2 et 1,1 MeV, des particules alpha de 20 ; 7,5 et 4 MeV et des ions carbone de 41 ; 23 et 11 MeV. Les allures de ces courbes sont clairement différentes et sont le mieux décrites par 1 à 4 chocs. Une allure linéaire correspondant à un seul choc tandis qu'une allure courbée correspond à un nombre de chocs plus élevé.

En partant des TEL les plus bas, plusieurs chocs sont nécessaires à la transformation, typiquement 3 ou 4, on observe ensuite qu'à partir d'un TEL de 67,4 eV/nm uniquement un choc est nécessaire avec des particules alpha de 7,5 MeV et ceci est le cas jusqu'à 400 eV/nm. Pour les TEL plus forts, on retrouve étonnamment des courbes avec plus d'un choc nécessaire à provoquer la transformation.

La protéine mesure en moyenne 3,8nm de diamètre. Si un ion avec un TEL de 67,4 eV/nm la traverse de part en part, il dépose un peu plus de 250 eV dans celle-ci. Dans ce cas, un choc semble suffisant à complètement la modifier. Cette valeur est en bon accord avec l'énergie moyenne de transformation du gel de protéine précédemment estimée. A faible TEL, il semble cohérent que plusieurs passages d'ions soient alors nécessaires. En revanche, à fort TEL, les résultats sont étonnants. La différence observée entre les ions carbone de 41 MeV et ceux de 23 et 11 MeV pourrait être associée à la distribution en énergie des électrons secondaires créés.

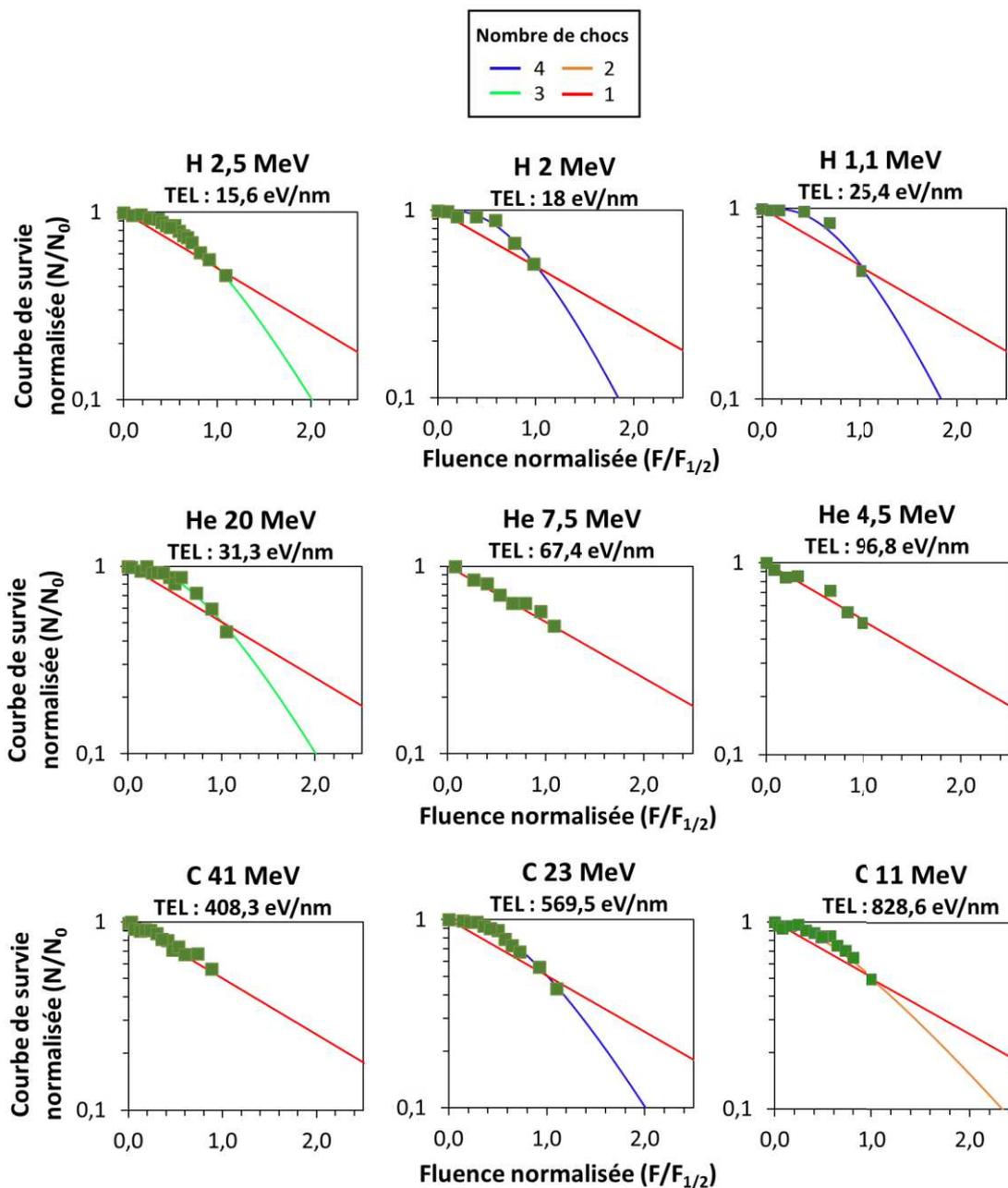


Figure 5-44 : Courbes de survie obtenues et estimation du nombre de chocs correspondants pour des protons (3,5 ; 2 ; 1,1 MeV), des particules alpha (20 ; 7,5 ; 4 MeV) et des ions carbone (41 ; 23 ; 11 MeV).

7) Effets de charge sur les modifications de structures secondaires

Un effet de charge sur la modification de la structure secondaire de la myoglobine a été observé lors de l'irradiation par des protons de 2,5 MeV et des ions carbone de 4,8 GeV (Figure 5-45). Ces particules ont des TEL respectifs très proches de 15,6 eV/nm et de 11,3 eV/nm dans le gel.

Dans le cas des ions carbone de hautes énergies, étant donné les fluences relativement faibles disponibles, il n'a pas été possible d'obtenir des fluences supérieures à $1,1 \times 10^5$ ions/cm² au cours d'une nuit d'irradiation. Ces fluences suffisent tout de même à observer un plateau, suivi d'un début de modifications, similaires à celles observées avec les autres ions (hélices alpha converties en structures bêta), et qui semblent apparaître pour des fluences plus faibles qu'avec les protons de 2,5 MeV (Figure 5-45). Cette différence reflète à nouveau l'influence des électrons secondaires énergétiques émis.

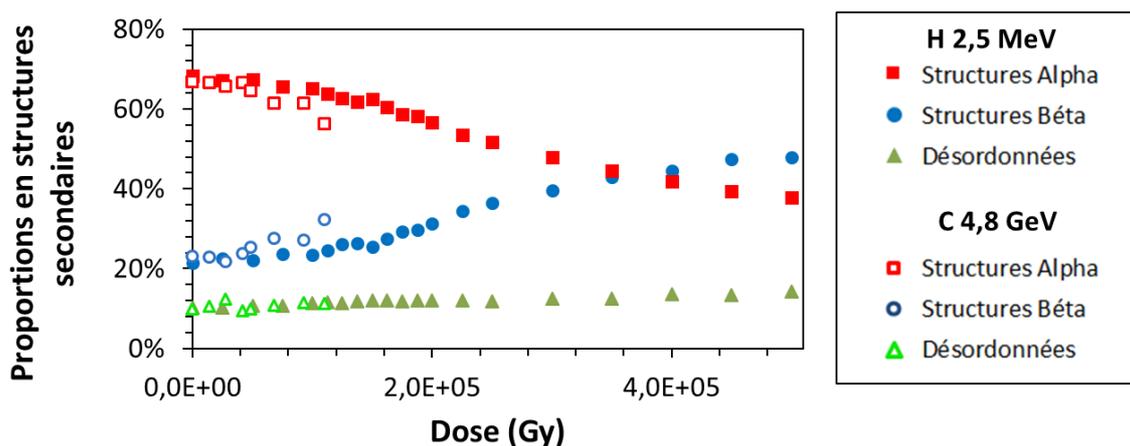


Figure 5-45 : Comparaison de l'évolution de la structure secondaire des protéines lors de l'irradiation d'un gel de myoglobine par des protons de 2,5 MeV et des ions carbone de 4,8 GeV.

D. Conclusion intermédiaire

Lors de cette étude, la réalisation de gels d'épaisseur micrométrique contrôlée de protéines ayant conservé leur structure native a été développée avec succès. Étant donné les faibles quantités d'agent de couplage utilisées, ces gels étaient constitués presque exclusivement de protéines (~23 %) et d'eau lourde (~77 %). Un montage expérimental permettant l'irradiation par des ions de basses énergies, avec suivi en ligne par infra-rouge et contrôle de l'atmosphère a également été développé. La détermination de la structure secondaire moyenne des protéines dans le gel a été possible par déconvolution de sa bande amide I en infra-rouge.

Que ce soit sous irradiation par des protons, particules alpha, ions carbone de basses ou hautes énergies, les modifications de la structure secondaire observées consistent en une conversion des hélices alpha en structures bêta. Une forte dépendance au TEL a pu être mise en évidence, les particules de plus haut TEL induisant des modifications équivalentes pour des fluences bien plus basses que les protons. De plus, la protéine semble aboutir sous irradiation à une structure finale identique pour tous les ions, ne comportant plus qu'environ 30% de structures alpha.

Deux traitements des données différents (mesure globale et théorie de la cible) aboutissent à une énergie nécessaire de 200 à 250 eV par protéine pour complètement la modifier et obtenir cette structure finale.

E. Multiplication des cibles protéiques

Le même protocole que celui décrit pour la réalisation de gels hydratés de myoglobine a été adapté pour d'autres protéines, la HSA, la β -lactoglobuline et la β -caséine. L'étude de la radiolyse des protéines en milieu concentré a ainsi pu être étendue à des protéines de différentes tailles et différentes structures natives. Leurs caractéristiques sont données dans le (Tableau 5-7).

Tableau 5-8 : Structure cristalline, en gels et masse de la Myoglobine, la HSA, la β -lactoglobuline et la β -caséine. Les structures des références proviennent articles suivant : dans l'ordre (Maurus et al., 1997). (Sugio et al., 1999). (Brownlow et al., 1997). (Farrell et al., 2001).

Protéine	Structure de référence	Structure initiale dans les gels	Masse de la protéine,
Myoglobine	Cristallographie (1WLA) Structures alpha : 73 % Structure bêta : 13 % Désordonnée : 14 %	Structures alpha : 70 % Structure bêta : 20 % Désordonnée : 10 %	17,6 kDa
HSA	Cristallographie (1AO6) Structures alpha : 71 % Structure bêta : 16 % Désordonnée : 13 %	Structures alpha : 66 % Structure bêta : 28 % Désordonnée : 6 %	66,5 kDa
β -lactoglobuline	Cristallographie (1BEB) Structures alpha : 16 % Structure bêta : 67 % Désordonnée : 17 %	Structures alpha : 9 % Structure bêta : 82 % Désordonnée : 9 %	18,4 kDa
β -caséine	FTIR Structures alpha : 30 % Structure bêta : 66 % Désordonnée : 4 %	Structures alpha : 10 % Structure bêta : 78 % Désordonnée : 14 %	23,6 kDa

La HSA est une protéine globulaire constituée principalement d'hélices alpha. La β -lactoglobuline est, quant à elle, majoritairement constituée de structures bêta. La forme commerciale utilisée dans nos échantillons consiste en deux isoformes, différant de deux résidus seulement. Enfin, la β -caséine a été choisie car il s'agit d'une protéine par nature intrinsèquement non structurée. A nouveau, les échantillons utilisés provenaient de la forme commercialisée par Sigma-Aldrich, constituée de trois isoformes. Toutefois, nous avons observé lors de la réalisation de gels de β -caséine la formation de structures bêta pouvant correspondre à une structuration de cette

dernière par les fortes interactions protéine-protéine apparaissant en milieu très concentré (même effet probable dans le cas de l'apomyoglobine). Une structuration de cette dernière peut également être observée en solution (Farrell et al., 2001)(Tableau 5-9).

L'irradiation de ces trois protéines a pu être réalisée avec des particules alpha et comparée aux expériences menées sur la myoglobine (Figure 5-46).

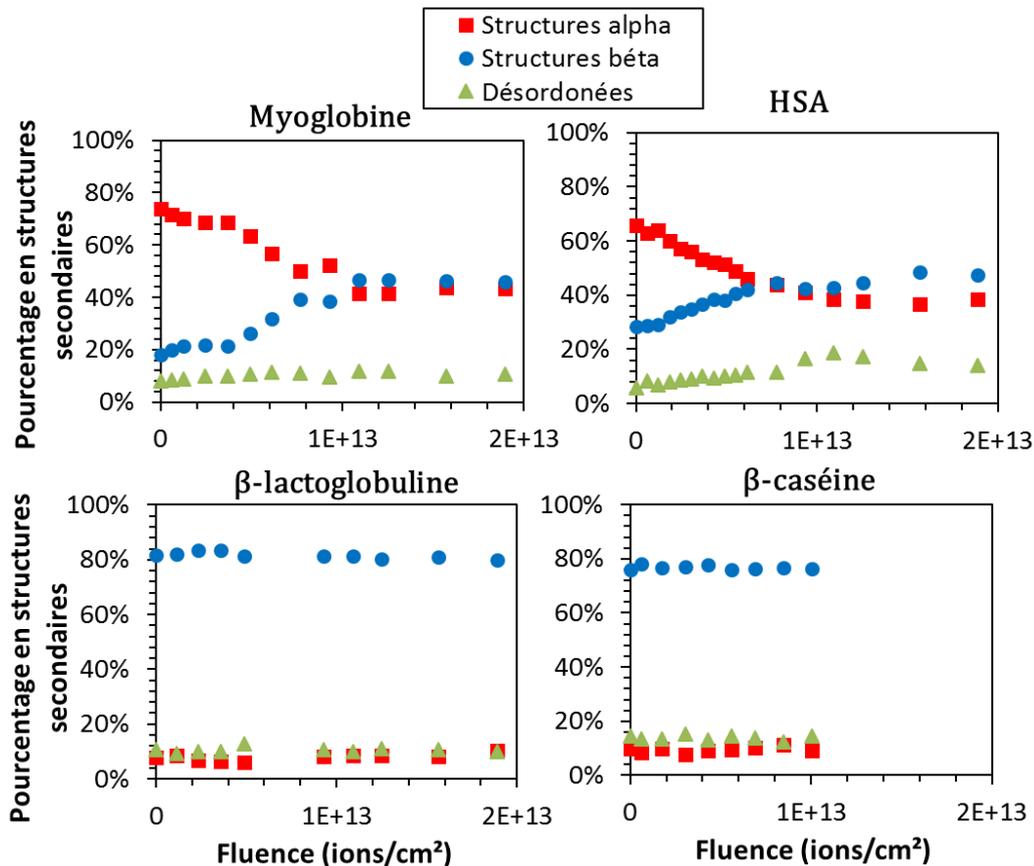


Figure 5-46 : Modifications des structures secondaires associées à la radiolyse de gels de myoglobine, de HSA, de β -lactoglobuline, et de β -caséine, sous irradiation par des particules alpha d'énergie 20 MeV.

La Figure 5-46 présente les modifications en structures secondaires des protéines précédentes sous irradiation par des particules alpha d'énergie 20 MeV, et permet leur comparaison avec celles de la myoglobine. On observe pour la HSA une forte diminution des hélices alpha, principalement au profit de structures bêta, avec toutefois pour les hautes fluences une augmentation des structures désordonnées. Ce comportement est très proche de celui observé pour la myoglobine. Concernant la β -lactoglobuline et la β -caséine, les comportements observés sont très différents des deux protéines précédentes. En effet, presque aucune modification de leur structure moyenne au cours de l'irradiation est observée, les structures bêta restent constantes. Il faut toutefois noter qu'une analyse plus détaillée de la structure de la β -lactoglobuline indique qu'une fraction

importante des feuillets bêta est convertie en coudes bêta, ce qui n'apparaît pas sur la figure, mais traduit tout de même des modifications.

Cette étude a montré que le protocole de mise en forme de gels contrôlés et d'irradiation avec suivi en ligne a pu être adapté pour d'autres protéines que la myoglobine. Il est intéressant de noter que des protéines de structures primaires aussi différentes que la HSA et la myoglobine (présence ou non d'un hème, de ponts disulfures, HSA presque quatre fois plus grande que la myoglobine) semblent subir des modifications structurales très similaires. Celles-ci pourraient donc être corrélées à la structure secondaire initiale de la protéine, laquelle est au contraire très proche pour la HSA et la myoglobine. L'absence apparente de modification de structure lors de l'irradiation de deux protéines de conformation majoritairement bêta va également dans ce sens, et semble indiquer une grande résistance de ces structures.

Des expériences similaires ont été réalisées sous irradiation par des protons et des ions carbone. Leur traitement est en cours et semble aboutir à des résultats tout à fait similaires aux effets de TEL près.

IV. Comparaison des irradiations de gels et de solutions diluées

Pour tenter de comparer les résultats obtenus lors des irradiations de protéines en milieu dilué (effets indirects) et sous forme de gels (effets directs et effets indirects), les résultats obtenus avec des protons de 2 MeV sont reportés dans la Figure 5-47 en fonction d'une dose commune et représentative pour les deux conditions. Les teneurs en protéines étant très différentes dans les deux expériences, l'énergie déposée par protéine semble alors la plus appropriée. Dans le cas d'effets purement indirects, cette énergie correspond à l'énergie déposée en solution en fonction du nombre de protéines présentes dans celle-ci. Dans les gels, l'énergie déposée statistiquement dans une protéine est calculée en tenant compte du volume de la protéine.

Comme le montre la Figure 5-47, les modifications des structures secondaires observées semblent beaucoup plus efficaces dans les milieux très concentrés qu'en milieu dilué. Ceci peut être corrélé avec l'augmentation des dégâts par effets directs avec la teneur en protéine. Les dégâts directs seraient donc plus efficaces pour aboutir à des modifications structurales de la protéine. Il faut toutefois garder à l'esprit que dans le cas de gels, les effets indirects sont également beaucoup plus sévères en raison de concentration en protéine bien plus élevée dans le gel et donc d'une proximité accrue les espèces de la radiolyse de l'eau.

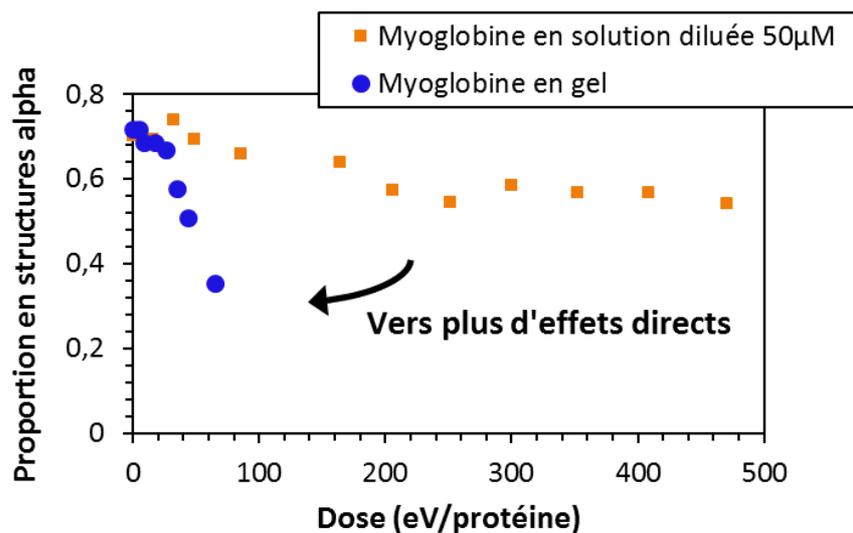


Figure 5-47 : Evolution des proportions en structures alpha pour les irradiations en solution diluée et en gel par des protons de 2 MeV. La mesure est intégrale dans le cas de la solution diluée et différentielle pour le gel.

Pour la suite de cette étude, il serait très intéressant d'aller vers une étude plus complète de ce système en fonction du degré d'hydratation des protéines. Se rapprocher d'effets purement directs semble être un point essentiel pour la bonne compréhension des mécanismes en jeu. La difficulté de cette étude se situe dans l'obtention d'échantillons déshydratés dans lesquels les protéines conserveraient leur structure native. Cela suppose notamment le maintien de l'eau structurée des protéines, tout en éliminant le plus d'eau « solvant » possible.

Conclusion générale

Ce travail de thèse s'insère dans une thématique dont le but est d'améliorer la connaissance et la compréhension des dommages aux biomolécules sous irradiation par des ions, il en est le commencement. Les études ont donc porté essentiellement sur deux points particuliers : la compréhension des mécanismes mis en jeu et la quantification des modifications induites sous irradiation par des ions.

Les irradiations dans le vivant étant par nature en milieu hydraté, trois niveaux d'études différents ont été définis. Le premier correspond à l'étude de la radiolyse de l'eau sous faisceau d'ions. Dans ce cadre, la quantification en fonction du temps de la production du radical hydroxyle, espèce la plus réactive produite en milieu oxygéné, a été réalisée en utilisant un capteur spécifique de ce radical, l'acide 3-coumarine carboxylique. La seconde a été l'étude de la dégradation d'un acide aminé, la phénylalanine, en solution aqueuse diluée, donc par effets indirects. Enfin, la radiolyse de la myoglobine, petite hémoprotéine, a été étudiée dans des conditions mêlant effets directs importants et indirects (gels), ainsi que dans des conditions mettant en jeu des effets purement indirects (solution diluée). Pour réaliser ces expériences, de nombreux développements techniques ont été réalisés. Parmi ceux-ci, le premier fut le développement d'une sortie air d'un faisceau d'ions balayé (plateforme ACACIA). Les cellules d'irradiation de solutions, spécifiques pour les basses ou les hautes énergies, ainsi qu'une cellule d'irradiation et de suivi en ligne de gels de protéines ont été également développées. Un grand nombre de techniques analytiques ont été exploitées pour l'analyse de nos échantillons : LC-MS-CAD-Fluorescence, SDS-PAGE, dichorisme circulaire, absorbance UV-Visible ou encore infrarouge. Enfin, en ce qui concerne les échantillons eux-mêmes, la fabrication de gels hydratés de protéines concentrées et natives a été mise au point pour plusieurs protéines. Ces gels, d'épaisseur micrométrique contrôlée, ont permis de suivre l'évolution des structures des protéines, après mise au point des conditions d'analyse par infrarouge.

Les rendements de production du radical hydroxyle ont été mesurés pour la première fois de manière systématique avec des protons, des particules alpha et des ions carbone de faibles énergies. Ces données ont également été comparées à des mesures à faible TEL (gamma et protons de hautes énergies) pour constituer un ensemble unique de données avec un même agent de capture. Des dépendances très fortes au TEL des particules et au temps de capture ont été observées sur les rendements de production du radical hydroxyle. Ces évolutions sont en accord avec la littérature et s'expliquent par les recombinaisons inter-radicalaires pouvant se produire dans la trace d'un ion au cours du temps, ou étant favorisées à fort TEL dans des traces plus denses.

Le lien entre la production du radical hydroxyle et la radiolyse de la phénylalanine en milieu dilué a ensuite pu être effectué. Tous les produits observés lors d'irradiations par des ions de phénylalanine ont été identifiés et résultent d'une première attaque par le radical hydroxyle. Pour certains produits, comme les isomères de la tyrosine, on observe des tendances très corrélées à la production du radical hydroxyle en fonction du TEL. Dans le cas des dimères et de la 2,5-dopa, un comportement très différent est observé. Les quantités de dimères formées atteignent ainsi un maximum pour des TEL intermédiaires, correspondants aux particules alpha de cette étude.

Quant à la 2,5-dopa, c'est pour les TEL les plus élevés qu'elle est formée en quantité la plus importante de formation. Un mécanisme bi-radicalaire a été déterminé, faisant intervenir le radical $O_2\cdot$. En cohérence avec ce mécanisme, la production de la 2,5-dopa semble également corrélée au débit de dose, lequel atteint souvent de hautes valeurs dans le cadre d'irradiations par des ions. Les résultats obtenus lors des irradiations de la phénylalanine ont pu être comparés à ceux d'expériences préliminaires avec le tryptophane, qui semblent montrer des tendances similaires. Des dégâts indirects accrus sous fort TEL ont alors pu être mis en évidence, alors que les rendements d'espèces radicalaires de la radiolyse de l'eau décroissent en fonction du TEL.

Lors de l'étude de la myoglobine, des phénomènes complexes ont été observés sous effets indirects de la radiolyse. Une modification de sa structure native a été observée, allant de pair avec la dégradation de son site actif par couplage de l'hème, probablement avec la tyrosine 103 ou l'histidine 64, ainsi qu'une fragmentation modérée de sa chaîne principale. En l'absence d'hème, l'apomyoglobine subit de nombreuses oxygénations, vraisemblablement principalement via les résidus tryptophanes et méthionines. L'hème semble donc jouer un rôle protecteur contre l'oxygénation de la protéine. Une telle constatation implique que les dégâts dus au radical hydroxyle pourraient aboutir au niveau de l'hème par des mécanismes non élucidés actuellement. De manière surprenante, le TEL des particules semble avoir très peu d'influence sur les dégâts à la myoglobine ou à l'apomyoglobine, ce qui soulève de nombreuses questions. En effet, celui-ci a un effet très important sur la production du radical $HO\cdot$, ainsi que de H_2O_2 produit par recombinaisons radicalaires, qui sont a priori à la base des dégâts observés. Les mécanismes complexes de ces derniers devront donc être étudiés en détail.

En parallèle, la radiolyse de la myoglobine en condition concentrée a montré une forte conversion des structures alpha en structures bêta sous irradiation, ainsi qu'une production de monoxyde de carbone. Il a été possible de relier les changements de structures secondaires au TEL des particules et une modification nettement plus rapide est observée en fonction de la fluence à fort TEL. La protéine semble atteindre la même structure finale après irradiation, indépendamment du TEL, ce qui semble indiquer une réorganisation définie de celle-ci, et non aléatoire. Dans le cas des particules alpha et des ions carbone, il semble qu'un ion suffise à complètement modifier la protéine. Des effets similaires au phénomène « d'overkill » ont également pu être observés avec les ions carbone, cet effet généralement observé en radiobiologie correspondant à un dépôt d'énergie plus intense que nécessaire pour détruire une cellule. Les résultats récemment obtenus avec d'autres protéines montrent des tendances similaires pour la HSA. Celle-ci partage avec la myoglobine une structure native constituée majoritairement d'hélices alpha, mais est de taille bien plus importante que la myoglobine. Elle comporte également des ponts disulfures structurants et aucun groupe prosthétique tel que l'hème. En revanche, dans le cas de protéines constituées majoritairement de structures bêta en milieu concentré (bêta lactoglobuline, bêta caséine, et apo-myoglobine dénaturée), on observe que celles-ci sont très faiblement impactées par la radiolyse. Ces résultats suggèrent une sensibilité des structures alpha et une résistance des structures bêta vis-à-vis de la radiolyse.

En conclusion, les travaux de cette thèse ont permis d'identifier des mécanismes de dégradation et de quantifier des rendements de production de dégâts sous irradiation par des ions pour des systèmes modèles de biomolécules. Lorsque la comparaison était possible, un assez bon accord avec la littérature existante a été trouvé. L'obtention de données fondamentales de ce type est essentielle à la compréhension des phénomènes de radiolyse lors de l'irradiation du vivant. Elles pourront également être exploitées pour la mise au point de codes de calcul permettant la bonne simulation de ces phénomènes, notamment Geant4-DNA. Une collaboration est en cours dans ce sens, pour modéliser les rendements en fonction du temps du radical hydroxyle à partir des mesures expérimentales réalisées. Une étude systématique devrait faire suite à ce travail en s'intéressant aux mécanismes de dégradation d'autres acides aminés ou protéines et à la quantification des produits de radiolyse. Dans le cas des protéines, passer à l'étude des effets purement directs semble essentiel à la bonne compréhension des mécanismes en jeu en milieu concentré. Pour ce faire, réduire d'avantage l'hydratation de la protéine pour garder uniquement l'eau structurelle de celle-ci est une piste à envisager.

Références bibliographiques

Adams, G.E., Boag, J.W., Curren, J., Michael, B.D., 1965. Absolute rate constants for the reaction of the hydroxyl radical with organic compounds, in: *Pulse Radiolysis*. pp. 131–143.

Ahlen, S., 1980. Theoretical and experimental aspects of the energy loss of relativistic heavily ionizing particles. *Rev. Mod. Phys.* 52, 121–173.

Allen, C., Borak, T.B., Tsujii, H., Nickoloff, J.A., 2011. Heavy charged particle radiobiology: Using enhanced biological effectiveness and improved beam focusing to advance cancer therapy. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 711, 150–157.

Ashawa, S.C., Kini, U.R., Madhvanath, U., 1979. The aqueous coumarin system as a low range chemical dosimeter. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 30, 7–10.

Audette-Stuart, M., Houée-Levin, C., Potier, M., 2005. Radiation-induced protein fragmentation and inactivation in liquid and solid aqueous solutions. Role of OH and electrons. *Radiat. Phys. Chem., Christiane Ferradini Memorial Issue* 72, 301–306.

Baldacchino, G., 2015. Water radiolysis with heavy-ion beams at GANIL. Back to 20 years of investigations. *J. Phys. Conf. Ser.* 629, 012009.

Baldacchino, G., Bouffard, S., Balanzat, E., Gardès-Albert, M., Abedinzadeh, Z., Jore, D., Deycard, S., Hickel, B., 1998. Direct time-resolved measurement of radical species formed in water by heavy ions irradiation. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* 146, 528–532.

Baldacchino, G., Le Parc, D., Hickel, B., Gardès-Albert, M., Abedinzadeh, Z., Jore, D., Deycard, S., Bouffard, S., Mouton, V., Balanzat, E., 1998. Direct observation of HO₂/O₂⁻ free radicals generated in water by a high-linear energy transfer pulsed heavy-ion beam. *Radiat. Res.* 149, 128–133.

Baldacchino, G., Maeyama, T., Yamashita, S., Taguchi, M., Kimura, A., Katsumura, Y., Murakami, T., 2009. Determination of the time-dependent OH-yield by using a fluorescent probe. Application to heavy ion irradiation. *Chem. Phys. Lett.* 468, 275–279.

Barth, A., 2007. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1767, 1073–1101.

Barth, A., 2000. The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 74, 141–173.

Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 1997. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313–20316.

Bibler, N.E., 1975. Radiolysis of 0.4 M sulfuric acid solutions with fission fragments from dissolved californium-252. Estimated yields of radical and molecular products that escape reactions in fission fragment tracks. *J. Phys. Chem.* 79, 1991–1995.

Bielski, B.H.J., Arudi, R.L., 1983. Preparation and stabilization of aqueous/ethanolic superoxide solutions. *Anal. Biochem.* 133, 170–178.

- Biondi, R., Xia, Y., Rossi, R., Paolocci, N., Ambrosio, G., Zweier, J.L., 2001. Detection of Hydroxyl Radicals by α -Phenylalanine Hydroxylation: A Specific Assay for Hydroxyl Radical Generation in Biological Systems. *Anal. Biochem.* 290, 138–145.
- Borges, F., Roleira, F., Milhazes, N., Uriarte, L.S. and E., 2005. Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity [WWW Document]. *Curr. Med. Chem.* URL <http://www.eurekaselect.com/60354/article> (accessed 4.28.18).
- Bradt, H.L., Peters, B., 1948. Investigation of the Primary Cosmic Radiation with Nuclear Photographic Emulsions. *Phys. Rev.* 74, 1828–1837.
- Brown, K.L., Tautfest, G.W., 1956. Faraday-Cup Monitors for High-Energy Electron Beams. *Rev. Sci. Instrum.* 27, 696–702.
- Brownlow, S., Morais Cabral, J.H., Cooper, R., Flower, D.R., Yewdall, S.J., Polikarpov, I., North, A.C., Sawyer, L., 1997. Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 Å resolution--still an enigmatic lipocalin. *Struct. Lond. Engl.* 1993 5, 481–495.
- Bruice, P.Y., 2004. *Organic Chemistry*, 4e éd. ed. Pearson Education Inc.
- Burns, W.G., Sims, H.E., 1981. Effect of radiation type in water radiolysis. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases* 77, 2803–2813.
- Butts, J.J., Katz, R., 1967. Theory of RBE for Heavy Ion Bombardment of Dry Enzymes and Viruses. *Rad. Res.* 30, 855–871.
- Buxton, G.V., 1972. Nanosecond pulse radiolysis of aqueous solutions containing proton and hydroxyl radical scavengers. *Proc R Soc Lond A* 328, 9–21.
- Buxton, G.V., Greenstock, C.L., Helman, W.P., Ross, A.B., 1988. Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}^-$ in Aqueous Solution). *J. Phys. Chem. Ref. Data* 17, 513–886.
- Buxton, G.V., Langan, J.R., Smith, J.R.L., 1986. Aromatic hydroxylation. 8. A radiation chemical study of the oxidation of hydroxycyclohexadienyl radicals. *J. Phys. Chem.* 90, 6309–6313.
- Byakov, V.M., Stepanov, S.V., 2006. The mechanism for the primary biological effects of ionizing radiation. *Uspekhi Fiz. Nauk* 176, 487.
- Byler, D.M., Susi, H., 1986. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* 25, 469–487.
- Carlsen, C.U., Skovgaard, I.M., Skibsted, L.H., 2003. Pseudoperoxidase Activity of Myoglobin: Kinetics and Mechanism of the Peroxidase Cycle of Myoglobin with H_2O_2 and 2,2-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) as Substrates. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5815–5823.
- Cheng, F.-C., Jen, J.-F., Tsai, T.-H., 2002. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. *J. Chromatogr. B, Indicators of (patho)physiological processes* 781, 481–496.

- Chitose, N., Katsumura, Y., Domae, M., Cai, Z., Muroya, Y., Murakami, T., LaVerne, J.A., 2001. Radiolysis of Aqueous Solutions with Pulsed Ion Beams. 4. Product Yields for Proton Beams in Solutions of Thiocyanate and Methyl Viologen/Formate. *J. Phys. Chem. A* 105, 4902–4907.
- Cobut, V., Frongillo, Y., Patau, J.P., Goulet, T., Fraser, M.J., Jay-Gerin, J.P., 1998. Monte Carlo simulation of fast electron and proton tracks in liquid water - I. Physical and physicochemical aspects. *Radiat. Phys. Chem.* 51, 229–243.
- Constanzo, J., 2013. Développement de la plateforme Radiograaff d'irradiation protons pour des études en radiobiologie. (phdthesis). Université Claude Bernard - Lyon I.
- Cucinotta, F.A., Katz, R., Wilson, J.W., 1998. Radial distribution of electron spectra from high-energy ions. *Radiat. Environ. Biophys.* 37, 259–265.
- Delgado, F.F., Cermak, N., Hecht, V.C., Son, S., Li, Y., Knudsen, S.M., Olcum, S., Higgins, J.M., Chen, J., Grover, W.H., Manalis, S.R., 2013. Intracellular Water Exchange for Measuring the Dry Mass, Water Mass and Changes in Chemical Composition of Living Cells. *PLOS ONE* 8, e67590.
- Dertinger, H., Jung, H., 1969. *Molecular radioation biology*. Heidelberg science library.
- Draganic, Z.D., Draganic, I.G., 1973. Formation of primary yields of hydroxyl radical and hydrated electron in the .gamma.-radiolysis of water. *J. Phys. Chem.* 77, 765–772.
- Du, J., Gebicki, J.M., 2004. Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2334–2343.
- Egawa, T., Yoshioka, S., Takahashi, S., Hori, H., Nagano, S., Shimada, H., Ishimori, K., Morishima, I., Suematsu, M., Ishimura, Y., 2003. Kinetic and Spectroscopic Characterization of a Hydroperoxy Compound in the Reaction of Native Myoglobin with Hydrogen Peroxide. *J. Biol. Chem.* 278, 41597–41606.
- Elliot, A.J., Chenier, M.P., Ouellette, D.C., 1993. Temperature dependence of g values for H₂O and D₂O irradiated with low linear energy transfer radiation. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 89, 1193–1197.
- Farrell, H.M., Wickham, E.D., Unruh, J.J., Qi, P.X., Hoagland, P.D., 2001. Secondary structural studies of bovine caseins: temperature dependence of β -casein structure as analyzed by circular dichroism and FTIR spectroscopy and correlation with micellization. *Food Hydrocoll.*, 5th International Hydrocolloids Conference 15, 341–354.
- Fokas, E., Kraft, G., An, H., Engenhart-Cabillic, R., 2009. Ion beam radiobiology and cancer: Time to update ourselves. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1796, 216–229.
- Fricke, H., Hart, E.J., 1966. Chemical dosimetry. *Radiat. Dosim.* 2, 167–239.
- Frongillo, Y., Goulet, T., Fraser, M.J., Cobut, V., Patau, J.P., Jay-Gerin, J.P., 1998. Monte Carlo simulation of fast electron and proton tracks in liquid water - II. Nonhomogeneous chemistry. *Radiat. Phys. Chem.* 51, 245–254.

- Furusawa, Y., Fukutsu, K., Aoki, M., Itsukaichi, H., Eguchi-Kasai, K., Ohara, H., Yatagai, F., Kanai, T., Ando, K., 2000. Inactivation of Aerobic and Hypoxic Cells from Three Different Cell Lines by Accelerated ^3He -, ^{12}C - and ^{20}Ne -Ion Beams. *Radiat. Res.* 154, 485–496.
- Garrison, W.M., 1987. Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem. Rev.* 87, 381–398.
- Garry, D.J., Mammen, P.P.A., 2007. Molecular Insights into the Functional Role of Myoglobin, in: *Hypoxia and the Circulation, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, Boston, MA, pp. 181–193.
- Getoff, N., 1992. Pulse radiolysis of aromatic amino acids — State of the art. *Amino Acids* 2, 195–214.
- Girdhani, S., Sachs, R., Hlatky, L., 2015. Biological effects of proton radiation: an update. *Radiat. Prot. Dosimetry* 166, 334–338.
- Goldhaber, A.S., 1974. Statistical models of fragmentation processes. *Phys. Lett. B* 53, 306–308.
- Goldhaber, A.S., Heckman, H.H., 1978. High Energy Interactions of Nuclei. *Annu. Rev. Nucl. Part. Sci.* 28, 161–205. <https://doi.org/10.1146/annurev.ns.28.120178.001113>
- Golovkov, M.S., Chulkov, L.V., Schardt, D., Aleksandrov, D.V., Kraus, G., 1997. Fragmentation of 270 a MeV carbon ions in water [WWW Document]. CERN Doc. Serv. URL <https://cds.cern.ch/record/328169> (accessed 6.26.18).
- Haber, F., Weiss, J., 1932. Über die Katalyse des Hydroperoxydes. *Naturwissenschaften* 20, 948–950.
- Harrison, S.C., Blout, E.R., 1965. Reversible Conformational Changes of Myoglobin and Apomyoglobin 240, 5.
- Hochanadel, C.J., 1952. Effects of Cobalt γ -Radiation on Water and Aqueous Solutions. *J. Phys. Chem.* 56, 587–594.
- Hoffman, M.Z., Hayon, E., 1973. Pulse radiolysis study of sulfhydryl compounds in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* 77, 990–996.
- Houée-Levin, C., Bobrowski, K., 2013. The use of the methods of radiolysis to explore the mechanisms of free radical modifications in proteins. *J. Proteomics, Special Issue: Posttranslational Protein Modifications in Biology and Medicine* 92, 51–62.
- Houée-Levin, C., Sicard-Roselli, C., 2001. Radiation chemistry of proteins, in: Jonah, C.D., Rao, B.S.M. (Eds.), *Radiation Chemistry: Present Status and Future Trends, Radiation Chemistry*. Elsevier, pp. 553–584.
- Iakovlev, A., Broberg, A., Stenlid, J., 2003. Fungal modification of the hydroxyl radical detector coumarin-3-carboxylic acid. *FEMS Microbiol. Ecol.* 46, 197–202.

ICRU - REPORT 14 [WWW Document], n.d. . Radiat. Dosim. X Rays Gamma Rays Maximum Photon Energ. 06 50 MeV Eng. URL <https://standards.globalspec.com/std/512605/icru-report-14> (accessed 5.11.18).

Incerti, S., Douglass, M., Penfold, S., Guatelli, S., Bezak, E., 2016. Review of Geant4-DNA applications for micro and nanoscale simulations. *Phys. Med.* 32, 1187–1200.

Iwata, Y., Furukawa, T., Hara, Y., Mizushima, K., Murakami, T.M., Noda, K., Sato, S., Shirai, T., Shoda, K., Suzuki, S.S., 2013. Superconducting Gantry and Other Developments at HIMAC 5.

Jonah, C.D., Hart, E.J., Matheson, M.S., 1973. Yields and decay of the hydrated electron at times greater than 200 picoseconds. *J. Phys. Chem.* 77, 1838–1843.

Jonah, C.D., Matheson, M.S., Miller, J.R., Hart, E.J., 1976. Yield and decay of the hydrated electron from 100 ps to 3 ns. *J. Phys. Chem.* 80, 1267–1270.

Jonah, C.D., Miller, J.R., 1977. Yield and Decay of the Hydroxyl Radical from 200ps to 3ns. *J. Phys. Chem.* 81, 1974–1976.

Katz, R., Cucinotta, F.A., Zhang, C.X., 1996. The calculation of radial dose from heavy ions: predictions of biological action cross sections. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* 107, 287–291.

Kempner, E.S., 1999. Advances in Radiation Target Analysis. *Anal. Biochem.* 276, 113–123. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4362>

Kendrew, J.C., Bodo, G., Dintzis, H.M., Parrish, R.G., Wyckoff, H., Phillips, D.C., 1958. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* 181, 662–666.

Konishi, T., Yasuda, N., Takeyasu, A., Ishizawa, S., Fujisaki, T., Matsumoto, K., Furusawa, Y., Sato, Y., Hieda, K., 2005. Irradiation system of ions (H–Xe) for biological studies near the Bragg peak. *Rev. Sci. Instrum.* 76, 114302.

Krajnik, P., Quint, R.M., Solar, S., Getoff, N., Sontag, G., 1995. Influence of Temperature and Oxygen Concentration on the Radiation Induced Oxidation of Phenylalanine. *Z. Für Naturforschung A* 50a, 864–870.

Laverne, J., Schuler, R., 1994. Track Effects in Water Radiolysis - Yields of the Fricke Dosimeter for Carbon-Ions with Energies up to 1700 Mev. *J. Phys. Chem.* 98, 4043–4049.

LaVerne, J.A., 2000. Track Effects of Heavy Ions in Liquid Water. *Radiat. Res.* 153, 487–496.

LaVerne, J.A., Schuler, R.H., 1987. Radiation chemical studies with heavy ions: oxidation of ferrous ion in the Fricke dosimeter. *J. Phys. Chem.* 91, 5770–5776.

Lee, E.J., Ahn, D.U., 2004. Sources and Mechanisms of Carbon Monoxide Production by Irradiation. *J. Food Sci.* 69, C485–C490.

- Lee, Y., Song, K.B., 2002. Effect of gamma-irradiation on the molecular properties of myoglobin. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35, 590–594.
- Lichtin, N.N., Shafferman, A., 1974. Reactions of Phenylalanine Derivatives, Methionine Derivatives, and Their Mixtures in Aqueous Solution with Pulse-Radiolytically Generated H Atoms. *Radiat. Res.* 60, 432–440.
- Ligor, M., Studzińska, S., Horna, A., Buszewski, B., 2013. Corona-Charged Aerosol Detection: An Analytical Approach. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 43, 64–78.
- Lindemann, L., Hoener, M.C., 2005. A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 274–281.
- Louit, G., Hanedanian, M., Taran, F., Coffigny, H., Renault, J.P., Pin, S., 2009. Determination of hydroxyl rate constants by a high-throughput fluorimetric assay: towards a unified reactivity scale for antioxidants. *Analyst* 134, 250–255.
- Ludwig, N., Kusumoto, T., Galindo, C., Peaupardin, P., Pin, S., Renault, J.-P., Muller, D., Yamauchi, T., Kodaira, S., Barillon, R., Raffy, Q., 2018. Radiolysis of phenylalanine in solution with Bragg-Peak energy protons. *Radiat. Meas.* 116, 55–59.
- Maeyama, T., Yamashita, S., Baldacchino, G., Taguchi, M., Kimura, A., Murakami, T., Katsumura, Y., 2011. Production of a fluorescence probe in ion-beam radiolysis of aqueous coumarin-3-carboxylic acid solution—1: Beam quality and concentration dependences. *Radiat. Phys. Chem.* 80, 535–539.
- Manson, S.T., DuBois, R.D., Toburen, L.H., 1983. Multiple-Ionization Mechanisms in Fast Proton-Neon Collisions. *Phys. Rev. Lett.* 51, 1542–1545.
- Maskos, Z., Rush, J.D., Koppenol, W.H., 1992. The hydroxylation of phenylalanine and tyrosine: A comparison with salicylate and tryptophan. *Arch. Biochem. Biophys.* 296, 521–529.
- Masuda, T., Nakano, S., Kondo, M., 1973. Rate constants for the reactions of OH radicals with the enzyme proteins as determined by the p-nitrosodimethylaniline method. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 14, 339–345.
- Maurus, R., Overall, C.M., Bogumil, R., Luo, Y., Mauk, A.G., Smith, M., Brayer, G.D., 1997. A myoglobin variant with a polar substitution in a conserved hydrophobic cluster in the heme binding pocket. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1341, 1–13.
- Mayer, E., 1994. FTIR spectroscopic study of the dynamics of conformational substates in hydrated carbonyl-myoglobin films via temperature dependence of the CO stretching band parameters. *Biophys. J.* 67, 862–873.
- McKay, J., 2005. History of the Electrostatic Accelerator, in: *Electrostatic Accelerators, Particle Acceleration and Detection*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 52–63.
- Meesungnoen, J., Benrahmoune, M., Filali-Mouhim, A., Mankhetkorn, S., Jay-Gerin, J.P., 2001. Monte Carlo calculation of the primary radical and molecular yields of liquid water radiolysis in

the linear energy transfer range 0.3-6.5 keV/micrometer: application to ^{137}Cs gamma rays. *Radiat. Res.* 155, 269–278.

Meesungnoen, J., Jay-Gerin, J.-P., 2011. Radiation chemistry of liquid water with heavy ions: Monte carlo simulation studies, in: *Charged Particle and Photon Interaction with Matter*. CRC Press, pp. 355–400.

Meesungnoen, J., Jay-Gerin, J.-P., 2005. High-LET Radiolysis of Liquid Water with $^1\text{H}^+$, $^4\text{He}^{2+}$, $^{12}\text{C}^{6+}$, and $^{20}\text{Ne}^{9-}$ Ions: Effects of Multiple Ionization. *J. Phys. Chem. A* 109, 6406–6419.

Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M.J., Waldron, K.C., 2004. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques* 37, 790–806.

Mittal, L.J., Mittal, J.P., 1986. Site of attack in the interaction of hydrated electrons and hydroxy radicals in the pulse radiolysis of arylalkylamines in aqueous solutions. *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part C Radiat. Phys. Chem.* 28, 363–371.

Moliere, G., 1947. Theorie der Streuung schneller geladener Teilchen I. Einzelstreuung am abgeschirmten Coulomb-Feld. *Z. Für Naturforschung A* 2, 133–145.

Moritake, T., Tsuboi, K., Anzai, K., Ozawa, T., Ando, K., Nose, T., 2003. ESR Spin Trapping of Hydroxyl Radicals in Aqueous Solution Irradiated with High-LET Carbon-Ion Beams. *Radiat. Res.* 159, 670–675.

Moskovitz, J., Yim, M.B., Chock, P.B., 2002. Free Radicals and Disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 354–359.

Mozumder, A., Magee, J.L., 1966. Model of Tracks of Ionizing Radiations for Radical Reaction Mechanisms. *Radiat. Res.* 28, 203–214.

Muroya, Y., Plante, I., Azzam, E.I., Meesungnoen, J., Katsumura, Y., Jay-Gerin, J.-P., 2006. High-LET Ion Radiolysis of Water: Visualization of the Formation and Evolution of Ion Tracks and Relevance to the Radiation-Induced Bystander Effect. *Radiat. Res.* 165, 485–491.

Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., Takeda, T., 1989. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavine T. *Anal. Biochem.* 177, 244–249.

NDRL/NIST Solution Kinetics Database [WWW Document], n.d. URL <https://kinetics.nist.gov/solution/> (accessed 5.29.18).

Newton, G.L., Milligan, J.R., 2006. Fluorescence detection of hydroxyl radicals. *Radiat. Phys. Chem.* 75, 473–478.

Orecchia, R., Zurlo, A., Loasses, A., Krenagli, M., Tosi, G., Zurrada, S., Zucali, P., Veronesi, U., 1998. Particle beam therapy (hadrontherapy): basis for interest and clinical experience. *Eur. J. Cancer* 34, 459–468.

- Osawa, Y., Darbyshire, J.F., Steinbach, P.J., Brooks, B.R., 1993. Metabolism-based transformation of myoglobin to an oxidase by BrCCl₃ and molecular modeling of the oxidase form. *J. Biol. Chem.* 268, 2953–2959.
- Paganetti, H., 2003. Significance and implementation of RBE variations in proton beam therapy. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2, 413–426.
- Petsko, G.A., Ringe, D., 2008. Structure et fonction des protéines. De Boeck Supérieur.
- Pimblott, S.M., LaVerne, J.A., 2002. Effects of Track Structure on the Ion Radiolysis of the Fricke Dosimeter. *J. Phys. Chem. A* 106, 9420–9427.
- Prise, K.M., Folkard, M., Michael, B.D., 2003. A review of the bystander effect and its implications for low-dose exposure. *Radiat. Prot. Dosimetry* 104, 347–355.
- Prise, K.M., Schettino, G., Folkard, M., Held, K.D., 2005. New insights on cell death from radiation exposure. *Lancet Oncol.* 6, 520–528.
- PTCOG - Patient Statistics [WWW Document], n.d. URL <https://www.ptcog.ch/index.php/patient-statistics> (accessed 5.8.18).
- Puchala, M., Schuessler, H., 1995. Oxygen effect in the radiolysis of proteins. *Int. J. Pept. Protein Res.* 46, 326–332.
- Rafiei, J., Yavari, K., Moosavi-Movahedi, A.A., 2017. Preferential role of iron in heme degradation of hemoglobin upon gamma irradiation. *Int. J. Biol. Macromol.* 103, 1087–1095.
- Reeder, B.J., Svistunenko, D.A., Sharpe, M.A., Wilson, M.T., 2002. Characteristics and Mechanism of Formation of Peroxide-Induced Heme to Protein Cross-Linking in Myoglobin. *Biochemistry* 41, 367–375.
- Richards, M.P., 2013. Redox Reactions of Myoglobin. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 2342–2351.
- Ritter, S., Durante, M., 2010. Heavy-ion induced chromosomal aberrations: A review. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 701, 38–46.
- Rossi-Fanelli, A., Antonini, E., Caputo, A., 1958. Studies on the structure of hemoglobin I. Physicochemical properties of human globin. *Biochim. Biophys. Acta* 30, 608–615.
- Saffré, D., 2011. Radiolyse de l'eau dans des conditions extrêmes de température et de TEL. Capture de HO• par les ions Br- (phdthesis). Université Paris Sud - Paris XI.
- Sauer, Myran C., Schmidt, K.H., Hart, E.J., Naleway, C.A., Jonah, C.D., 1977. LET Dependence of Transient Yields in the Pulse Radiolysis of Aqueous Systems with Deuterons and α Particles. *Radiat. Res.* 70, 91–106.
- Savitzky, A., Golay, M.J.E., 1964. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal. Chem.* 36, 1627–1639.
- Schenkman, K.A., Marble, D.R., Burns, D.H., Feigl, E.O., 1997. Myoglobin oxygen dissociation by multiwavelength spectroscopy. *J. Appl. Physiol.* 82, 86–92.

- Scholes, G., Schaw, P., Wilson, R.L., Ebert, M., 1965. Pulse radiolysis studies of aqueous solutions of nucleic acid and related substances, in: *Pulse Radiolysis*. Academic Press, pp. 151–164.
- Seltzer, S.M., Berger, M.J., 1982. Evaluation of the collision stopping power of elements and compounds for electrons and positrons. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 33, 1189–1218.
- Sevilla, M.D., Brooks, V.L., 1973. Radicals formed by the reaction of electrons with amino acids and peptides in a neutral aqueous glass. *J. Phys. Chem.* 77, 2954–2959.
- Sevilla, M.D., D’Arcy, J.B., Morehouse, K.M., 1979a. An electron spin resonance study of .gamma.-irradiated frozen aqueous solutions containing dipeptides. Mechanisms of radical reaction. *J. Phys. Chem.* 83, 2887–2892.
- Sevilla, M.D., D’Arcy, J.B., Morehouse, K.M., 1979b. An electron spin resonance study of .gamma.-irradiated frozen aqueous solutions containing N-acetyl amino acids. *J. Phys. Chem.* 83, 2893–2897.
- Sharpatyi, V.A., 2003. Radiation Chemistry of Polysaccharides: 1. Mechanisms of Carbon Monoxide and Formic Acid Formation. *High Energy Chem.* 37, 369–372.
- Shiraishi, H., Buxton, G.V., Wood, N.D., 1989. Temperature dependence of the absorption spectrum of the methyl viologen cation radical and use of methyl viologen as a scavenger for estimating yields of the primary radicals in the radiolysis of high-temperature water. *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part C Radiat. Phys. Chem.* 33, 519–522.
- Shiraishi, H., Katsumura, Y., Hiroishi, D., Ishigure, K., Washio, M., 1988. Pulse-radiolysis study on the yield of hydrated electron at elevated temperatures. *J. Phys. Chem.* 92, 3011–3017.
- Simic, M.G., Gajewski, E., Dizdaroglu, M., 1984. Kinetics and mechanisms of hydroxyl radical-induced crosslinks between phenylalanine peptides. *Radiat. Phys. Chem.* 1977 24, 465–473.
- Solar, S., 1985. Reaction of OH with phenylalanine in neutral aqueous solution. *Radiat. Phys. Chem.* 1977 26, 103–108.
- Solar, S., Solar, W., Getoff, N., 1984a. Reactivity of hydroxyl with tyrosine in aqueous solution studied by pulse radiolysis. *J. Phys. Chem.* 88, 2091–2095.
- Solar, S., Solar, W., Getoff, N., 1984b. Resolved multisite OH-attack on aqueous tryptophan studied by pulse radiolysis. *Radiat. Phys. Chem.* 1977 23, 371–376.
- Spinks, J.W.T., Woods, R.J., 1990. AN INTRODUCTION TO RADIATION CHEMISTRY, 3ème édition. ed. Wiley-Interscience.
- Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., Kobayashi, K., 1999. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng. Des. Sel.* 12, 439–446.
- Sumiyoshi, T., Katayama, M., 1982. The yield of hydrated electrons at 30 picoseconds. *Chem. Lett.* 11, 1887–1890.

- Sunaryo, G.R., Katsumura, Y., Shirai, I., Hiroishi, D., Ishigure, K., 1994. Radiolysis of water at elevated temperatures—I. Irradiation with gamma-rays and fast neutrons at room temperature. *Radiat. Phys. Chem.* 44, 273–280.
- Synytsya, A., Alexa, P., de Boer, J., Loewe, M., Moosburger, M., Würkner, M., Volka, K., 2007. Raman spectroscopic study of serum albumins: an effect of proton- and γ -irradiation. *J. Raman Spectrosc.* 38, 1646–1655.
- Taguchi, M., Hayano, K., Xu, Y., Moriyama, M., Kobayashi, Y., Hiratsuka, H., Ohno, S.-I., 2001. Yields of tyrosines in the radiolysis of aqueous phenylalanine solutions by energetic heavy ions. *Radiat. Phys. Chem.* 60, 263–268.
- Taguchi, M., Kimura, A., Watanabe, R., Hirota, K., 2009. Estimation of yields of hydroxyl radicals in water under various energy heavy ions. *Radiat. Res.* 171, 254–263.
- Thomas, J.K., Bensasson, R.V., 1967. Direct Observation of Regions of High Ion and Radical Concentration in the Radiolysis of Water and Ethanol. *J. Chem. Phys.* 46, 4147–4148.
- Tornberg, K., Olsson, S., 2002. Detection of hydroxyl radicals produced by wood-decomposing fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 40, 13–20.
- Uehara, S., Nikjoo, H., 2006. Monte Carlo Simulation of Water Radiolysis for Low-energy Charged Particles. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 47, 69–81.
- Varma, M.N., Baum, J.W., 1980. Energy deposition in nanometer region by 377 MeV/nucleon ^{20}Ne ions. *Rad. Res.* 81, 355–363.
- Waligórski, M.P.R., Hamm, R.N., Katz, R., 1986. The radial distribution of dose around the path of a heavy ion in liquid water. *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part Nucl. Tracks Radiat. Meas.* 11, 309–319.
- Wang, D., Schuchmann, H.-P., von, S.C., 1993. Phenylalanine: Its $\cdot\text{OH}$ and $\text{SO}_4^{\cdot-}$ -Induced Oxidation and Decarboxylation. A Pulse Radiolysis and Product Analysis Study. *Z. Für Naturforschung B* 48, 761–770.
- Watt, D.E., 1996. *Quantities for Dosimetry of Ionizing Radiations in Liquid Water*. CRC Press.
- Weyrather, W.K., Kraft, G., 2004. RBE of carbon ions: Experimental data and the strategy of RBE calculation for treatment planning. *Radiother. Oncol., Carbon-Ion Therapy Proceedings of the Heavy Charged Particles in Biology and Medicine* 73, Supplement 2, S161–S169.
- Whitmore, L., Wallace, B.A., 2008. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers* 89, 392–400.
- Whitmore, L., Wallace, B.A., 2004. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.* 32, W668–W673.
- Wojdyr, M., 2010. *Fityk*: a general-purpose peak fitting program. *J. Appl. Crystallogr.* 43, 1126–1128.

- Xu, G., Chance, M.R., 2007. Hydroxyl Radical-Mediated Modification of Proteins as Probes for Structural Proteomics. *Chem. Rev.* 107, 3514–3543.
- Xue, J.M., Du, G.H., Wang, Y.G., 2006. Effect of MeV proton irradiation on bovine serum albumin molecule. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* 245, 318–321.
- Yamashita, S., Baldacchino, G., Maeyama, T., Taguchi, M., Muroya, Y., Lin, M., Kimura, A., Murakami, T., Katsumura, Y., 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 Radic. Res.* 46, 861–871.
- Yamashita, S., Taguchi, M., Baldacchino, G., Katsumura, Y., 2011. Radiation chemistry of liquid water with heavy ions: Steady-state and pulse radiolysis, in: *Charged Particle and Photon Interaction with Matter*. CRC Press, pp. 325–354.
- Yamauchi, T., 2003. Studies on the nuclear tracks in CR-39 plastics. *Radiat. Meas., Proceedings of the 21st International Conference on Nuclear Tracks in Solids* 36, 73–81.
- Yang, H., Yang, S., Kong, J., Dong, A., Yu, S., 2015. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. *Nat. Protoc.* 10, 382–396.
- Yasuda, N., Konishi, T., Matsumoto, K., Yamauchi, T., Asuka, T., Furusawa, Y., Sato, Y., Oda, K., Tawara, H., Hieda, K., 2005. Dose distribution of carbon ions in air assessed using imaging plates and ionization chamber. *Radiat. Meas.* 40, 384–388.
- Żegota, H., Kołodziejczyk, K., Król, M., Król, B., 2005. *o*-Tyrosine hydroxylation by OH radicals. 2,3-DOPA and 2,5-DOPA formation in γ -irradiated aqueous solution. *Radiat. Phys. Chem.* 72, 25–33.
- Ziegler, J.F., 1999. Stopping of energetic light ions in elemental matter. *J. Appl. Phys.* 85, 1249–1272.
- Ziegler, J.F., Ziegler, M.D., Biersack, J.P., 2010. SRIM – The stopping and range of ions in matter (2010). *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.*, 19th International Conference on Ion Beam Analysis 268, 1818–1823.

Modification d'acides aminés et de protéines en milieu aqueux sous faisceau d'ions

Résumé

Cette thèse s'inscrit dans une volonté d'améliorer la compréhension des mécanismes fondamentaux de radiolyse de biomolécules par des ions accélérés, à l'échelle moléculaire. Ainsi, les ions étudiés ont été de différentes nature (H^+ , He^{2+} , C^{6+}) et de différentes énergies, correspondant à une gamme de densité de dépôt d'énergie allant de 0,3 à 1000 eV/nm.

Dans le vivant, l'eau ayant une place prépondérante, la compréhension de la radiolyse de l'eau est essentielle. L'espèce la plus réactive produite en milieu aéré, le radical hydroxyle (HO^\bullet) a été quantifiée en utilisant une sonde spécifique, l'acide 3-coumarine-carboxylique.

Les dégâts indirects aux biomolécules, via les espèces issues de la radiolyse de l'eau, ont été étudiés en solution aqueuse diluée sur deux systèmes : un acide aminé, la phénylalanine et une protéine, la myoglobine. Les effets directs de radiolyse ont été étudiés sur la myoglobine en gels concentrés hydratés. Les phénomènes de radiolyse ont été caractérisés pour décrire les mécanismes en jeu et les produits issus de la radiolyse de la phénylalanine ont été systématiquement identifiées et quantifiées.

Mots clés : Irradiation, Ion accélérés, Radiolyse, Radical hydroxyle, Phénylalanine, Myoglobine, TEL, Chimie sous rayonnement, hadronthérapie.

Résumé en anglais

The goal of this thesis is to achieve a better understanding of fundamental mechanisms of the radiolysis of biomolecules by accelerated ions, at the molecular scale. To do so, different type of ions have been used (H^+ , He^{2+} , C^{6+}) at various energies, corresponding to densities of energy deposition from 0,3 to 1000 eV/nm. The main component in biological systems is water. Therefore, the comprehension of the water radiolysis under ions irradiation is essential. One of the most reactive species produced in aerated conditions, the hydroxyl radical (HO^\bullet), has been quantified using a specific probe, the 3- carboxylic acid coumarin.

Indirect effects of radiolysis on biomolecules, involving water radiolysis species, have been studied in dilute aqueous solutions on two different systems: phenylalanine, an amino acid, and a protein, myoglobin. Direct radiolysis effect were studied on concentrated hydrogels of myoglobin ad other proteins. Elucidation of radiolysis mechanisms and quantification of phenylalanine radiolysis products were systematically performed.

Key words : Irradiation, accelerated ions, radiolysis, hydroxyl radical, phenylalanine, myoglobin, TEL, Radiation chemistry, hadrontherapy, particle therapy.